UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo da sinalização de mastócitos mediada por IgE:
desenvolvimento de inibidores e efeito de níveis reduzidos de
fosfatidilinositol 4,5-bifosfato**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor
em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientado(a): Marcela de Souza Santos

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Rose Mary Zumstein Georgetto Naal

Ribeirão Preto
2012

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.

Souza Santos, Marcela

Estudo da sinalização de mastócitos mediada por IgE: desenvolvimento de inibidores e efeito de níveis reduzidos de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato. Ribeirão Preto, 2012.
138 p.; 30cm.

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

Orientador: Zumstein Georgetto Naal, Rose Mary.

1. mastócitos. 2. fosfatidilinositol 4,5-bifosfato. 3. degranulação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Marcela de Souza Santos

Título do trabalho: Estudo da sinalização de mastócitos mediada por IgE: desenvolvimento de inibidores e efeito de níveis reduzidos de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador(a): Rose Mary Zumstein Georgetto Naal

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedicada aos meus pais, Rosania e Roberto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por colocar em meu destino o privilégio de ser pós-graduanda;

À minha família: aos meus pais, que, por seu amor incondicional, não mediram esforços para que eu tivesse a oportunidade de avançar tão longe em meus estudos e por me educarem com valores corretos, que me permitissem aproveitar as oportunidades por eles conferidas. Agradeço ainda aos meus pais por permitirem que eu pudesse desfrutar da companhia dos meus queridos irmãos, Roberta e Felipe, os quais sempre me incentivaram como cientista e certamente tornaram estes anos como doutoranda muito mais prazerosos;

Ao George, por ser meu maior motivador enquanto pesquisadora e por seus incansáveis e ilimitados esforços para que eu pudesse completar meus estudos;

À minha “mãe científica”, Rose, por sua orientação, iniciada enquanto eu era, ainda, uma caloura da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Obrigada por todo o aprendizado, carinho e convivência ao longo destes quase 9 anos de orientação;

Aos queridos companheiros do Laboratório de Biossensores e Sistemas Microheterogêneos: à Perpétua e Laila, pela valiosa amizade e pela ajuda nos momentos de aperto com os experimentos, ao Zeki e a todos os alunos que passaram pelo laboratório ao longo destes anos;

Ao David Holowka, Barbara Baird e grupo Baird-Holowka, pelo inestimável aprendizado e pelas portas que me foram abertas, graças à oportunidade de estágio em seu laboratório;

Aos queridos amigos de faculdade, muitos, que como eu, optaram pela carreira acadêmica, e por isso, me deram o prazer de desfrutar de mais alguns anos de sua companhia;

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, que tanto contribuiu para minha formação profissional e pessoal;

Aos profs. Drs. Mônica Talarico Puppo e Jairo Kenupp Bastos, pelo gentil fornecimento das arilcumarinas e piridovericina, respectivamente.

Às agências de fomento FAPESP, CAPES e ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica, pelo respaldo financeiro.

RESUMO

SOUZA SANTOS, M. **Estudos da sinalização de mastócitos mediada por IgE: desenvolvimento de inibidores e efeito de níveis reduzidos de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato**. 2012. 138f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

