UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo da modulação de funções efetoras de neutrófilos humanos por derivados
cumarínicos: avaliação do efeito biológico sobre a produção de espécies reativas
de oxigênio e a desgranulação

Carolina Nakau Fuzissaki

Ribeirão Preto
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo da modulação de funções efectoras de neutrófilos humanos por derivados cumarínicos: avaliação do efeito biológico sobre a produção de espécies reativas de oxigênio e a desgranulação

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientada: Carolina Nakau Fuzissaki

Orientadora: Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim

Ribeirão Preto

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Fuzissaki, Carolina Nakau

Estudo da modulação de funções efetoras de neutrófilos humanos por derivados cumarínicos: avaliação do efeito biológico sobre a produção de espécies reativas de oxigênio e a desgranulação. Ribeirão Preto, 2009.

88 p.: il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Lucisano-Valim, Yara Maria

1. Cumarinas. 2. Neutrófilo. 3. Quimioluminescência. 4. Antioxidante. 5. Desgranulação. 6. Relação estrutura-atividade.

RESUMO

FUZISSAKI, C. N. Estudo da modulação de funções efetoras de neutrófilos humanos por derivados cumarínicos: avaliação do efeito biológico sobre a produção de espécies reativas de oxigênio e a desgranulação. 2009. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Os neutrófilos são células fagocíticas do sistema imune inato com mecanismos especializados de digestão de patógenos, complexos imune e detritos celulares, que são mediados principalmente por espécies reativas de oxigênio (EROs) e enzimas proteolíticas. Entretanto, a ativação maciça de neutrófilos leva a uma liberação exacerbada de enzimas e EROs para o meio extracelular, o que pode ultrapassar a capacidade de defesa tecidual, composta por antioxidantes e antiproteínases, e lesar o tecido, bem como amplificar o processo inflamatório observado em algumas doenças inflamatórias, autoimunes e infecciosas. O envolvimento de neutrófilos na fisiopatologia de tais doenças tem atraído o interesse na pesquisa de novas substâncias com propriedades antioxidantes e imunomodulatórias. Neste trabalho, foi avaliado o efeito modulatório de onze derivados de cumarinas hidroxiladas e acetoxiladas sobre duas funções efetoras de neutrófilos humanos (produção de EROs e desgranulação), bem como a citotoxicidade dessas substâncias. Além disso, a relação estrutura-atividade foi analisada. Para tais investigações, o sangue venoso foi coletado de voluntários saudáveis e os neutrófilos foram isolados pelo método da gelatina. O metabolismo oxidativo dos neutrófilos foi desencadeado por zimosan opsonizado com soro humano normal (ZIops) ou forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), e a resposta celular foi avaliada pelos ensaios de quimioluminescência dependente de lucigenina (QLuc) ou de luminol (QLum). Para a realização desses ensaios, foram padronizadas as seguintes condições experimentais: concentração das sondas luminol e lucigenina; concentração do solvente dimetilsulfóxido; tempo de leitura da QLuc e QLum. Posteriormente, a atividade antioxidante das cumarinas frente ao radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi avaliada espectrofotometricamente em 510 nm. Além disso, foi avaliado o efeito das cumarinas na desgranulação dos neutrófilos induzida por *n*-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), utilizando-se a enzima elastase como marcador, bem como o efeito dessas substâncias na atividade da elastase liberada pelos neutrófilos. Ambos os ensaios foram realizados através da quantificação de *p*-nitroanilina liberada após a quebra de um substrato específico para essa enzima, em 405 nm. A toxicidade das cumarinas sobre os neutrófilos foi avaliada pela exclusão do azul de tripan e pela medida da liberação de lactato desidrogenase. Observou-se que, tanto para as células estimuladas por ZIops quanto por PMA: (i) a maioria das cumarinas inibiu a QLuc e a QLum de maneira dependente da concentração, sendo que as mais ativas (**C**, **D**) possuíam grupos orto-diidroxil; (ii) quatro cumarinas (**A**, **B**, **F**, **G**) inibiram a QLuc, mas aumentaram a QLum; (iii) a cumarina não-substituída (**K**) não teve efeito modulatório significativo sobre a QLum ou QLuc; (iv) ordem de efeito inibitório das demais substâncias (**E**, **H**, **I**, **J**) foi dependente do número e posição dos grupos substituintes, bem como do tipo de sonda quimioluminescente (luminol ou lucigenina) e do estímulo utilizado. Verificou-se também que três cumarinas (**C**, **D**, **H**) tiveram atividade antioxidante significativa frente ao radical livre DPPH. Além disso, quatro das substâncias avaliadas (**A**, **B**, **E**, **G**) inibiram a desgranulação dos neutrófilos, mas nenhuma delas (**A** - **K**) interferiu na atividade da elastase. A análise do conjunto de resultados obtidos sugere que o número e posição dos grupos hidroxil e acetil no esqueleto cumarínico foram importantes para a modulação do metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos, sendo que, dependendo do tipo de EROs medida, tais características estruturais podem levar a um efeito anti- ou pró-oxidante. Além disso, o efeito modulatório das cumarinas sobre as funções efetoras dos neutrófilos foi dependente o tipo de estímulo utilizado, e não foi mediado pela toxicidade dessas substâncias, nas condições ensaiadas. Sendo assim, os resultados obtidos podem auxiliar no entendimento dos requisitos estruturais das cumarinas necessários para uma modulação eficiente das funções efetoras dos neutrófilos envolvidas em doenças inflamatórias.

Palavras-chave: cumarinas, neutrófilo, antioxidante, quimioluminescência, desgranulação, relação estrutura-atividade.

ABSTRACT

FUZISSAKI, C. N. **Study of modulation of human neutrophil effector functions by coumarin derivatives: evaluation of biological effect on reactive oxygen species production and degranulation.** 2009. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Neutrophils are phagocytic cells from the innate immune system with highly developed mechanisms for intracellular digestion of pathogens, immune complexes and cell debris, which are mainly mediated by reactive oxygen species (EROs) and proteolytic enzymes. However, massive neutrophil activation lead to release of large amounts of enzymes and EROs to the extracellular milieu, that may overpower the tissue defense systems, composed of antioxidants and antiproteinases, and damage the tissue, as well as contribute to the amplification of the inflammatory process found in some inflammatory, autoimmune and infectious diseases. The involvement of neutrophils in the physiopathology of such diseases has attracted the interest in the search of new compounds with antioxidant and immunomodulatory properties. In this work, we evaluated the modulatory effect of eleven hydroxylated and acetoxylated coumarin derivatives in two effector functions of human neutrophils (EROs production and degranulation) as well as the cytotoxic effects of these compounds. In addition, the structure-activity relationship was analyzed. Venous blood was collected from healthy volunteers and neutrophils were isolated by the gelatin method to perform our experiments. The neutrophil oxidative metabolism was triggered by normal human serum-opsonized zymosan (ZIops) or phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), and the cellular response was evaluated by the lucigenin (QLuc)- or luminol (QLum)-amplified chemiluminescence assays. In order to conduct this study, the following experimental conditions had to be established: concentration of the chemiluminescence probes luminol and lucigenin; concentration of the solvent dimethylsulfoxide; the QLuc and QLum reaction time. Afterwards, the antioxidant activity against 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) was evaluated spectrophotometrically at 510 nm. Moreover, the effect of coumarins in the *n*-formyl-metionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)-induced neutrophil degranulation was evaluated by using elastase as marker, and the effect of these compounds in the elastase activity were also evaluated. Both assays were performed by measuring the elastase-mediated *p*-nitroaniline release from a specific substrate (405 nm). Toxicity of coumarins to the neutrophils was evaluated by trypan blue exclusion and measurement of lactate dehydrogenase release. Considering both, ZIops and PMA-stimulated neutrophils, we observed that: (i) most of coumarins inhibited the QLuc and the QLum in a concentration-dependent manner, being the orto-dihydroxylated (**C**, **D**) the most active ones; (ii) four coumarins (**A**, **B**, **F**, **G**) inhibited the QLuc but increased the QLum; (iii) the unsubstituted coumarin (**K**) had no significant modulatory effect on QLum or QLuc; (iv) the rank order of inhibitory effect among the other compounds (**E**, **H**, **I**, **J**) was dependent on the number and position of substituents, as well as the type of chemiluminescent probe (luminol or lucigenin) and stimulus used. In addition, we observed that three coumarins (**C**, **D**, **H**) had a significant antioxidant activity against DPPH, and four compounds (**A**, **B**, **E**, **G**) inhibited the neutrophil degranulation, but none of the tested coumarins (**A** - **K**) interfered in the elastase activity. Taken together, our results suggest that the number and position of the hydroxyl and acetyl groups in the coumarin moiety were important to modulate the human neutrophil oxidative metabolism. Depending on the type of EROs measured, such structural features can lead to an anti- or pro-oxidant effect. Furthermore, the modulatory effect of coumarins on the neutrophil effector functions was dependent on the type of stimulus used, but it was not mediated by toxicity of these compounds to the neutrophils, under the assessed conditions. Therefore, the results described herein may be helpful to understand the structural requirements of coumarins to reach an efficient modulation of the neutrophil effector functions involved in inflammatory diseases.

Keywords: coumarins, neutrophil, antioxidant, chemiluminescence, degranulation, structure-activity relationship.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Δ Abs	variação na absorvância
ANOVA	análise de variância
CI ₅₀	concentração que inibe 50% da resposta biológica
cpm	fótons contados por minuto
CR ₅₀	concentração que reduz 50% do radical livre DPPH
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DPPH	radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
ERNs	espécies reativas de nitrogênio
EROs	espécies reativas de oxigênio
fMLP	n-formil-metionil-leucil-fenilalanina
GSH	glutathione reduzida
GSSG	glutathione oxidada
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfônico
LDH	lactato desidrogenase
MPO	mieloperoxidase
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídio reduzida
NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato oxidada
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato reduzida
PAF	fator de agregação plaquetária
pH	potencial hidrogeniônico
PKC	proteína quinase C
PMA	forbol-12-miristato-13-acetato
<i>p</i> -NA	<i>p</i> -nitroanilina
p/v	peso/volume
QL	quimioluminescência
QLlum	quimioluminescência dependente de luminol
QLluc	quimioluminescência dependente de lucigenina
SAAVNA	N-succinil-alanina-alanina-valina- <i>p</i> -nitroanilida
SLPI	inibidor de protease secretória de leucócitos
SOD	superóxido dismutase
v/v	volume/volume
ZI	zimosan A
ZIops	zimosan opsonizado

1. INTRODUÇÃO

1.1. Neutrófilos

No decurso de milhões de anos de evolução, os animais vertebrados desenvolveram elaborados sistemas de defesa contra a presença de patógenos, onde os fagócitos profissionais (neutrófilos, eosinófilos e monócitos) desempenham um papel essencial para a sobrevivência do organismo. Estas células sangüíneas da série branca são capazes de reconhecer, fagocitar, matar e eliminar a maioria dos agentes patogênicos que invadem o hospedeiro (MAYER-SCHOLL; AVERHOFF; ZYCHLINSKY, 2004).