As doenças alérgicas alcançaram proporções mundialmente epidêmicas. A ativação de receptores para IgE, FcεRI, em mastócitos, é o mecanismo chave para a iniciação e propagação das respostas patofisiológicas dos processos alérgicos. Após a interação destas células com um alérgeno, há a ativação de uma cascata de eventos de sinalização, a qual resulta na secreção de mediadores alérgicos pré-formados, através de um processo regulado de exocitose, além da síntese e secreção de mediadores lipídicos e citocinas. Desta forma, a inibição da responsividade dos mastócitos, quando ativados por um alérgeno, representa uma via importante para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos com indicação anti-alérgica. Neste sentido, este trabalho buscou, num primeiro momento, contribuir com a compreensão dos papéis desempenhados por um glicerofosfolípídeo de membrana, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PtdIns(4,5)P₂), em eventos de sinalização em mastócitos, mediados por IgE. Este trabalho permitiu destacar a importância de PtdIns(4,5)P₂ como um regulador chave das respostas de Ca²⁺ e das alterações de morfologia de mastócitos estimulados por um alérgeno. Foi observado ainda que níveis reduzidos de PtdIns(4,5)P₂ determinaram a inibição do processo de endocitose de receptores FcεRI ativados, um evento crucial para a redução da transdução de sinais. Estes resultados não somente trazem um ganho de conhecimento acerca dos detalhes que orquestram os eventos de sinalização em mastócitos estimulados por um alérgeno, como também apontam que a regulação dos níveis de PtdIns(4,5)P₂ pode certamente ser apontada como alvo para o desenvolvimento de novas moléculas inibidoras da ativação mastocitária. A segunda etapa deste trabalho teve como objetivo avaliar o potencial inibitório de alguns compostos de origem natural e sintética sobre a degranulação de mastócitos, evento em que mediadores alérgicos, como a histamina, são secretados, em resposta ao estímulo celular. Inicialmente, avaliou-se o efeito inibitório de um conjunto de arilcumarinas sintéticas, estruturalmente relacionadas, sobre a degranulação. Um número significativo de moléculas foram ativas e, dentre elas, algumas substituições junto à estrutura do anel 3-fenilcumarínico, como as hidroxilações das posições 6, 2' e 5', puderam ser identificadas como importantes para o potencial bioativo. Finalmente, o trabalho apresentou uma molécula de origem natural, como um potente inibidor da degranulação de mastócitos e da secreção de citocinas. Trata-se da piridovericina, um metabólito secundário, isolado do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. Dessa forma, tanto as cumarinas, como a piridovericina podem ser apontadas como compostos de partida de grande potencial para o desenvolvimento de novos fármacos anti-alérgicos.

Palavras-chave: mastócitos, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, degranulação.

ABSTRACT

SOUZA SANTOS, M. **Study of IgE-mediated mast cell signaling: development of inhibitors and effect of reduced levels of phosphatidylinositol 4,5-biphosphate.** 2012. 138f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Allergic diseases have approached epidemic proportions worldwide. The activation of IgE receptors, FcεRI, from mast cells, is the key event for the initiation and propagation of pathophysiological responses involved in the allergic processes. The interaction between mast cells and allergens triggers a signaling cascade, which results in secretion of pre-formed allergic mediators, through regulated exocytosis, in addition to the synthesis and secretion of lipid mediators and cytokines. In this way, the inhibition of mast cell responsiveness, upon allergen stimulation, represents an important pathway for the development of new anti-allergic drug candidates. Thus, the present work tried, firstly, to gain better insight of the roles played by phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PtdIns(4,5)P₂) during IgE-mediated mast cell signaling. This work highlighted the importance of PtdIns(4,5)P₂ as a key regulator of Ca²⁺ responses and mast cell morphological alteration, when activated by an allergen. It was observed that reduced levels of PtdIns(4,5)P₂ determined the inhibition of activated FcεRI endocytosis, a crucial event for signal transduction termination. Those results not only improve the actual knowledge in mast cell signaling but also point out the regulation of PtdIns(4,5)P₂ levels as a target to be pursued during the development of new inhibitors of mast cell activation. The second part of this work aimed to evaluate the capacity of both synthetic and natural compounds to inhibit mast cell degranulation, characterized by the release of granule-contained allergic mediators, such as histamine, upon cell stimulation. Initially, the inhibitory effect of a set of structurally related synthetic arylcoumarins was evaluated. A significant number of molecules were active, and a few substitutions within such molecules could be pointed as important for the biological activity, such as the hydroxylation of carbons 6, 2' e 5' of the 3-phenylcoumarin ring. Lastly, this work presents a natural compound as a potent inhibitor of mast cell degranulation and cytokine secretion. The referred compound is pyridovericin, a secondary metabolite isolated from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Therefore, both the coumarin derivatives and pyridovericin can be regarded as lead compounds for the development of new anti-allergic drugs.