Os neutrófilos foram descobertos por Paul Ehrlich em 1956 (apud BORREGAARD; COWLAND, 1997), quando as técnicas de fixação e coloração celulares tornaram possíveis identificar os núcleos lobulados e os grânulos citoplasmáticos característicos de tais células. A granulação neutrofílica, que se refere à coloração dos grânulos através da utilização de corantes neutros, deu origem ao nome “neutrófilo” (BORREGAARD; COWLAND, 1997).

Estas células são geradas a partir de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes da medula óssea e seus estágios morfológicos de maturação incluem mieloblasto, promielócito, mielócito, metamielócito, bastonetes e finalmente neutrófilos segmentados. Morfologicamente, os neutrófilos são distinguidos das outras células por possuírem um núcleo multi-lobulado e grânulos em abundância no citoplasma, os quais contêm diferentes grupos de moléculas citotóxicas, como proteases, que atuam na degradação do patógeno (Figura 1.1) (ZYCHLINSKY; WEINRAUCH; WEISS, 2003).

Figura 1.1. Neutrófilo com morfologia característica, apresentando núcleo multilobulado e granulação citoplasmática. Adaptado de Lekstrom-Himes e Gallin (2000).

Na corrente sanguínea, os neutrófilos constituem cerca de 50 a 70% do total de leucócitos circulantes, e são recrutados para os sítios de infecção por sinais quimiotáticos de quimiocinas, citocinas, metaloproteinases da matriz extracelular, produtos dos microrganismos invasores, entre outros (KOBAYASHI; VOYICH; DELEO, 2003). Ao receber o

sinal, essas células deixam de circular ao acaso e seguem o gradiente quimioatraente que se forma em direção ao sítio de invasão do patógeno (KLEIN, 1990). Inicialmente, ocorrem interações transitórias entre moléculas de adesão das famílias das selectinas, presentes no endotélio e no neutrófilo, que promovem o seu rolamento pela parede do vaso sanguíneo adjacente ao sítio de inflamação. Após firme adesão, o neutrófilo realiza um processo denominado diapedese, no qual ele migra entre as células endoteliais para alcançar o sítio de infecção extravascular (DALLEGRI; OTTONELLO, 1997; BURG; PILLINGER, 2001; LIU et al., 2004).

Ao encontrar o patógeno, o neutrófilo o engloba em um fagossoma, por meio de um processo denominado fagocitose. Em seguida, ocorre a fusão do fagossoma com grânulos citoplasmáticos, seguida pela desgranulação, formando o fagolisossoma. Dentro deste, o microrganismo é degradado por peptídeos antimicrobianos e espécies reativas de oxigênio (EROs), que compõem o arsenal microbicida independente e dependente de oxigênio, respectivamente (MAYER-SCHOLL; AVERHOFF; ZYCHLINSKY, 2004).

1.1.1. Mecanismo oxidativo

As EROs são moléculas altamente reativas devido à presença de um elétron não-pareado na última camada. Esta característica torna essas moléculas potentes agentes oxidantes, que atuam em conjunto com os constituintes dos grânulos para matar e digerir os agentes fagocitados (ZYCHLINSKY; WEINRAUCH; WEISS 2003).

O mecanismo microbicida oxidativo inicia-se pela produção do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pelo complexo enzimático da NADPH oxidase, através do processo denominado explosão respiratória, descrito pela primeira vez no final da década de 50 (SBARRA; KARNOVSKY, 1959).

Para prevenir destruição dos tecidos com a produção das EROs, a atividade da NADPH oxidase deve se manifestar, preferencialmente, de forma regional, temporária e restrita ao interior do fagossoma. Um tipo de regulação da atividade enzimática que evita o aparecimento desses danos colaterais é a separação das subunidades da enzima em diferentes compartimentos subcelulares (citossol e membrana plasmática) durante o estado de repouso das células fagocíticas (BABIOR, 1999).

Em neutrófilos não estimulados, o complexo enzimático NADPH oxidase está dormiente e dissociado, com componentes presentes tanto no citossol ($p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$) na forma de um complexo, quanto na membrana de vesículas secretórias e grânulos

específicos (gp91^{phox} e p22^{phox}), onde se encontram como uma flavohemoproteína heterodimérica conhecida como citocromo b558 (chamado assim devido ao seu pico de absorvância em 558 nm) (Figura 1.2.A) (BABIOR; LAMBETH; NAUSEEF, 2002; DE COURSEY; LIGETI, 2005).

A ativação da explosão respiratória envolve profundas mudanças de localização e atividade de diferentes componentes do complexo enzimático NADPH oxidase. Quando as células em repouso são expostas a estímulos, o complexo citosólico é fosforilado e migra para a membrana, onde se associa com o citocromo b558. A ativação do complexo enzimático requer ainda a participação de uma proteína de baixo peso molecular: Rac2 (em neutrófilos), que nas células em repouso se localiza no citoplasma em um complexo dimérico com Rho-GDI (Guanine, nucleotide Dissociation Inhibitor). Durante a ativação a Rac2 se dissocia de Rho-GDI, liga-se à guanosina trifosfato (GTP), e migra para a membrana onde participa da montagem e completa ativação da NADPH oxidase, tornando-a capaz de transferir os elétrons do substrato para o oxigênio (Figura 1.2.B) (BABIOR, 1999; BRIGAGÃO; BARROSO; COLEPICOLO, 2000; BABIOR; LAMBETH; NAUSEEF, 2002; BERGENDI et al., 1999).

Estudos indicam ainda que a regulação da montagem e estabilização da NADPH oxidase presente nos neutrófilos depende do citoesqueleto, de forma que os processos de polimerização e despolimerização da actina possuem um papel importante na ativação deste complexo enzimático (BENGTSSON; ORSELIUS; WETTERÖ, 2006).

Na sua forma ativa, o complexo da NADPH oxidase é capaz de transportar elétrons do NADPH no sítio citoplasmático para o O₂ no fluido extracelular ou no espaço intrafagossômico para formar O₂^{•-} (reação 1). Além disso, a produção de O₂^{•-} é acompanhada por um aumento abrupto do consumo de O₂ não relacionado à respiração celular, aumento da velocidade de síntese de NADPH pela via de hexose-monofosfato e mudança do potencial de membrana (LEUSEN; VERHOEVEN; ROOS, 1999).

O complexo enzimático da NADPH oxidase opera tanto com NADPH ($K_M \cong 30 \mu\text{mol/L}$), quanto com NADH ($K_M \cong 200 \mu\text{mol/L}$) como doadores de elétrons (BABIOR, 1992). A alta afinidade ($K_M \cong 10 \mu\text{mol/L}$) pelo O₂, o aceitor final de elétrons na reação, permite confirmar que este complexo produz O₂^{•-} nas baixas tensões de O₂ que prevalecem

nas células de tecidos aeróbicos infectadas por agentes invasores (BABIOR; LAMBETH; NAUSEEF, 2002; BABIOR, 2004).

Figura 1.2. Ilustração dos componentes pertencentes a NADPH oxidase na célula em repouso (A), e ilustração dos processos de ativação do complexo enzimático após interação com o estímulo zimosan opsonizado (ZIops) (B). Figura modificada de Cathcart (2004).

A importância deste sistema enzimático é claramente mostrada nos pacientes portadores de doença granulomatosa crônica, nos quais a produção de $O_2^{\bullet-}$ é ausente ou diminuída em relação a indivíduos saudáveis. A susceptibilidade a alguns tipos de infecções sofrida por esses pacientes ressalta a importância da produção de EROs para a eliminação de patógenos pelos neutrófilos (MAYER-SCHOLL; AVERHOFF; ZYCHLINSKY, 2004). Esta doença é atribuída a mutações autossômicas ou ligadas ao cromossomo X.

Embora o $O_2^{\bullet-}$ produzido pela NADPH oxidase seja um oxidante fraco e incapaz de atravessar membranas, ele pode ser dismutado pela enzima superóxido dismutase (SOD), produzindo H_2O_2 (reação 2), o qual pode ser utilizado como substrato para a produção de

outras EROs (Figura 1.3) e/ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs) mais efetivas como microbicidas, tais como $\text{HO}^\bullet$, HOCl e ONOO^- (reações 3 a 8) (BABIOR, 2000; BRIGAGÃO; BARROSO; COLEPICOLO, 2000).

Figura 1.3. Produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos, onde se ressalta NADPH como doador citossólico de elétrons para o sistema NADPH oxidase que produz $\text{O}_2^{\bullet-}$ no fagossoma. Os neutrófilos sintetizam H_2O_2 por ação da enzima superóxido dismutase (SOD) a partir de duas moléculas de $\text{O}_2^{\bullet-}$. Na presença de Cl^- , a mieloperoxidase (MPO) converte o H_2O_2 em HOCl , que é um poderosíssimo oxidante. Adaptado de Hampton, Kettle e Winterbourn (1998).

A reação do H_2O_2 com o íon Fe^{2+} forma outro composto reativo, o radical $\text{HO}^\bullet$ (reação 3). Entretanto, na presença de moléculas específicas, o H_2O_2 pode dar origem a outras moléculas altamente reativas (KLEBANOFF, 2005). Um importante composto é o ácido hipocloroso (HOCl) (reação 4), que é formado pela enzima mieloperoxidase (MPO), na presença de íons Cl^- .

O H_2O_2 formado pode ser convertido em água e O_2 , por ação da enzima catalase presente no citoplasma (reação 5). O H_2O_2 pode também oxidar a glutathiona (GSH), formando água, por ação da enzima glutathiona peroxidase (reação 6).

A forma reduzida da glutathiona (GSH) é regenerada por ação da enzima glutathiona redutase (reação 7).

O oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) pode ser formado nos neutrófilos pela reação entre o H_2O_2 e um halogênio oxidado (reação 8) e sendo importante para a morte de microrganismos fagocitados (KANOVSKY et al., 1984).

Sabe-se que as EROs e ERNs podem ser geradas no organismo no processo metabólico em condições fisiológicas, devido a estímulos ambientais ou durante o metabolismo oxidativo de células fagocitárias numa inflamação. Embora, teoricamente, elas possam aparecer em todos os tipos celulares como consequência de radiação, lesão por reperfusão, metabolismo de agentes farmacológicos, ou durante o transporte de elétrons na

mitocôndria, apenas os fagócitos possuem uma maquinaria complexa para produzir ativamente e excretar grandes quantidades dessas espécies reativas (NATHAN, 2006).

Apesar dos fagócitos possuírem outros mecanismos microbicidas, como os peptídeos e enzimas antimicrobianas, a geração das EROs e do ácido hipocloroso durante a fagocitose é considerado o mecanismo crítico na destruição da maioria dos patógenos invasores (DALE; BOXER; LILES, 2008).

1.1.2. Mecanismo não-oxidativo

Além dos mecanismos microbicidas dependentes de oxigênio, ou seja, aqueles relacionados ao metabolismo oxidativo, os neutrófilos são dotados de mecanismos independentes de oxigênio, os quais são realizados pelos constituintes dos diferentes subtipos de grânulos citoplasmáticos. Esses grânulos são gerados durante a maturação dos neutrófilos e possuem várias fases de desenvolvimento, sendo que cada fase se caracteriza pela produção de diferentes componentes microbicidas (MOLLINEDO et al., 1999; BURG; PILLENGER, 2001).

Os grânulos dos neutrófilos podem ser classificados em: azurofílicos ou primários; específicos ou secundários; de gelatinase ou terciários; e vesículas secretoras. A segregação dos constituintes dos diferentes grânulos reflete o estágio de maturação em que eles são produzidos, sendo que proteínas sintetizadas durante o mesmo período são co-localizadas. Esta divisão é importante para evitar o risco de degradação dos constituintes do grânulo devido à mistura de diferentes proteases ativas (PHAM, 2006).

Os grânulos azurofílicos são produzidos primeiramente e contêm proteínas e peptídeos que atuam na morte e digestão microbiana. Seus principais componentes são: MPO, proteinases como elastase, catepsina G e proteinase 3, proteínas que aumentam a permeabilidade bacteriana, defensina e lisozima (GANZ, 2003; GARWICZ et al., 2005). Essas moléculas rompem a superfície aniônica dos microrganismos e degradam proteínas bacterianas, inclusive fatores de virulência (MAYER-SCHOLL et al., 2004).

Os grânulos secundários possuem: lactoferrina (capaz de quelar ferro e cobre), grandes quantidades de lisozima, proteínas presentes na membrana plasmática, incluindo flavocitocromo b558 do complexo NADPH-oxidase (BULLEN; ARMSTRONG, 1979; SEGAL; JONES, 1979). Os grânulos terciários armazenam grandes quantidades de gelatinase, e se diferenciam dos grânulos específicos por não possuírem lactoferrina (HIBBS; BAINTON, 1989). Finalmente, as vesículas secretórias são reservatórios de componentes de membrana como

receptores de complemento (SENGELOV et al., 1994), flavocitocromo b558, CD11b, CD14, CD16 e receptor de formilpeptídeo (SEGAL, 2005).

O englobamento de microrganismos induz a formação do fagossomo, com conseqüente fusão de grânulos, seguida pela liberação de substâncias microbicidas dentro do mesmo, causando a morte do patógeno (PHAM, 2006). A existência de diferentes mecanismos efetores, dependentes e independentes de oxigênio, confere aos neutrófilos uma maior eficácia na eliminação de patógenos, permitindo que falhas em algum mecanismo sejam compensadas, pelo menos em parte, por outro. Isso pode ser comprovado pelo fato de que alguns pacientes com doença granulomatosa crônica permanecem livres de infecção por vários anos (SEGAL, 2005).

1.1.2.1 Enzima elastase

A elastase é uma serino-protease produzida por monócitos, mastócitos, e principalmente por neutrófilos, onde ela é armazenada nos grânulos azurófilos. A sua síntese ocorre durante o estágio promielócito de diferenciação do neutrófilo na medula. A enzima ativa é armazenada nos grânulos até ser exocitada dentro do fagolisossomo ou para fora da célula, por secreção regulada em resposta a vários estímulos (GARWICZ et al., 2005; CHUA; LAURENT, 2006; PHAM, 2006).

Fisiologicamente, a elastase está envolvida na degradação de materiais estranhos fagocitados, e é considerada uma molécula efetora chave no sistema imune inato, com potente atividade contra bactérias e fungos (BELAAOUAJ et al., 1998; TKALCEVIC et al., 2000; BRINKMANN et al., 2004). Porém, sob intensa ativação celular, esta enzima é rapidamente liberada no espaço extracelular, onde pode também matar patógenos ali presentes (BRINKMANN et al., 2004). A elastase secretada pode também degradar proteínas da matriz extracelular local, remodelar tecido danificado, além de facilitar a migração do neutrófilo através do tecido, durante a diapedese, em direção aos sítios de inflamação (DALLEGRI; OTTONELLO, 1997).

Dentre os componentes da matriz extracelular que podem ser alvos de sua ação enzimática estão uma variedade de ligantes de superfície celular, proteínas solúveis e moléculas de adesão. A elastase é capaz de digerir praticamente todos os tipos de proteínas da matriz, incluindo alguns tipos de colágeno, fibronectina, proteoglicanas e fibras de elastina (CHUA; LAURENT, 2006; SCHORR et al., 2005). A secreção de elastase também modula a expressão de citocinas na superfície endotelial e epitelial, induzindo a produção de citocinas

como interleucina-6 e -8 (IL-6 e IL-8), fator β de transformação e crescimento (TGF- β) e fator de estimulação de colônia de granulócitos/macrófagos (GM-CSF), enquanto promove a degradação de citocinas como interleucina-1 e -2 (IL-1 e IL-2) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) (WIEDOW; MEYER-HOFFERT, 2005; FITCH et al., 2006).

Neutrófilos de animais deficientes em enzima elastase demonstraram um maior número de bactérias intactas dentro de seus fagossomas, quando comparados com neutrófilos de animais selvagens. Além disso, Weinrauch et al. (2002) demonstraram que esta enzima é capaz de clivar fatores de virulência de enterobactérias como *Salmonella entérica*, *Shigella flexneri* e *Yersinia enterocolitica*.

Entretanto, em processos inflamatórios crônicos como em enfisema pulmonar, glomerulonefrite e artrite reumatóide, a elastase favorece a inflamação, e é considerada uma das principais enzimas responsáveis pela destruição tecidual. Desta forma, esta enzima parece ser um importante alvo para a terapia de doenças inflamatórias crônicas (SMEDLY et al., 1986; BEYER; MELZIG, 2005).

A liberação da elastase pode ser desencadeada pela presença de diferentes estímulos como citocinas, endotoxinas, fator de agregação plaquetária (PAF) e fMLP (SCHORR et al., 2005). Entretanto, em condições fisiológicas, a presença de elastase no espaço extracelular é controlada por inibidores endógenos, como α 1-antiprotease, inibidor de protease secretória de leucócitos (SLPI), α 2-macroglobulina, e “eglin” (JOHANSON et al., 2002; FITCH et al., 2006).

1.1.3. Agentes estimuladores das funções efetoras dos neutrófilos

Uma grande variedade de agentes é capaz de estimular o complexo enzimático da NADPH oxidase em neutrófilos e macrófagos em sistemas *ex vivo*, tanto substâncias solúveis quanto particuladas. Entre as primeiras incluem-se os peptídeos quimiotáticos, como o formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) e os ésteres de forbol, como o forbol 12-miristato-13-acetato (PMA). Dentre os particulados incluem bactérias, leveduras e complexos antígeno/anticorpo opsonizados por componentes do sistema complemento (Figura 1.4) (ANDREWS; BABIOR, 1984; STRNAD; PARENTE; WONG, 1986; BRIGAGÃO; COLEPICOLO, 1996; BRIGAGÃO; BARROSO; COLEPICOLO, 2000).

Figura 1.4. Vias de sinalização celular que levam à liberação de $O_2^{\bullet-}$ por neutrófilos, estimulados por diferentes agentes, forbol 12-miristato-13-acetato (PMA), formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) e zimosan opsonizado (Zlps). Adaptado de Caldefie-Chézet et al. (2004) e Regier et al. (2000).

O tripeptídeo fMLP foi uma das primeiras substâncias estudadas como capaz de desencadear a explosão respiratória em neutrófilos, revelando muitas informações sobre a relação estrutura-atividade de substâncias quimiotáticas. O fMLP é um fator produzido por bactérias, que é capaz de ativar quase todas as funções fisiológicas do neutrófilo (MARASCO et al., 1984). Seus efeitos são disparados por meio da ligação aos receptores de formilpeptídeos (FPR), que são receptores clássicos acoplados à proteína G, caracterizados por possuírem sete segmentos transmembrânicos hidrofóbicos (LIU et al., 2004). Dentre os efeitos promovidos pelo fMLP, estão a indução do aumento de cálcio intracelular e da atividade da proteína quinase C (PKC), que estão diretamente relacionados com os mecanismos de desgranulação e de produção de EROs (ANDERSSON et al., 1987).

A fosforilação de diferentes proteínas de neutrófilos, causada pela ação de fMLP, mostrou-se como essencial para a explosão respiratória desencadeada por este agente quimiotático. Fagócitos polimorfonucleares originados de focos inflamatórios peritoneais de cobaias mostraram aumento de fosforilação de duas proteínas citossólicas de 47 e 49 kDa, isoformas de $p47^{phox}$. Este evento é considerado o sinalizador para a montagem do complexo enzimático da NADPH oxidase, corroborado pelo fato de que a defosforilação das mesmas foi acompanhada pelo decréscimo da produção de $O_2^{\bullet-}$ pelos neutrófilos (BADWEY; HEYWORTH;

KARNOVSKY, 1989; HEYWORTH; KARNOVSKY; BADWEY, 1989).

Outro agente estimulador capaz de disparar a explosão respiratória em células fagocitárias através da ativação direta da PKC é o PMA (EDWARDS, 1996). Esta ativação determina que a PKC fosforile resíduos de serina e treonina em uma vasta gama de substratos protéicos (HEYWORTH; BADWEY, 1990). A fosforilação de outras proteínas citossólicas foi também relacionada como essencial para a explosão respiratória, desencadeada por PMA.

Em neutrófilos de sangue periférico humano estimulados com PMA, mostrou-se a fosforilação de diferentes proteínas, tanto presentes no citossol (20 kDa), quanto presentes no citossol e na membrana plasmática (11, 13, 48, 53-58, 69 e 80 kDa). Esta fosforilação é extremamente rápida, em torno de 3 a 5 minutos após a adição de PMA, evento associado com a rápida produção de $O_2^{\bullet-}$ pelos fagócitos estimulados (ANDREWS; BABIOR, 1984).

Dentre os estímulos particulados capazes de ativar o complexo enzimático da NADPH oxidase para a produção de $O_2^{\bullet-}$ por fagócitos, pode-se citar bactérias e leveduras opsonizadas, que atuam através da porção C3b e, possivelmente, a porção C5a, provenientes da ativação da via do complemento (SALYERS; WHITT, 1994). O zimosan opsonizado (ZIops) é um dos estímulos classicamente utilizado para se estudar este modelo (MESHULAM et al., 1988).

O Zimosan é um polissacarídeo da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, que quando opsonizado, ou seja, recoberto com anticorpos e componentes do sistema complemento (C3b, C3bi), mimetiza um microrganismo (REMOLD-O'DONNELL; PARENT, 1995). O zimosan opsonizado (ZIops) é um estímulo particulado que induz a fagocitose e ativa a explosão respiratória nos neutrófilos através de receptores de complemento (CR), de imunoglobulinas ($Fc\gamma R$) e de manose (lectinas) (PAVELKOVA; KUBALA, 2004; KIM, et al., 2004). A estimulação pelo ZIops leva à ativação de fosfolipase A_2 (PLA_2), que produz ácidos graxos insaturados como o ácido araquidônico e também de fosfolipase C (PLC), que leva a ativação de PKC (MARIDONNEAU-PARINI, et al., 1986; MUKHERJEE, et al., 1994).