Keywords: mast cell, phosphatidylinositol 4,5-biphosphate, degranulation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Síntese de IgE estimulada por um alérgeno.** De forma resumida, células apresentadoras de antígeno (APC), por meio de moléculas MHC classe II (MHC II), levam à diferenciação de células T para T_H2, as quais levam à produção de IL-4 e IL-13, necessárias para induzir a produção preferencial de IgE por células B. Adaptado de Holgate e Polosa, 2008. **5**
- Figura 2. Estrutura polipeptídica do receptor da alta afinidade para IgE (FcεRI).** A molécula de FcεRI é composta por 3 subunidades: uma cadeia α, que medeia a ligação com IgE, e três cadeias que contribuem para a sinalização intracelular, através de seus domínios ITAM, sendo uma cadeia β e um dímero de cadeias γ. Adaptado de Abbas *et al.*, 2000. **6**
- Figura 3. Esquema via de transdução de sinais em mastócitos.** O intercruzamento de receptores FcεRI por um antígeno multivalente leva ao deslocamento dos receptores agregados para os *lipid rafts*, onde o receptor é fosforilado pela forma ativa de Lyn. O recrutamento para o receptor e ativação de Syk permite a fosforilação de LAT. LAT permite que a transdução de sinais seja divergida em cascatas que levarão à síntese e secreção de mediadores lipídicos e citocinas, através da ativação da via das MAP quinases, além de ativar a PLCγ, iniciando a via de sinalização para a degranulação mastocitária. **9**
- Figura 4. Estrutura de um fosfatidilinositol.** Fosfatidilinositol é composto de um grupamento inositol como cabeça de grupo, ligado à duas cadeias de ácido graxo por um grupamento glicerol. **18**
- Figura 5. Metabolismo de fosfoinositídeos.** Reações metabólicas que levam à geração dos sete fosfoinositídeos, a partir de fosfatidilinositol (PtdIns). Reações indicadas por setas tracejadas foram apenas demonstradas *in vitro*. Adaptado de Di Paolo e De Camilli, 2006. **19**
- Figura 6. Rotas metabólicas para a produção de PtdIns(4,5)P₂.** PtdIns(4,5)P₂ pode ser produzido tanto via PtdIns(4)P como via PtsIns(5)P, embora a abundância de PtdIns(4)P em relação ao fosfoinositídeo fosforilado na posição D-5 torne esta a primeira rota prevalente para a obtenção de PtdIns(4,5)P₂. A seta tracejada destaca que a via de síntese de PtdIns(5)P ainda não foi firmemente estabelecida. Adaptado de Balla e Balla, 2006. **22**
- Figura 7. Quercetina inibe a degranulação mastocitária induzida por antígeno de forma dose-dependente.** Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações de quercetina, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 µg/mL). Aliquotas do sobrenadante celular foram incubadas com MUG 1,2 mM e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β-hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de **P*<0,05 e ****P*<0,001, em relação ao controle. **30**
- Figura 8. PAO e quercetina inibem rapidamente a mobilização de Ca²⁺ induzida por antígeno.** Células RBL, sensibilizadas com IgE anti-DNP e carregadas com Fluo-4, foram estimuladas com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 **32**

µg/mL) e posteriormente tratadas com PAO 1 µM, quercetina (Que) 10 µM e Gd^{3+} 1µM , como indicado. As identificações **A** e **B** indicam que os experimentos foram realizados separadamente.