De acordo com Cabanis e colaboradores (1996), tanto a produção de ácido araquidônico, quanto a ativação de PKC estão envolvidas na ativação da NADPH oxidase pelo ZIops, sendo que o ácido araquidônico está relacionado com a reunião dos componentes de complexo e PKC com a fosforilação dos mesmo. Alguns autores comprovaram a participação de fosfolipase D (PLD) na ativação via ZIops. Uma vez ativada, esta fosfolipase catalisa a hidrólise de fosfatidilcolina para produzir ácido fosfatídico que, por sua vez, ativa proteínas quinase que também são capazes de fosforilar componentes da NADPH oxidase (REGIER, 2000).

1.1.4. Neutrófilos e lesão tecidual

Os radicais livres, ao reagirem com moléculas que não possuem elétrons não pareados, podem formar outros radicais secundários, que também podem ser reativos, gerando outros radicais, o que acarreta uma reação em cadeia. Isso forma uma grande variedade de compostos reativos e, assim como as espécies primárias, esses são importantes para degradar o patógeno fagocitado, mas também podem reagir com moléculas do hospedeiro (BABIOR, 2000).

Durante a fagocitose, são ativados processos citotóxicos e seus produtos são liberados dentro dos fagossomas, sendo que há pouca ou nenhuma liberação extracelular desses agentes. Entretanto, em contraste com esta produção intracelular e moderada das moléculas tóxicas, em algumas condições, principalmente em situações de intensa ativação celular, os neutrófilos podem liberar ativamente grandes quantidades de EROs e os conteúdos dos grânulos no espaço extracelular (DALLEGRI; OTTONELLO, 1997; FOSSATI; BUCKNALL; EDWARDS, 2007).

Um dos constituintes dos grânulos de neutrófilos é a enzima elastase, conhecida por ser uma serino protease com atividade antimicrobiana (BELAAOUAJ; KIM; SHAPIRO, 2000) e antifúngica (TKALCEVIC et al., 2000). Esta enzima pode alcançar o espaço extracelular, onde sua atividade é controlada por inibidores endógenos como α -1-antitripsina, SLPI e “elafin” (JOHANSON et al., 2002; FITCH et al., 2006). A ação desses inibidores é fundamental, pois a elastase não é específica para moléculas dos patógenos, podendo degradar macromoléculas do tecido hospedeiro como elastina, fibronectina, proteoglicanas e proteínas do plasma (FOOK et al., 2005; LEE; DOWNEY, 2001).

Sabe-se que a atividade proteolítica da elastase causa destruição tecidual (KAWABATA; HAGIO; MATSUOKA, 2002). Além disso, essa enzima está envolvida em numerosas doenças respiratórias inflamatórias incluindo enfisemas (COAKLEY et al., 2001), fibrose cística (TIROUVANZIAM 2006), doença pulmonar obstrutiva crônica (LAPPERRE et al., 2007) e fibrose pulmonar (CHUA et al., 2007). Devido aos efeitos deletérios da elastase neutrofílica, há um forte interesse no desenvolvimento de inibidores sintéticos potentes e seletivos para esta enzima (REID; SALLENAVE, 2001; TREMBLAY; JANELLE; BOURBONNAIS, 2003). Para tais estudos, têm sido utilizados estímulos solúveis como citocinas, endotoxinas, PAF e fMLP, para induzir a liberação da elastase pelos neutrófilos (SCHORR et al., 2005).

Além dos componentes dos grânulos, as EROs produzidas por neutrófilos têm efeitos fisiológicos benéficos, relacionados à proteção contra microrganismos invasores, mas também

podem apresentar efeitos deletérios no organismo quando produzidas em excesso. Estes efeitos negativos das EROs podem ser observados em diferentes tipos de doenças, tais como: inflamação crônica (artrite reumatóide, vasculite, glomerulonefrite, outras doenças auto-imunes), doenças do sistema cardiovascular (arteriosclerose, isquemia miocárdia, lesão induzida por reperfusão, alguns tipos de alveolite por imunocomplexo), neurodegenerativas (esclerose múltipla, mal de Parkinson, Alzheimer), além de câncer, lesões hepáticas e doença pulmonar obstrutiva crônica (AMES; SHIGENAGA; HAGEN, 1993; WITZUM, 1994; ROY; KULKARNI, 1996; STAHL; SIES, 1997; SIMÕES et al., 2004; ATOUI et al., 2005; FITCH et al., 2006).

As EROs, tais como $\text{HO}^\bullet$, $\text{O}_2^{\bullet-}$ e hidroperóxil, podem oxidar ácidos nucléicos, lipídios, proteínas, carboidratos e vitaminas presentes nas células (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Os danos no ácido desoxirribonucleico (DNA) causados pelos radicais livres desempenham um papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (POULSEN; PRIEME; LOFT, 1998). As EROs atacam as cadeias de ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios e do colesterol, abstraindo um hidrogênio do grupo metileno, iniciando assim o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares. Os radicais de carbono formados podem reagir com O_2 originando radicais peróxil, que por sua vez podem atacar novas cadeias de ácidos graxos poliinsaturados, propagando a reação. O resultado deste processo é a oxidação de várias moléculas de ácidos graxos (EL-AGAMEY et al., 2004; VALKO et al., 2004).

A presença de EROs no espaço extracelular é controlada por moléculas antioxidantes, como forma de impedir que estes compostos reativos causem danos ao tecido hospedeiro. Essas moléculas previnem a formação ou seqüestram os radicais livres, interrompendo as reações de propagação em cadeia. Dentre os antioxidantes endógenos estão: glutathione, NADPH, coenzima Q (ubiquinona), ácido úrico e certas enzimas como SOD, catalase e glutathione peroxidase. Proteínas ligantes de metais como albumina, metalotioneína, ceruloplasmina e transferrina também são considerados antioxidantes. Entre os antioxidantes dietéticos estão tocoferol, ácido ascórbico, carotenóides, compostos fenólicos e flavonóides (HALLIWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992; MEYDANI et al., 1994). Quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo. Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células (ATOUI et al., 2005; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Diante dos problemas causados pela produção e liberação excessiva de moléculas citotóxicas pelos neutrófilos, existe uma busca contínua por reguladores das funções efectoras desta célula, para que novos fármacos com atividades antiinflamatória e antioxidante sejam produzidos (CABANIS et al., 1996; FOOK et al., 2005). Estudos com produtos naturais têm

demonstrado resultados satisfatórios, e muitas substâncias com efeitos sobre o metabolismo oxidativo e sobre a liberação de elastase já foram identificadas. Os efeitos dessas substâncias podem estar relacionados com vários mecanismos, como captura (“scavenger”) de radicais livres, inibição de proteases, além de modulação direta sobre os neutrófilos, como por exemplo, de receptores para agonistas ou de vias de sinalização intracelular (BERGENDI et al., 1999).

1.2. Cumarinas

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos (SOARES, 2002). A atividade antioxidante desses compostos deve-se, principalmente, às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou captura de radicais livres, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (HASLAM, 1996; SOARES, 2002; CHUN et al., 2005). Os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóicos e cinâmico), cumarinas, flavonóides, taninos, lignanas e ligninas (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Recentemente, o envolvimento de espécies oxidantes e enzimas liberadas por neutrófilos na fisiopatologia de doenças inflamatórias tem atraído o interesse científico para a descoberta de novos compostos com propriedades antioxidantes e modulatórias sobre as funções efetoras dos neutrófilos. Dentre as classes de compostos fenólicos, as cumarinas e flavonóides têm se mostrado promissores no desempenho de ambas as funções (DOUCET et al., 1999; MIDDLETON JÚNIOR et al., 2000; KABEYA et al., 2002; VUOTTO, et al., 2003; KANASHIRO et al., 2004, 2007; MOREIRA et al., 2007).

As cumarinas compreendem um grupo de compostos fenólicos naturais encontrados em uma variedade de plantas (KANEKO; BABA; MATSUO, 2003). Entretanto, elas podem ocorrer também, embora raramente, em bactérias e fungos. Como exemplos podem-se citar as aflatoxinas, produzidas por *Aspergillus* sp (HOULT; PAYÁ, 1996) e os antibióticos novobiocina, clorobicina e coumermicina A, produzidos por várias espécies de *Streptomyces* (KAWASE et al., 2001).

As cumarinas são extremamente variáveis em sua estrutura, suas substituições podem ocorrer em qualquer um dos sítios disponíveis de sua estrutura molecular básica (1,2-benzopirona) (Figura 1.5). Esta diversidade estrutural leva estes compostos a desempenharem múltiplas propriedades biológicas que podem ajudar a reduzir os riscos de doenças (BEILLEROT et al., 2007).

Figura 1.5. Estrutura química básica dos compostos da classe das cumarinas. A estrutura representada acima corresponde também ao composto mais simples dessa classe, chamado cumarina.

Muitas cumarinas têm odor adocicado, e são comercialmente utilizadas como aromatizantes em produtos cosméticos, produtos de limpeza, bebidas alcoólicas e alimentos industrializados (LAKE, 1999). Como produto farmacêutico, a cumarina (derivado mais simples dessa classe) é comercializada em associação com a heparina ou a tri-hidroxietil-rutina (Venalot[®]) para o tratamento de varizes (P. R., 2004), e está em fase de triagem clínica para o tratamento de carcinomas pulmonares, renais e de próstata (FELTER et al., 2006). Os derivados furanocumarínicos 8-metoxipsoraleno (metoxsaleno) e 2,5,8-trimetilpsoraleno (trioxsaleno) são comercializados nos Estados Unidos, sendo utilizados para o tratamento de vitiligo e psoríase (GUZZO; LAZARUS; WERTH, 1996). Entretanto, o uso das furanocumarinas está relacionado à incidência crescente de câncer de pele, o que lhes confere toxicidade. Por isso, sua utilização necessita de uma avaliação risco-benefício rigorosa.

Na área de medicamentos destacam-se ainda os anticoagulantes orais derivados da 4-hidroxycumarina, como o dicumarol, a varfarina, a femprocumona e o acenocumarol, amplamente empregados na terapêutica de doenças tromboembólicas (MAJERUS et al., 1996). A propriedade anticoagulante do dicumarol foi descoberta durante a investigação de uma doença hemorrágica no gado alimentado com trevo-de-cheiro amarelo fermentado (*Melilotus officinalis* Lam.), nas planícies do Canadá (MAJERUS et al., 1996). Este composto foi o protótipo para o desenvolvimento da classe de anticoagulantes orais com o núcleo básico da 4-hidroxycumarina, a partir da qual foi sintetizada a varfarina sódica, no ano de 1948 (BARREIRO; FRAGA; ARAÚJO JUNIOR, 2004).

Sabe-se que algumas cumarinas possuem atividades antiviral e antibacteriana (SIDDIQUI et al., 2007), além de atividade antiinflamatória (FYLAKTAKIDOU et al., 2004; BUCOLO et al., 2008). Muitas cumarinas possuem capacidade antioxidante (RAMESH; PUGALENDI, 2006; THUONG, 2009), capturadora de $O_2^{\cdot-}$ e $HO^{\cdot}$ (PAYA; HALLIWELL; HOULT, 1992; PAYA et al., 1994; KIM et al., 2008), e inibem ambas as vias lipoxigenase e cicloxigenase do metabolismo do ácido araquidônico (HOULT; MORONEY; PAYÁ, 1994; GRIMM et al., 2006).

Para a 7-hidroxicumarina tem sido relatada a atividade antioxidante (PAYÁ; HALLIWELL; HOULT, 1992; PAYÁ et al., 1993; PAYÁ et al., 1994; CHANG et al., 1996; MARTÍN-ARAGÓN; BENEDI; VILLAR, 1996), antitumoral (KOFINAS et al., 1998; WEBER; STEFFEN; SIEGERS, 1998) e atividade antiproliferativa *in vitro* (KOSTOVA, 2005), que parece ser mediada pelo seu efeito de inibição de proteínas quinases (YANG et al., 1999), inibidora da penetração de cercárias de *Schistosoma mansoni* na pele (LOPES et al., 1980) e vasodilatadora (BACCARD et al., 2000).

A procura por medicamentos de origem vegetal tem conduzido a um renovado interesse farmacêutico pelas cumarinas, pelo fato dessas substâncias mostrarem atividades farmacológicas potentes e relevantes e serem de baixa toxicidade para mamíferos (HOULT; PAYÁ, 1996; BEILLEROT et al., 2008; LIN et al., 2008). Além da extração de princípios ativos de fontes naturais, a modificação da estrutura química de substâncias provenientes dessas fontes, associada a estudos de relação estrutura-atividade, é uma outra estratégia que tem sido utilizada para a descoberta de novos fármacos derivados de cumarinas (NICOLAIDES et al., 2004; KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2005; KABEYA et al., 2008). Assim, o assunto abordado neste trabalho é de grande importância na área da saúde humana, que vem chamando a atenção dos pesquisadores do mundo inteiro, de especial interesse quando se trata do estudo do potencial farmacológico de fitocompostos.

6. CONCLUSÕES

As conclusões obtidas foram:

- ❖ Tanto para neutrófilos estimulados por ZIops quanto por PMA, as cumarinas **C** e **D** foram as mais efetivas em inibir a QLlum e a QLluc, sendo seguidas pelas cumarinas **E**, **H**, **I** e **J**. A ordem de efeito dessas últimas variou conforme o modelo experimental utilizado. A cumarina **K** não teve efeito modulatório, nas condições avaliadas e as cumarinas **A**, **B**, **F** e **G**, apesar de inibirem a QLluc, promoveram aumento da QLlum (100 µmol/L). Os efeitos das cumarinas sobre essa função efetora dos neutrófilos foi dependente da concentração.
- ❖ Para neutrófilos estimulados por ZIops, o efeito inibitório das cumarinas sobre a QLluc foi maior do que sobre a QLlum, tendo sido observada diferença estatisticamente significativa nas cumarinas **C**, **E** e **H**. Por outro lado, para neutrófilos estimulados por PMA, verificou-se que o efeito inibitório das cumarinas **C**, **D**, **E** e **H** sobre a QLlum foi significativamente maior do que sobre a QLluc.
- ❖ As cumarinas **C** e **D** tiveram atividade antioxidante semelhantes entre si frente ao radical livre DPPH, e este efeito foi significativamente maior do que o da cumarina **H**. As demais substâncias não tiveram efeito significativo.
- ❖ As cumarinas **A**, **B**, **E** e **G** inibiram o processo de desgranulação dos neutrófilos, na concentração avaliada (100 µmol/L), e as demais cumarinas não apresentaram efeito inibitório estatisticamente significativo.
- ❖ As onze cumarinas avaliadas não inibiram a atividade catalítica da enzima elastase.
- ❖ Dentro das condições experimentais empregadas, as cumarinas avaliadas não tiveram efeito tóxico sobre os neutrófilos humanos. Portanto, a citotoxicidade parece não estar envolvida no efeito modulatório das cumarinas sobre as funções efetoras dos neutrófilos avaliadas.

7. REFERÊNCIAS

ALLEN, R. C.; LOOSE, L. D. Phagocytic activation of a luminol-dependent chemiluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.69, n.1, p.245-252, 1976.

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, Washington DC, v.90, n.17, p.7915-7922, 1993.

ANDERSSON, T.; DAHLGREN, C.; LEW, P. D.; STENDAHL, O. Cell surface expression of fMet-Leu-Phe receptors on human neutrophils. Correlation to changes in the cytosolic free Ca^{2+} level and action of phorbol myristate acetate. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v.79, n.4, p.1226-1233, 1987.

ANDREWS, P. C.; BABIOR, B. M. Phosphorylation of cytosolic proteins by resting and activated human neutrophils. **Blood**, New York, v.64, n.4, p.883-890, 1984.

ANIANSSON, H.; STENDAHL, O.; DAHLGREN, C. Comparison between luminol- and lucigenin dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v.92, p.357-961, 1984.

ATOUI, A.K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, Barking, v.89, n.1, p.27-36, 2005.

BABIOR, B. M. The respiratory burst oxidase. **Advances in Enzymology**, New York, v.65, p.49-95, 1992.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, New York, v.93, n.5, p.1464-1475, 1999.

BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **American Journal of Medicine**, Marion, v.109, n.1, p.33-44, 2000.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase. **Current Opinion in Immunology**, London, v.16, p.42-47, 2004.

BABIOR, B. M.; LAMBETH, J. D.; NAUSEEF, W. The neutrophil NADPH oxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.397, n.2, p.342-344, 2002.

BACCARD, N.; MECHICHE, H.; NAZEYROLLAS, P.; MANOT, L.; LAMIABLE, D.; DEVILLIER, P.; MILLART, H. Effects of 7-hydroxycoumarin (umbelliferone) on isolated perfused and ischemic-reperfused rat heart. **Arzneimittel Forschung – Drug Research**, Aulendorf, v.50(II), n.10, p.890-896, 2000.

BADWEY, J. A.; HEYWORTH, P. G.; KARNOVSKY, M. L. Phosphorylation of both 47 and 49 kDa proteins accompanies superoxide release by neutrophils. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.158, n.3, p.1029-1035, 1989.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; ARAÚJO JUNIOR, J. X. Os usos de produtos naturais vegetais como matérias-primas vegetais para a síntese e planejamento de fármacos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p.147-210, 2004.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BEILLEROT, A.; DOMÍNGUEZ, J. -C. R.; KIRSCH, G.; BAGREL, D. Synthesis and protective effects of coumarin derivatives against oxidative stress induced by doxorubicin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, New York, v.18, p.1102-1105, 2008.

BELAAOUAJ, A. A.; MCCARTHY, R.; BAUMANN, M.; GAO, Z.; LEY, T. J.; ABRAHAM, S. N.; SHAPIRO, S. D. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. **Nature Medicine**, New York, v.14, n.5, p.615-618, 1998.

BELAAOUAJ, A.; KIM, K. S.; SHAPIRO, S. D. Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. **Science**, Washington, v.289, p.1185-1188, 2000.

BENGTTSSON, T.; ORSELIUS, K.; WETTERÖ, J. Role of the actin cytoskeleton during respiratory burst in chemoattractant-stimulated neutrophils. **Cell Biology International**, London, v.30, n.2, p.154-163, 2006.

BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVA, Z.; FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sciences**, Oxford, v.65, n.18, p.1865-1874, 1999.

BEYER, G.; MELZIG, M. F. Effects of propolis on hypoxanthine-xanthine oxidase-induced toxicity in cultivated human cells and on neutrophils elastase activity. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Japan, v.28, n.7, p.1183-1186, 2005.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.12, n.2, p.123-130, 1999.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by use of a stable free radical. **Nature**, New York, v.181, p.1199-1200, 1958.

BORREGAARD, N.; COWLAND, J. B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. **Blood**, New York, v.89, n.10, p.3503-3521, 1997.

BRAGA, P. C.; SASSO, M. D.; CULICI, M.; VERDUCCI, P.; VERSO, R. L.; MARABINI, L. Effect of metabolite I of erdosteine on the release of human neutrophil elastase. **Pharmacology**, Basel, v.77, p.150-154, 2006.

BRIGAGÃO, M. R. P. L.; BARROSO, A. S.; COLEPICOLO, P. Fluctuation of reactive oxygen species released by inflammatory cells. In: DRIESSCHE T. V. (ed). **The Redox State and Circadian Rhythms**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.177-191, 2000.

BRIGAGÃO, M. R. P. L.; COLEPICOLO, P. Oscillations in superoxide anion release by polymorphonuclear leukocytes and its inhibition by human saliva. **Biological Rhythm Research**, London, v.27, n.3, p.269-280, 1996.

BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; FAULER, B.; UHLEMANN, Y.; WEISS, D. S.; WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, Washington, v.303, n.5663, p.1532-1535, 2004.

BUCOLO, C.; MALTESE, A.; MAUGERI, F.; WARD, K. W.; BAIULA, M.; SPARTA, A.; SPAMPINATO, S. New coumarin-based anti-inflammatory drug: putative antagonist of the integrins $\alpha_L\beta_2$ and $\alpha_M\beta_2$. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v.60, p.1473-1479, 2008.

BULLEN, J. J.; ARMSTRONG, J. A. The role of lactoferrin in the bactericidal function of polymorphonuclear leucocytes. **Immunology**, Oxford, v.36, n.4, p.781-791, 1979.

BURG, N. D.; PILLINGER, M. H. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. **Clinical Immunology**, Orlando, v.99, n.1, p.7-17, 2001.

CABANIS, A.; GRESSIER, B.; BRUNET, C.; DINE, T.; LUYCKX, M.; CAZIN, M.; CAZIN, J. C. Effect of the protein kinase C inhibitor GF 109 203X on elastase release and respiratory burst of human neutrophils. **General Pharmacology**, Bristol, v.27, n.8, p.1409-1414, 1996.

CAI, Y. Z.; MEI, S.; JIE, X.; LUO, Q.; CORKE, H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. **Life Sciences**, Oxford, v.78, p.2872-2888, 2006.

CALDEFIE-CHÉZET, F.; GUERRY, M.; CHALCHAT, J. C.; FUSILLIER, C.; VASSON, M. P.; GUILLOT, J. Anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human polymorphonuclear neutrophils and monocytes. **Free Radical Research Communication**, London, v.38, n.8, p.805-811, 2004.

CALDEFIE-CHÉZET, F.; WALRAND, S.; MOINARD, C.; TRIDON, A.; CHASSAGNE, J.; VASSON, M. -P. Is the neutrophil reactive oxygen species production measured by luminol and lucigenin chemiluminescence intra or extracellular? Comparison with DCFH-DA flow cytometry and cytochrome c reduction. **Clinica Chimica Acta**. v.319, p.9-17, 2002.

CATHCART, M. K. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. **Arteriosclerosis, thromboasis, and vascular biology**, New York, v.24, n.1, p.23-28, 2004.

CHANG, W. S.; LIN, C. C. ; CHUANG, S. C. ; CHIANG, H. C. Superoxide anion scavenging effect of coumarins. **American Journal of Chinese Medicine**, Garden City, v.24, n.1, p.11-17, 1996.