- Figura 9. PAO e quercetina inibem rapidamente a mobilização de Ca^{2+} induzida por tapsigargina.** Células RBL, carregadas com Fluo-4, foram estimuladas com tapsigargina (tap, 200 nM) e posteriormente tratadas com PAO 1 µM, quercetina (Que) 10 µM e Gd^{3+} 1 µM, como indicado. As identificações **A** e **B** indicam que os experimentos foram realizados separadamente. 34
- Figura 10. PAO e quercetina inibem rapidamente a mobilização de Ca^{2+} induzida por antígeno e tapsigargina.** Representação quantitativa da inibição das respostas de Ca^{2+} estimuladas por antígeno (Ag) e tapsigargina (tap), na presença de quercetina (Qu) e PAO. Resultados expressam a quantificação de 3 experimentos independentes e barras de erro representam o desvio padrão da média destes três experimentos. 35
- Figura 11. Quercetina inibe transientes de Ca^{2+} induzidos por antígeno.** Células RBL, carregadas com Fluo-4, foram estimuladas com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 µg/mL), após pré-tratamento com quercetina 20 µM (Que). Curva representativa para experimento realizado em triplicata. 37
- Figura 12. Pequenas concentrações de quercetina não inibem a fosforilação de p72^{Syk} e da subunidade β do receptor FcεRI.** (A) Células RBL, sensibilizadas com IgE anti-DNP, foram tratadas com diferentes concentrações de quercetina e a fosforilação dos resíduos de tirosina de p72^{Syk} e FcεRI-β foi estimulada por antígeno. O lisado celular foi analisado por SDS-PAGE e immunoblotting com anti-fosfotirosina. O controle de carregamento das amostras foi feito com marcação para β-actina. O blot ilustrado é representativo de três experimentos independentes. (B) Quantificação de três experimentos, onde barras de erro representam o desvio padrão da média. Análise estatística das médias por *One-way* ANOVA, seguida do teste de Dunnett revelou ausência de significância estatística entre as amostras tratadas com quercetina e as amostras controle. 38
- Figura 13. Ondulamento da membrana plasmática e espalhamento celular, induzidos por antígenos, são inibidos por PAO e quercetina.** Células RBL, sensibilizadas com IgE anti-DNP, foram pré-tratadas com quercetina (Que) 20 µM, ou PAO 2 µM, por 2 minutos e então estimuladas com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,5 µg/mL) por 10 minutos. As células foram fixadas e marcadas para F-actina com Alexa568-faloidina para análise por microscopia confocal. 43
- Figura 14. Quantificação dos experimentos apresentados na Figura 13.** Contagem de células para ondulamento (A) e medidas de área celular para espalhamento (B) foram obtidos de 3 experimentos independentes, com barras de erros representando desvio padrão. A diferença entre a área de células estimuladas por antígeno e tratadas ou não com inibidores foi estatisticamente analisada usando-se o teste t de Student e foram consideradas significativas quando $P < 0,01$. Que = quercetina, Ag, antígeno e MP = membrana plasmática. 44
- Figura 15. Quercetina e PAO não afetaram a internalização estimulada de complexos IgE/FcεRI em células RBL suspensas.** Células em suspensão, sensibilizadas com A488-IgE, foram pré-tratadas com 20 µM de quercetina (Que) ou 2 µM de PAO por 2 min, seguindo-se a ligação cruzada de IgE-FcεRI induzida por 47

antígeno (Ag) a 37°C, por 20 minutos. As células foram então marcadas a 4°C com anticorpo primário anti-Alexa488 e com anticorpo secundário conjugado a Cy5 antes da fixação celular. A disponibilidade de IgE na superfície celular foi avaliada através de medidas de citometria de fluxo da fluorescência de Cy5. Os valores apresentados representam a média $\pm$ desvio padrão para três experimentos independentes e diferenças em relação ao controle foram consideradas estatisticamente não-significativas, quando analisadas pelo teste t de Student.

- Figura 16. PAO e Qu inibem a acidificação de complexos IgE/Fc ϵ RI internalizados após estímulo com anti-IgE.** Células RBL em suspensão foram sensibilizadas com FITC-IgE e tratadas com 20 μ M de Qu ou 2 μ M de PAO. Após agregação dos complexos IgE/Fc ϵ RI com anti-IgE no tempo=0, a acidificação destes complexos subsequente à sua internalização foi monitorada pela supressão de fluorescência de FITC-IgE. **49**
- Figura 17. PAO e quercetina inibem que endossomos contendo complexos IgE-Fc ϵ RI se desprendam da membrana plasmática.** Células RBL aderidas foram sensibilizadas com Alexa488-IgE e tratadas ou não com 20 μ M de quercetina (Que) ou 2 μ M de PAO por 5 minutos, anterior ao estímulo antigênico (Ag, DNP-BSA, 0,5 μ g/mL) por 10 minutos a 37 °C. Após a fixação celular, a acessibilidade de IgE foi detectada por sua marcação com anti-Alexa488 e A555-anti-coelho para aquisição de imagens de microscopia confocal. **51**
- Figura 18. PtdIns(4,5)P₂ resintetizado reaparece na membrana plasmática na forma de amplos agregados.** Células RBL-2H3 foram transfectadas com o domínio PH-PLC δ_1 fundido à proteína GFP e estimuladas com 10 μ M de A23187 por ~8min, seguidos da adição de 2 mM de EGTA por adicionais ~8min. Séries representativas de imagens de microscopia confocal de seções equatoriais de células foram adquiridas antes da ativação celular e em diferentes tempos seguindo-se a adição de A23187 e EGTA, a 37°C. As células foram incubadas com o marcador para membrana plasmática A555-CtxB por 15 min à temperatura ambiente, antes da aquisição de imagens. **55**
- Figura 19. A adição de PAO causa a redução da ressíntese de PtdIns(4,5)P₂ na membrana plasmática, mas também resulta no seu aparecimento em regiões perinucleares próximas ou mesmo no complexo de Golgi.** (A) Após a hidrólise de PtdIns(4,5)P₂ induzida por A23187, a qual foi monitorada pela translocação do domínio PH-PLC δ_1 -EGFP, da membrana plasmática para o citosol, células RBL foram tratadas com 2 μ M de PAO por 5 min antes da quelação de Ca²⁺ com EGTA. Imagens para duas células representativas são exibidas. (B) Células tratadas como em (A) foram fixadas e marcadas para *cis*-Golgi com anti-GM130, conjugado a Alexa647, para a obtenção de imagens de microscopia confocal. **58**
- Figura 20. O tratamento das células com quercetina reduz consideravelmente a ressíntese de PtdIns(4,5)P₂ na membrana plasmática.** Após a hidrólise de PtdIns(4,5)P₂ induzida por A23187, a qual foi monitorada pela translocação do domínio PH-PLC δ_1 -EGFP, da membrana plasmática para o citosol, células RBL foram tratadas com 20 μ M de quercetina por 5 min antes da quelação de Ca²⁺ com EGTA. Imagens para duas células representativas são exibidas. **59**
- Figura 21. A ressíntese de PtdIns(4,5)P₂ na membrana plasmática é significativamente inibida por PAO e quercetina.** Quantificação para ressíntese de PtdIns(4,5)P₂ na membrana plasmática. Os plots mostram a razão entre fluorescência de PH- **60**