CHEUNG, K.; ARCHIBALD, A. C.; ROBINSON, M. F. The origin of chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by opsonized zymosan. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.130, p.2324-2339, 1983.

CHUA, F.; DUNSMORE, S. E.; CLINGEN, P. H.; MUTSAERS, S. E.; SHAPIRO, S. D.; SEGAL, A. W. Mice lacking neutrophils elastase are resistant to bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **The American Journal of Pathology**, v.170, p.65-74, 2007.

CHUA, F.; LAURENT, G. J. Neutrophil elastase: mediator of extracellular matrix destruction and accumulation. **Proceedings of the American Thoracic Society**. v.3, p.424-427, 2006.

CHUN, S. -S.; VATEM, D. A.; LIN, Y. -T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, Barking, v.40, p.809-816, 2005.

COAKLEY, R. J.; TAGGART, C.; O'NEILL, S.; McELVANEY, N. G. Alpha1-antitrypsin deficiency: biological answers to clinical questions. **The American Journal of the Medical Sciences**, Philadelphia v.321, p.33-41, 2001.

DAHLGREN, C.; STENDAHL, O. Role of myeloperoxidase in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. **Infection and Immunity**, Washington, v. 39, p.736-741, 1983.

DALE, D. C.; BOXER, L.; LILES, W.C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, New York, v.112, n.4, 2008.

DALLEGRI, F.; OTTONELLO, L. Tissue injury in neutrophilic inflammation. **Inflammation Research**, Basel, v.46, n.10, p.382-391, 1997.

DE COURSEY, T. E.; LIGETY, E. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. **Cellular and Molecular Life Science**, Basel, v.62, n.19, p.2173-2193, 2005.

DOUCET, C.; POCHET, L.; THIERRY, N.; PIROTTE, B.; DELARGE, J.; REBOUD-RAVAUX, M. 6-Substituted 2-oxo-2-H-1-benzopyran-3-carboxylic acid as a core structure for specific inhibitors of human leukocyte elastase. **Journal of Medicinal Chemistry**, Easton, v.42, p.4161-4171, 1999.

EDWARDS, S. W. The $O_2^{\cdot -}$ generating NADPH oxidase of phagocytes: structure and methods of detection. **Methods: a companion to methods in enzymology**, New York, v.9, n.3, p.563-577, 1996.

EL-AGAMEY, A.; LOWE, G. M.; MCGARVEY, D. J.; MORTENSEN, A.; PHILLIP, D. M.; TRUSCOTT, T. M.; YOUNG, A. J. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.430, n.1, p.37-48, 2004.

FELTER, S. P.; VASSALO, J. D.; CARLTON, B. D.; DASTON, G. P. A safety assessment of coumarin taking into account species-specificity of toxicokinetics. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 44, p. 462-475, 2006.

FITCH, P. M.; ROGHANIAN, A.; HOWIE, S. E. M.; SALLENAVE, J. M. Human neutrophils elastase inhibitors in innate and adaptive immunity. **Biochemical Society Transactions**, London, v.34, p.279-282, 2006.

FOOK, J. M. S. L. L.; MACEDO, L. L. P.; MOURA, G. E. D. D.; TEIXEIRA, F. M.; OLIVEIRA, A. S.; QUEIROZ, A. F. S.; SALES, M. P. A serine proteinase inhibitor isolated from *Tamarindus indica* seeds and its effects on the release of human neutrophil elastase. **Life Sciences**, Oxford, v.76, n.25, p.2881-2891, 2005.

FOSSATI, G.; BUCKNALL, R. C.; EDWARDS, S. W. Insoluble and soluble immune complexes activate neutrophils by distinct activation mechanisms: change in functional responses induced by priming with cytokines. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v.61, n.1, p.13-19, 2007.

FYLAKTAKIDOU, K.C.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.J.; LITINAS, K.E.; NICOLAIDES, D.N. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities. **Current Pharmaceutical Design**, Netherlands, v.10, p.3813-3833, 2004.

GANZ, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. **Nature Reviews. Immunology**, London, v.3, n.9, p.710-720, 2003.

GARWICZ, D. ; LENNARTSSON, A. ; JACOBSEN, S. E. W. ; GULLBERG, U.; LINDMARK, A. Biosynthetic profiles of neutrophil serine proteases in a human bone marrow-derived cellular myeloid differentiation model. **Haematologica**, Paiva, v.90, n.1, p.38-44, 2005.

GRIMM, E.L.; BRIDEAU, C.; CHAURET, N.; CHAN, C.-C.; DELORME, D.; DUCHARME, Y.; ETHIER, D.; FALGUEYRET, J.-P.; FRIESEN, R.W.; GUAY, J.; HAMEL, P.; RIENDEAU, D.; SOUCY-BREAU, C.; TAGARI, P.; GIRARD, Y. Substituted coumarins as potent 5-lipoxygenase inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v.16, p.2528-2531, 2006.

GUZZO, C. A.; LAZARUS, G. S.; WERTH, V.P. Farmacologia dermatológica. In: GOODMAN, L. S. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 9 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, p.1181-1197, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.26, n.2, p.501-514, 1986.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, London, v.119, n.6, p.598-620, 1992.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, New York, v.92, n.9, p.3007-3017, 1998.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.59, n.2, p.205, 1996.

HENSON, P. M. The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. I. The role of antibody and complement on nonphagocytosable surfaces or phagocytosable particles. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.107, n.6, p.1535-1546, 1971.

HEYWORTH, P. G.; BADWEY, J. A. Protein phosphorylation associated with the stimulation of neutrophils. Modulation of superoxide production by protein kinase C and calcium. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, Baltimore, v.22, n.1, p.1-26, 1990.

HEYWORTH, P. G.; KARNOVSKY, M. L.; BADWEY, J. A. Protein phosphorylation associated with synergistic stimulation of neutrophils. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.264, n.25, p.14935-14939, 1989.

HIBBS, M.S.; BAINTON, D.F. Human neutrophil gelatinase is a component of specific granules. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v.84, n.5, p.1395-402, 1989.

HIRAYAMA, A.; NORONHA-DUTRA, A.A.; GORDGE, M.P.; NEILD, G.H.; HOTHERSALL, J.S. Inhibition of neutrophil superoxide production by uremic concentrations of guanidine compounds. **Journal of the American Society of Nephrology**, Baltimore, v.11, p.684-689, 2000.

HOJO, M.; FUJITA, I.; HAMASAKI, Y.; MIYAZAKI, M.; MIYAZAKI, S. Erythromycin does not directly affect neutrophil functions. **Chest**, Chicago, v.105, p.520-523, 1994.

HOULT, J.R.S.; MORONEY, M.A.; PAYÁ, M. Actions of flavonoids and coumarins on lipoxygenase and cyclooxygenase. **Methods in Enzymology**, New York, v.234, p.443-454, 1994.

HOULT, J. R. S.; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. **General Pharmacology**, Bristol, v.27, n.4, p.713-722, 1996.

JANCAR, S.; CRESPO, M.S. Immune complex-mediated tissue injury: a multistep paradigm. **Trends in Immunology**, Oxford, v.26, n.1, p.48-55, 2005.

JOHANSSON, S.; GRANSSON, U.; LUIJENDIJK, T.; BACKLUND, A.; CLAESON, P.; BOHLIN, L. A Neutrophil multitarget functional bioassay to detect anti-inflammatory natural products. **Journal of Natural Products**, Washington, v.65, n.1, p.32-41, 2002.

JOHNSON, K.J.; VARANI, J.; SMOLEN, J.E. Neutrophil activation and function in health and disease. **Immunology series**, New York, v.57, p.1- 46, 1992.

KABEYA, L. M. **Estudo do efeito de cumarinas simples no metabolismo oxidativo de neutrófilos de coelho: aspectos metodológicos, avaliação da atividade e da sua relação com a toxicidade e com propriedades físico-químicas dos compostos.** 2002. 140f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração: Fármacos e Medicamentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

KABEYA, L. M.; KANASHIRO, A.; AZZOLINI, A. E. C. S.; SORIANI, F. M.; LOPES, J. L. C.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Inhibitory effect of eight simple coumarins on the lucigenin enhanced chemiluminescence of rabbit neutrophils. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, Westbury, v.111, nos.1-4, 2002.

KABEYA, L.M.; MARCHI, A.A.; KANASHIRO, A.; LOPES, N.P.; da SILVA, C.H.T.P.; PUPO, M.T.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Inhibition of horseradish peroxidase catalytic activity by new 3-phenylcoumarin derivatives: synthesis and structure-activity relationships. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, New York, v.15, n.3, p.1516-1524, 2007.

KABEYA, L. M.; SILVA, C. H. T. P.; KANASHIRO, A.; CAMPOS, J. M.; AZZOLINI, A. E. C. S.; POLIZELLO, A. C. M.; PUPO, M. T.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Inhibition of immune complex-mediated neutrophil oxidative metabolism: a pharmacophore model for 3-phenylcoumarin derivatives using GRIND-based 3D-QSAR and 2D-QSAR procedures. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v.43, p.996-1007, 2008.

KAHLER, C.P. Evaluation of the use of the solvent dimethyl sulfoxide in chemiluminescent studies. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, La Jolla, v.26, n.6, p.626-633, 2000.

KÁLDI, K.; SZEBERÉNYI, J.; RADA, B.K.; KOVÁCS, P.; GEISZT, M.; MÓCSAI, A.; LIGETI, E. Contribution of phospholipase D and a brefeldin A-sensitive ARF to chemoattractant-induced superoxide production and secretion of human neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v.71, n.4, p.695-700, 2002.

KANASHIRO, A.; SOUZA, J.G.; KABEYA, L.M.; AZZOLINI, A.E.C.S.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Elastase release by stimulated neutrophils inhibited by flavonoids: importance of the catechol group. **Zeitschrift für Naturforschung C**, Tübingen, v.62c, n.5-6, p.357-361, 2007. ISSN: 0939-5075.

KANASHIRO, A. KABEYA, L. M.; POLIZELLO, A. C. M.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Inhibitory Activity of Flavonoids from *Lychnophora* sp. on generation of reactive oxygen species by neutrophils upon stimulation by immune complexes. **Phytotherapy Research**, London, v.18, p.61-65, 2004.

KANEKO, T.; BABA, N.; MATSUO, M. Protection of coumarins against linoleic acid hydroperoxide-induced cytotoxicity. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v.142, p 239-254, 2003.

KANOVSKY, J. R.; WRIGHT, J.; MILES-RICHARDSON, G. E.; TAUBER, A. I. Biochemical requirements for singlet oxygen production by purified human myeloperoxidase. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v.74, n.4, p.1489-1495, 1984.

KAWABATA, K.; HAGIO, T.; MATSUOKA, S. The role of neutrophil elastase in acute lung injury. **European Journal of Pharmacology**, London, v.451, n.1, p.1-10, 2002.

KAWASE, M.; VARU, B.; SHAH, A.; MOTOHASHI, N.; TANI, S.; SAITO, S.; DEBNATH, S.; MAHAPATRA, S.; DASTIDAR, S. G.; CHAKRABARTY, A. N. Antimicrobial activity of new

coumarin derivatives. **Arzneimittel Forschung – Drug Research**, Aulendorf, v.51, n.1, p.67-71, 2001.

KIM, H.-J.; IL JANG, S.; KIM, J.-K.; CHUNG, H.-T.; YUN, Y.-G.; KANG, T.-H.; JEONG, O.-S.; KIM, Y.-C. Scopoletin suppresses pro-inflammatory cytokines and PGE2 from LPS-stimulated cell line, RAW 264.7 cells. **Fitoterapia**, Netherlands, v.75, p.261-266, 2004.

KIM, S.-H.; KANG, K.-A.; ZHANG, R.; PIAO, M.-J.; KO, D.-O.; WANG, Z.-H.; CHAE, S.-W.; KANG, S.-S.; LEE, K.-H.; KANG, K.-K.; KANG, H.W.; HYUN, J.-W. Protective effect of esculetin against oxidative stress-induced cell damage via scavenging reactive oxygen species. **Acta Pharmacologica Sinica**, Beijing, v.29, n.11, p.1319-1326, 2008.

KLEBANOFF, S.J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v.77, p.598-625, 2005.

KLEIN, J. **Immunology**. Boston: Blackwell Scientific Publications. Cap. 13, p.311-334: Defense reactions mediated by phagocytes, 1990.

KOBAYASHI, S. D.; VOYICH, J. M.; DELEO, F. R. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. **Microbes and Infection**, Paris, v.5, n.14, p.1337-1344, 2003.

KOFINAS, C.; CHINOU, I.; LOUKIS, A.; HARVALA, C.; ROUSSAKIS, C.; MAILLARD, M.; HOSTETTMANN, K. Cytotoxic coumarins form the aerial parts of *Tordylium apulum* and their effects on a non-small-cell bronchial carcinoma line. **Planta Medica**, Stuttgart, v.64, n.2, p.174-176, 1998.

KONTOGIORGIS, C.A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.J. Synthesis and anti-inflammatory activity of coumarin derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, Easton, v.48, p.6400-6408, 2005.

KOPPRASCH, S.; PIETZSCH, J.; GRAESSLER, J. Validation of different chemilumigenic substrates for detecting extracellular generation of reactive oxygen species by phagocytes and endothelial cells. **Luminescence**, Chichester, v.18, n.5, p.268-73, 2003.

KOSTOVA, I. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. **Current Medicinal Chemistry: Anti-Cancer Agents**, Hilversum, v.5, p.29-46, 2005.

KUBINYI, H. **QSAR: Hansch analysis and related approaches**. Weinheim, New York, v.1, 1993.

KUMAR, A.; SINGH, B.K.; TYAGI, R.; JAIN, S.K.; SHARMA, S.K.; PRASAD, A.K.; RAJ, H.G.; RASTOGI, R.C.; WATTERSON, A.C.; PARMAR, V.S. Mechanism of biochemical action of substituted 4-methylcoumarins. Part 11: comparison of the specificities of acetoxy derivatives of 4-methylcoumarin and 4-phenylcoumarin to acetoxy coumarins: protein transacetylase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, New York, v.13, p.4300-4305, 2005.

LAKE, B. G. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. **Food and Chemical Toxicology**, London, v.37, n.4, p.423-453, 1999.

LAPPERRE, T.S.; WILLEMS, L.N.; TIMENS, W.; RABE, K.F.; HIEMSTRA, P.S.; POSTMA, D.S.; STERK, P.J. Small airways dysfunction and neutrophilic inflammation in bronchial biopsies and BAL in COPD. **Chest**, Chicago, v.131, n.1, p.53-59, 2007.

LAUGHTON, M.; HALLIWELL, B.; EVANS, P. J.; HOULT, J. R. S. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin: effects on lipid peroxidation,

hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. **Biochemical Pharmacology**, Berlin, v.38, n.17, p.2859-2865, 1989.

LAUGHTON, M.; EVANS, P. J.; MORONEY, M. A.; HOULT, J. R. S.; HALLIWELL, B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives: relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. **Biochemical Pharmacology**, Berlin, v.42, n.9, p.1673-1681, 1991.

LEE, W. L.; DOWNEY, G. P. Leukocyte elastase physiological functions and role in acute lung injury. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v.164, n.5, p.896-904, 2001.

LEKSTRON-HIMES, J.A.; GALLIN, J.I. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v.343, n.23, p.1703-1714, 2000.

LEUSEN, J. H.; VERHOEVEN, A. J.; ROOS, D. Interactions between the components of the human NADPH oxidase: intrigues in the phox family. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, New York, v.128, n.5, p.461-476, 1999.

LI, Y.; ZHU, H.; TRUSH, M.A. Detection of mitochondria-derived reactive oxygen species production by the chemiluminogenic probes lucigenin and luminol. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1428, n.1, p.1-12, 1999.

LI, Y.; ZHU, H.; TRUSH, M. A. Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemiluminogenic probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.273, n.4, p.2015-2023, 1998.

LIMASSET, B.; OJASOO, T.; LE DOUCEN, C.; DORE, J. C. Inhibition of chemiluminescence in human PMNs by monocyclic phenolic acids and flavonoids. **Planta Medica**, Stuttgart, v.65, n.1, p.23-29, 1999.

LIN, H.-S.; TSAI, S.-H.; CHEN, C.-S.; CHANG, Y.-C.; LEE, C.-M.; LAI, Z.-Y.; LIN, C.-M. Structure-activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 75, p.1416-1425, 2008.

LIU, Y.; SHAW, S. K. ; MA, S.; YANG, L.; LUSCINKAS, F. W.; PARKOS, C. A. Regulation of leukocyte transmigration : cell surface interactions and signaling events. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.172, p.7-13, 2004.

LOPES, J. L. C.; LOPES, J. N. C.; MELLO, R. T.; PELLEGRINO, J.; VIEIRA, P. C. Estudo quimioprofilático da esquistossomose. IV: Inibição da penetração de cercárias por derivados cumarínicos. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v.40, n.2, p.283-295, 1980.

LUCISANO, Y. M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and IgG. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.132, p.2015-2020, 1984.

LUCISANO-VALIM, Y. M.; KABEYA, L. M.; KANASHIRO, A.; RUSSO-CARBOLANTE, E. M. S.; POLIZELLO, A. C. M.; AZZOLINI, A. E. C. S.; SILVA, S. C.; LOPES, J. L. C.; OLIVEIRA, C. A.; MANTOVANI, B. A. A simple method to study the activity of natural compounds on the chemiluminescence of neutrophils upon stimulation by immune complexes. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, New York, v.47, p.53-58, 2002.

MAHESWARA, M.; SIDDIAIAH, V.; DAMU, G.L.V.; RAO, Y.K.; RAO, C.V. A solvent-free synthesis of coumarins via Pechmann condensation using heterogeneous catalyst. **Journal of Molecular Catalysis A-Chemical**, Amsterdam, v.255, p. 49-52, 2006.

MAJERUS, P. W.; BROZE-JÚNIOR, G. J.; MILETICH, J. P.; TOLLEFSEN, D. M. Fármacos anticoagulantes, trombolíticos e antiplaquetários. In: GOODMAN, L. S. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 9 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, p.991-1005, 1996.

MANHAS, M.S.; GANGULY, S.N.; MUKHERJEE, S.; JAIN, A.K.; BOSE, A.K. 2006. Microwave initiated reactions: Pechmann coumarin synthesis, Biginelli reaction, and acylation. **Tetrahedron Letters**, Oxford, 47, p. 2423-2425.

MARASCO, W. A.; PHAN, S. H.; KRUTZSCH, H.; SHOWELL, H. J.; FELTNER, D. E.; NAIM, R.; BECKER, E. L.; WARD, P. A. Purification and identification of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.259, n.9, p.5430-5439, 1984.

MARIDONNEAU-PARINI, I.; TRIGALE, S. M.; TAUBER, A. I. Identification of distinct activation pathways of the human neutrophils NADPH-oxidase. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.137, n.9, p.2925-2929, 1986.

MARTÍN-ARAGÓN, S.; BENEDI, J.; VILLAR, A. Oxygen active species-scavenger properties of coumarins. **Phytotherapy Research**, London, v.10, p.75-78, 1996.

MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; ALVES, C.M.O.S.; AZZOLINI, A.E.C.S.; POLIZELLO, A.C.M.; CARVALHO, I.F.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Fcγ and complement receptors: expression, role and co-operation in mediating the oxidative burst and degranulation of neutrophils of Brazilian systemic lupus erythematosus patients. **Lupus**, London, v.11, p.240-248, 2002.

MAYER-SCHOLL, A.; AVERHOFF, P.; ZYCHLINSKY, A. How do neutrophils and pathogens interact? **Current Opinion in Microbiology**, London, v.7, n.1, p.62-66, 2004.

MESHULAM, T.; DIAMOND, R. D.; LYMAN, C. A.; WYSONG, D. R.; MELNICK, D. A. Temporal association of calcium mobilization, inositol triphosphate generation, and superoxide anion release by human neutrophils by serum opsonized and nonopsonized particulate stimuli. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.150, n.2, p.532-539, 1988.

MEYDANI, M.; MARTIN, A.; RIBAYA-MERCADO, J.; GONG, J.; BLUMBERG, J. B.; RUSSEL, R. M. β-carotene supplementation increases antioxidant capacity of plasma in older women. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.124, n.12, p.2397-2403, 1994.

MIDDLETON JUNIOR, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v.52, n.4, p.673-751, 2000.

MOLLINEDO, F.; BORREGAARD, N.; BOXER, L. A. Novel trends in neutrophil structure, function and development. **Immunology Today**, Amsterdam, v.20, n.12, p.535-537, 1999.

MOREIRA, M. R.; KANASHIRO, A.; KABEYA, L. M.; POLIZELLO, A. C. M.; AZZOLINI, A. E. C. S.; CURTI, C.; OLIVEIRA, C. A.; AMARAL, A. T.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Neutrophil effector functions triggered by Fc-gamma and/or complement receptors are dependent on B-ring

hydroxylation pattern and physicochemical properties of flavonols. **Life Sciences**, Oxford, v.81, p.317–326, 2007.

MUKHERJEE, A. B.; MIELE, L.; PATTABIRAMAN, N. Phospholipase A₂ enzymes: regulation and physiological role. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v.48, n.1, p.1-10, 1994.

MÜLLER-PEDDINGHAUS, R. *In vitro* determination of phagocyte activity by luminol- and lucigenin-amplified chemiluminescence. **International Journal of Immunopharmacology**, Oxford, v.6, n.5, p.455-466, 1984.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, Netherlands, v.1054, n.1-2, p.95-111, 2004.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, London, v.6, n.3, p.173-182, 2006.

NICOLAIDES, D.N.; GAUTAM, D.R.; LITINAS, K.E. Synthesis and evaluation of the antioxidant and antiinflammatory activities of some benzo[1]khellactone derivatives and analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v.29, p.323-32, 2004.