PLC δ_1 -EGFP na membrana plasmática e àquela do citoplasma adjacente, determinada como descrita no **item 5.2.6**. Para cada condição, 30 células foram quantificadas, advindas de pelo menos 4 experimentos independentes. Barras de erro representam o desvio padrão da média, as quais foram consideradas significativas para $*P<0,05$, em análises pelo teste t de student.

- Figura 22.** Estrutura química da cumarina (1,2-benzopirona). 72
- Figura 23.** Estrutura química do flavonóide quercetina (A) e das 3-arilcumarinas estudadas. A semelhança estrutural entre os derivados aril-cumarínicos e flavonóides, cuja atividade anti-alérgica é bem conhecida, motivou o estudo da atividade inibitória das cumarinas sobre a degranulação de células RBL-2H3. 74
- Figura 24.** Reação de clivagem de MUG para a formação do produto fluorescente metilumbeliferona. A enzima β -hexosaminidase catalisa a clivagem de metilumbeliferil-*N*-acetil- β -D-glucosaminida (MUG) para gerar o produto fluorescente metilumbeliferona. A quantificação da fluorescência de metilumbeliferona é frequentemente empregada como uma medida da degranulação de mastócitos. 77
- Figura 25.** Fluxograma para os ensaios de quantificação de β -hexosaminidase padrão e direto. A redução do número de etapas requeridas para o ensaio direto, em comparação com o ensaio padrão, associada ao fato de que o ensaio direto é conduzido totalmente na presença de células, permite sua aplicação como um biosensor para a triagem de inibidores da degranulação mastocitária. 78
- Figura 26.** Cumarina 1 não afeta a degranulação de mastócitos estimulada por antígeno. Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 1, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 μ g/mL). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett não indicaram significância estatística das amostras tratadas com o derivado cumarínico em relação ao controle. 84
- Figura 27.** Efeito inibitório da cumarina 2 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno. Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 2, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 μ g/mL). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de $**P<0,01$ e $***P<0,001$, em relação ao controle. 86
- Figura 28.** Efeito inibitório da cumarina 3 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno. Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 3, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 μ g/mL). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 87

1,2 mM por subseqüentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de $^{**}P<0,01$, em relação ao controle.

- Figura 29. Efeito inibitório da cumarina 4 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno.** 88
Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 4, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 μ g/mL). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subseqüentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de $^{**}P<0,01$, em relação ao controle.
- Figura 30. Efeito inibitório da cumarina 5 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno.** 90
Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 5, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 μ g/mL). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subseqüentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de $^{*}P<0,05$ e $^{**}P<0,01$, em relação ao controle.
- Figura 31. Efeito inibitório da cumarina 6 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno.** 91
Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 6, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 μ g/mL). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subseqüentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de $^{**}P<0,01$, em relação ao controle.
- Figura 32. Efeito inibitório da cumarina 7 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno.** 92
Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 7, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 μ g/mL). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subseqüentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de $^{**}P<0,01$, em relação ao

controle.