O'DOWD, Y.; DRISS, F.; DANG, P.M.-C.; ELBIM, C.; GOUGEROT-POCIDALO, M.-A.; PASQUIER, C.; EL-BENNA, J. Antioxidant effect of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil: scavenging of hydrogen peroxide but not superoxide anion produced by human neutrophils. **Biochemical Pharmacology**, Berlin, v.68, p.2003-2008, 2004.

P. R. Vade-Mécum 2004/2005. São Paulo, Soriak, p.802, 2004

PAVELKOVA, M.; KUBALA, L. Luminol-, isoluminol- and lucigenin- enhanced chemiluminescence of rat blood phagocytes stimulated with different activators. **Luminescence**, Chichester, v.19, n.1, p.37-42, 2004.

PAYÁ, M.; HALLIWELL, B.; HOULT, J. R. S. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species: scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. **Biochemical Pharmacology**, Berlin, v.44, n.2, p.205-214, 1992.

PAYÁ, M.; FERRÁNDIZ, M. L.; MIRALLES, F.; MONTESINOS, C.; UBEDA, A.; ALCARAZ, M. J. Effects of coumarin derivatives on superoxide anion generation. **Arzneimittel Forschung-Drug Research**, Aulendorf, v.43, n.6, p.655-658, 1993.

PAYÁ, M.; GOODWIN, P. A.; HERAS, B.; HOULT, J. R. S. Superoxide scavenging activity in leukocytes and absence of cellular toxicity of a series of coumarins. **Biochemical Pharmacology**, Berlin, v.48, n.3, p.445-451, 1994.

PHAM, C.T. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. **Nature Reviews - Immunology**, London, v.6, n.7, p.541-550, 2006

POULSEN, H. E.; PRIEME, H.; LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. **European Journal of Cancer Prevention**, Oxford, v.7, n.1, p.9-16, 1998.

RAJ, H.G.; PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; GOEL, S.; POONAM, H.; MALHOTRA, S.; SINGH, A.; OLSEN, C.E.; WENGEL, J. Mechanism of biochemical action of substituted 4-methylbenzopyran-2-ones. Part I: dioxygenated 4-methylcoumarins as superb antioxidant and radical scavenging agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, New York, v.6, p.833-839, 1998a.

RAMESH, B.; PUGALENDI, K.V. Antioxidant role of umbelliferone in STZ-diabetic rats. **Life Sciences**, Oxford, v.79, n.3, p.306-310, 2006.

REGIER, D. S.; GREENE, D. G.; SERGEANT, S.; JESAITIS, A. J.; MCPHAIL, I. C. Phosphorylation of p22^{phox} is mediated by phospholipase D-dependent and -independent mechanisms. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.275, n.37, p.28406-28412, 2000.

REID, P.T.; SALLENAVE, J.M. Neutrophil-derived elastases and their inhibitors: potential role in the pathogenesis of lung disease. **Current Opinion in Investigational Drugs**, London, v.2, n.1, p.337-342, 2001.

REMOLD-O'DONNELL, E.; PARENT, D. Downregulation of neutrophil CD43 by opsonized zymosan. **Blood**, New York, v.85, n. 2, p.337-342, 1995.

REPINE, J. E.; FOX, R. B.; BERGER, E. M. Dimethyl sulfoxide inhibits killing of *Staphylococcus aureus* by polymorphonuclear leukocytes. **Infection and Immunity**, Bethesda, v.31, n.1, p.510-513, 1981.

RODRIGUES, T.; SANTOS, A.C.; PIGOSO, A.A.; MINGATTO, F.E.; UYEMURA, S.A.; CURTI, C. Thioridazine interacts with the membrane of mitochondria acquiring antioxidant activity toward apoptosis – potentially implicated mechanisms. **British Journal of Pharmacology**, London, v.136, p.136-142, 2002.

ROY, P.; KULKARNI, A. P. Oxidation of ascorbic acid by lipoxygenase: effect of selected chemicals. **Food Chemical Toxicology**, Oxford, v.34, n.6, p.563-570, 1996.

SALYERS, A. A.; WHITT, D. **Bacterial pathogenesis: a molecular approach**. Washington: ASM Press, p.560, 1994.

SBARRA, A. J.; KARNOVSKY, M. L. The biochemical basis of phagocytosis. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.234, n.6, p.1355-1362, 1959.

SCHORR, K.; ROTT, A; DA COSTA, F.B; MERFORT, I. Optimization of a human neutrophil elastase assay and investigation of the effect of sesquiterpene lactones. **Biologicals**, London, v.33, n.3, p. 175-184, 2005.

SEGAL, A.W.; JONES, O.T. The subcellular distribution and some properties of the cytochrome b component of the microbicidal oxidase system of human neutrophils. **Biochemical Journal**, London, v.182, n.1, p.181-8, 1979.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v.23, p.197-223, 2005.

SELVATICI, R.; FALZARANO, S.; MOLLICA, A.; SPISANI, S. Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v.534, p.1-11, 2006.

SENGELOV, H.; KJELDSEN, L.; KROEZE, W.; BERGER, M.; BORREGAARD, N. Secretory vesicles are intracellular reservoir of complement receptor 1 in human neutrophils. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.153, n.2, p.804-810, 1994.

SIDDIQUI, A. A.; RAJESH, R.; ALAGARSAMY, V.; DE CLERCQ, E. Synthesis, antiviral, antituberculous, and antibacterial activities of some novel, 4-(4-substituted phenyl)-6-(4-

nitrophenyl)-2-(substituted imino)pyrimidines. **Archiv der Pharmazie**, Weinheim, v.340, p.95-102, 2007.

SIMÕES, L. M. C.; GREGÓRIO, L. E.; SILVA-FILHO, A. A.; SOUZA, M. L.; AZZOLINI, A. E. C. S.; BASTOS, J. K.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.94, p.59-65, 2004.

SMEDLY, L.A.; TONNESEN, M.G.; SANDHAUS, R.A.; HASLETT, C.; GUTHRIE, L.A.; JOHNSTON, R.B. JR.; HENSON, P.M.; WORTHEN, G.S. Neutrophil-mediated injury to endothelial cells. Enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v.77, n.4, p.1233-43, 1986.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.15, n.1, p.71-81, 2002.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant defence: vitamins E and Cand carotenoids. **Diabetes**, New York, v.46, p.S14-S18, Supplement 2, 1997.

STRNAD, C. F.; PARENTE, J. E.; WONG, K. Use of fluoride ion as a probe for the guanine nucleotide-binding protein involved in the phosphoinositide-dependent neutrophil transduction pathway. **FEBS Letters**, Heidelberg, v.206, n.2, p.20-24, 1986.

THORPE, G.H.G.; KRICKA, L.J. Enhanced chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish peroxidase. **Methods in Enzymology**, New York, v.133, p.331-353, 1986.

THUONG, P.T.; HUNG, T.M.; NGOC, T.M.; HA, D.T.; MIN, B.S.; KWACK, S.J.; KANG, T.S.; CHOI, J.S.; BAE, K. Antioxidant activities of coumarins from Korean medicinal plants and their structure-activity relationships. **Phytotherapy Research**, London, 2009 (in press)

TIROUVANZIAM, R. Neutrophilic inflammation as a major determinant in the progression of cytic fibrosis. **Drug News & Perspectives**, Barcelona, v.19, n.10, p.609-14, 2006.

TKALCEVIC, J.; NOVELLI, M.; PHYLACTIDES, M.; IREDALE, J.P.; SEGAL, A.W.; ROES, J. Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. **Immunity**, Cambridge, v.12, n.2, p.201-10, 2000.

TREMBLAY, G.M.; JANELLE, M.F.; BOURBONNAIS, Y. Anti-inflammatory activity of neutrophil elastase inhibitors. **Current Opinion in Investigational Drugs**. London, v.4, n.5, p.556-565, 2003.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C.J.; TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 266, n. 1-2, p. 37-56, 2004.

VAN DYKE, K.; CASTRANOVA, V. **Cellular chemiluminescence**. Boca Raton, CRC Press, v.1, 1987.

VEITCH, N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, Oxford, v.65, p.249-259, 2004.

VISSER, S.P.de; SHAIK, S.; SHARMA, P.K.; KUMAR, D.; THIEL, W. Active species of horseradish peroxidase (HRP) and cytochrome P450: two electronic chameleons. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v.125, p.15779-15788, 2003.

- VOGEL, I. A. **A textbook of practical organic chemistry**. 3 ed. London, Longmans, p.854-855, 1967.
- VUOTTO, M.L.; MIRANDA, R.; RITIENI, A.; BASILE, A.; RICCIARDI, L.; DI PRISCO, R.; NICOLOSI, G.; MASCOLO, N. Improvement of (+)-catechin inhibitory activity on human PMN respiratory burst by (+)-3-O-propionyl and (-)-3-O-valeryl substitution. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v.55, p.399-405, 2003.
- WEBER, U. S.; STEFFEN, B.; SIEGERS, C. P. Antitumor activities of coumarin, 7-hydroxycoumarin and its glucuronide in several human tumor cell lines. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, Westbury, v.99, n.2, p.193-206, 1998.
- WEINRAUCH, Y.; DRUJAN, D.; SHAPIRO, S.D.; WEISS, J.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. **Nature**, London, v.417, n.6884, p.91-4, 2002.
- WEIR, D. M. **Immunochemistry and molecular immunology**. 5 ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications. p.570, 1986.
- WESTMAN, J.A. Influence of pH and temperature on the luminol-dependent chemiluminescence of human polymorphonuclear leucocytes. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, Oslo, v.46, n.5, p. 427-434, 1986.
- WIEDOW, O.; MEYER-HOFFERT, U. Neutrophil serine proteases: potential key regulators of cell signalling during inflammation. **Journal of Internal Medicine**, Oxford, v.257, p.319-328, 2005.
- WITZUM, J. L. The oxidative hypothesis of atherosclerosis. **Lancet**, London, v.344, n.8926, p.793-795, 1994.
- WONG, R.K.M.; PETTIT, A.I.; QUINN, P.A.; JENNINGS, S.C.; DAVIES, J.E.; NG, L.L. Advanced glycation end products stimulate an enhanced neutrophil respiratory burst mediated through the activation of cytosolic phospholipase A₂ and generation of arachidonic acid. **Circulation**, Dallas, v.108, p.1858-1864, 2003.
- YANG, J.; LIU, L. Study of experimental conditions and influencing factors on chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Luminescence**, Amsterdam, v.40/41, p.256-257, 1988.
- YANG, E. B.; ZHAO, Y. N.; ZHANG, K.; MACK, P. Daphnetin, one coumarin derivatives, is a protein kinase inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.260, p.682-685, 1999.
- YILDIZ, G.; DEMIRYÜREK, A. T. Ferrous iron-induced chemiluminescence: a method for hydroxyl radical study. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, New York, v.39, n.3, p.179-184, 1998.
- ZYCHLINSKY, A.; WEINRAUCH, Y.; WEISS, J. Forum in immunology. Introduction: Forum in immunology on neutrophils. **Microbes and Infection**, Paris, v.5, n.14, p.1289-1291, 2003.