- Figura 33. Efeito inibitório da cumarina 8 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno.** 93
Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 8, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 µg/mL). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β-hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de $**P<0,01$, em relação ao controle.
- Figura 34. Efeito inibitório da cumarina 9 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno.** 95
Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 9, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 µg/mL). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β-hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de $*P<0,05$ e $**P<0,01$, em relação ao controle.
- Figura 35. Efeito inibitório da cumarina 10 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno.** 96
Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 10, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 µg/mL). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β-hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de $*P<0,05$ e $**P<0,01$, em relação ao controle.
- Figura 36. Efeito inibitório da cumarina 11 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno.** 97
Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 11, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 µg/mL). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β-hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett não indicaram significância estatística quando as amostras tratadas com a cumarina 11 foram comparadas com a amostra controle.
- Figura 37. Efeito inibitório da cumarina 12 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno.** 98
Células RBL foram tratadas com diferentes

concentrações da cumarina 12, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 µg/mL). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β-hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$, em relação ao controle.

- Figura 38. Efeito inibitório da cumarina 13 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno.** 99
Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 13 seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 µg/mL). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β-hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$, em relação ao controle.
- Figura 39. Efeito inibitório da cumarina 14 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno.** 100
Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 14 seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 µg/mL). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β-hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de ** $P < 0,01$, em relação ao controle.
- Figura 40. Efeito inibitório da cumarina 15 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno.** 101
Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 15 seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 µg/mL). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β-hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de ** $P < 0,01$, em relação ao controle.
- Figura 41. Efeito inibitório da cumarina 16 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno.** 102
Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 16 seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 µg/mL). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona,

produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de $**P<0,01$, em relação ao controle.

- Figura 42. Efeito inibitório do fumarato de cetotifeno sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno.** 104
Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações de cetotifeno seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 $\mu\text{g/mL}$). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de $***P<0,001$, em relação ao controle.
- Figura 43. Cumarina 16 não afeta significativamente a atividade da enzima β -hexosaminidase.** 107
O sobrenadante de células RBL-2H3, previamente lisadas por sonicação, foi tratado com diferentes concentrações da cumarina 16 e incubada com solução de MUG, pH 4,4, por 1h a 37 °C. A reação enzima-substrato foi parada em tampão pH 10. A quantificação da atividade enzimática foi baseada nas medidas de fluorescência da metil-umbeliferona produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett não indicaram significância estatística das amostras tratadas com o derivado cumarínico em relação ao controle.
- Figura 44. Estrutura química da piridovericina.** 119
O metabólito secundário piridovericina, isolado de culturas do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*, teve seu efeito inibitório, sobre a ativação de mastócitos, investigado no presente estudo.
- Figura 45. Efeito inibitório da piridovericina sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno.** 126
Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações de piridovericina, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 $\mu\text{g/mL}$). Após incubação, a 37 °C, por 1h, células foram incubadas com MUG, 1,2 mM, por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett, indicaram significância estatística de $*P<0,05$, $**P<0,01$ e $***P<0,001$, em relação ao controle.
- Figura 46. A piridovericina não afeta, substancialmente, a viabilidade de mastócitos RBL.** 127
Células RBL-2H3, incubadas com diferentes concentrações de piridovericina, por 1h, tiveram sua viabilidade avaliada através de medidas de fluorescência da resofurina, resultante da redução da resazurina, por células viáveis. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett, indicaram significância estatística de $**P<0,01$, em relação ao controle.

- Figura 47. A piridovericina não afeta, substancialmente, a atividade da enzima β -hexosaminidase.** 128
O sobrenadante de células RBL-2H3, previamente lisadas por sonicação, foi tratado com diferentes concentrações de piridovericina e incubada com solução de MUG, pH 4,4, por 1h, a 37 °C. A reação enzima-substrato foi parada em tampão pH 10. A quantificação da atividade enzimática foi baseada nas medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, o produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett, indicaram significância estatística de $*P<0,05$ e $**P<0,01$, em relação ao controle.
- Figura 48. O efeito inibitório da piridovericina sobre a degranulação de mastócitos, estimulada por antígeno, é reversível .** 129
Células RBL, pré-tratadas com diferentes concentrações de piridovericina, foram estimuladas com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 $\mu\text{g/mL}$), após remoção, ou não, da piridovericina por lavagem. Após incubação a 37 °C por 1h, células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam o desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análises pelo teste t de Student, indicaram significância estatística de $*P<0,05$, $***P<0,01$ e $****P<0,0001$, quando comparadas as amostras com e sem etapa de remoção da piridovericina.
- Figura 49. Efeito inibitório da piridovericina sobre a degranulação de mastócitos induzida por tapsigargina.** 131
Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações de piridovericina seguido de estímulo celular com tapsigargina (tap, 0,2 nM). Após incubação, a 37 °C, por 1h, células foram incubadas com MUG, 1,2 mM, por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam o desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett, indicaram significância estatística de $*P<0,05$ e $***P<0,001$, em relação ao controle.
- Figura 50. A piridovericina inibe substancialmente a resposta de Ca^{2+} induzida por antígeno.** 132
Células RBL sensibilizadas com anti-DNP IgE e carregadas com o indicador de Ca^{2+} , Fluo-4, foram pré-incubadas com piridovericina por 20 minutos antes do estímulo antigênico (DNP-BSA, 0,4 $\mu\text{g/mL}$). Os níveis de Ca^{2+} foram determinados com base em medidas de fluorescência de Fluo-4.
- Figura 51. A piridovericina inibe a secreção de IL-4.** 134
Células RBL sensibilizadas com anti-DNP IgE foram pré-tratadas com piridovericina e estimuladas com DNP-BSA (0,5 $\mu\text{g/mL}$). A quantificação de IL-4 secretada foi baseada em ensaios de ELISA. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de $*P<0,05$ e $****P<0,0001$, em relação ao controle.
- Figura 52. A piridovericina não afeta a viabilidade de mastócitos RBL.** 135
Células RBL-2H3, incubadas com diferentes concentrações de piridovericina por 4h, tiveram sua viabilidade avaliada através de medidas de fluorescência da resofurina, resultante da redução da resazurina por células viáveis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A555-CTxB	Alexa555-Colera toxina B
Ag	Antígeno
ANOVA	Análise de variância
ATPase SERCA	<i>Sarco(endoplasmic reticulum) Ca^{2+} ATPase</i>
BSA	Soro albumina bovina
Ca^{2+}	Cálcio
CI₅₀	Concentração para 50% de inibição da atividade biológica
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNP	Dinitro-fenil
ERK	Quinases reguladas por sinal extracelular
FcεRI	Receptor de alta afinidade para IgE
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Gd³⁺	Gadolínio
GTP/GDP	Guanosina trifosfato/bifosfato
HRP	<i>Horseradish</i> peroxidase
IL	Interleucina
Ig	Imunoglobulina
InsP₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
ISAAC	<i>International Study of Asthma and Allergy in Childhood</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
JNK	<i>JUN amino-terminal kinase</i>
LAT	<i>Linker for activation of T cells</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MP	Membrana plasmática

MARCKS	<i>Myristoylated alanine-rich C-kinase</i>
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo difenil tetrazólico
MUG	4-metil-umbeliferil- <i>N</i> -acetil- β -D-glucosaminida
NF-AT	Fator nuclear de ativação de células T
Orai1/CRACM1	<i>Ca²⁺ release activated Ca²⁺ channels</i>
PAF	Fator de agregação plaquetária
PAO	Óxido de fenilarsina
PH	<i>Pleckstrin homology</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PI4K	Fosfatidilinositol 4-quinase
PIP5K	Fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinase
PKC	Proteína quinase C
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PLCγ	Fosfolipase C γ
PtdIns	Fosfatidilinositol
PtdIns(3)P	Fosfatidilinositol 3-fosfato
PtdIns(4)P	Fosfatidilinositol 4-fosfato
PtdIns(5)P	Fosfatidilinositol 5-fosfato
PtdIns(4,5)P₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PtdIns(3,4,5)P₃	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
Que	Quercetina
RBL	<i>Rat Basophilic Leukemia</i>
SAR	Relação estrutura-atividade
SH2	<i>Src homology</i>
SOCE	<i>Store operated Ca²⁺ entry</i>
STIM1	<i>Stromal interaction molecule 1</i>
Syk	<i>Spleen tyrosine kinase</i>

Tap	Tapsigargina
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
WASP	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xv
INTRODUÇÃO.....	1
1.INTRODUÇÃO.....	2
1.1.Alergias.....	2
1.2.Mastócitos.....	3
1.3. Ativação de mastócitos via IgE e liberação de mediadores alérgicos.....	4
1.4. Mastócitos como alvo farmacológico para o tratamento de doenças alérgicas.....	9
2.CONTRIBUIÇÕES.....	10
3.REFERÊNCIAS.....	11
CAPÍTULO 1.....	15
1.RESUMO.....	16
2.ABSTRACT.....	17
3.INTRODUÇÃO.....	18
3.1. Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato: uma molécula sinalizadora versátil.....	18
4.OBJETIVOS.....	22
4.1.Objetivos específicos.....	22
5.MATERIAL E MÉTODOS.....	23
5.1.Material.....	23
5.2.Métodos.....	24
5.2.1.Cultura celular.....	24
5.2.2.Medidas de Ca^{2+} intracelular.....	24
5.2.3. Ensaio para análise de ondulação da membrana plasmática e espalhamento de células aderidas, estimulados por antígeno.....	25
5.2.4.Ensaio para análise da internalização de complexos IgE/FcεRI agregados por antígeno.....	26
5.2.5.Medidas da acidificação de endossomos contendo complexos IgE-FcεRI.....	27

5.2.6. Análise da síntese de PtdIns(4,5)P ₂ na membrana plasmática.....	27
5.2.7. Ensaio para a quantificação da liberação de β-hexosaminidase.....	28
5.2.8. Western blot para análise da fosforilação de resíduos de tirosino-quinases.....	28
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
6.1. Inibidores farmacológicos da síntese de fosfoinosítídeos inibem respostas de Ca ²⁺ estimuladas em mastócitos RBL.....	29
6.2. Quercetina e PAO inibem alterações morfológicas em mastócitos RBL induzidas por antígeno.....	39
6.3. PAO e quercetina inibem a internalização de complexos IgE-FcεRI intercruzados	45
6.4. PAO e quercetina inibem a ressíntese de PtdIns(4,5)P ₂ na membrana plasmática	52
7. CONCLUSÃO.....	61
8. REFERÊNCIAS.....	62
CAPÍTULO 2.....	69
1. RESUMO.....	70
2. ABSTRACT.....	71
3. INTRODUÇÃO.....	72
3.1. Cumarinas.....	72
3.2. Biossensores baseados em mastócitos da linhagem RBL-2H3.....	75
4. OBJETIVOS.....	79
4.1. Objetivos específicos.....	79
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	79
5.1. Material.....	79
5.2. Métodos.....	80
5.2.1. Cultura celular.....	80
5.2.3. Ensaio direto (modelo biossensor) para a quantificação da liberação de β-hexosaminidase.....	80
5.2.3. Forma de análise dos resultados obtidos para a liberação de β-hexosaminidase	81
5.2.4. Ensaio para inibição da atividade da enzima β-hexosaminidase.....	82
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
7. CONCLUSÃO.....	108

8.REFERÊNCIAS.....	108
CAPÍTULO 3.....	114
1.RESUMO.....	115
2.ABSTRACT.....	116
3.INTRODUÇÃO.....	117
4.OBJETIVOS.....	120
4.1.Objetivos específicos.....	120
5.MATERIAL E MÉTODOS.....	120
5.1.Material.....	120
5.2.Métodos.....	121
5.2.1.Cultura celular.....	121
5.2.2.Medidas de Ca^{2+} intracelular.....	121
5.2.3.Ensaio padrão para a quantificação da liberação de β -hexosaminidase.....	122
5.2.4.Forma de análise dos resultados obtidos para a liberação de β -hexosaminidase	122
5.2.5.Ensaio para inibição da atividade da enzima β -hexosaminidase.....	123
5.2.6.Ensaio para quantificação da secreção de interleucina-4.....	124
5.2.7.Ensaio para análise de viabilidade celular.....	124
6.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	125
7.CONCLUSÃO.....	136
8.REFERÊNCIAS.....	136

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Alergias

O Instituto Americano de Alergia e Doenças Infecciosas define alergia como uma reação específica do sistema imune a uma substância normalmente inofensiva. Algumas destas substâncias alérgicas, também referidas como alérgenos ou antígenos, incluem pólen, pêlos de animais, poeira, alimentos e venenos de insetos (VASUVEDAN, L., 2009). As alergias podem afetar vários órgãos, mais comumente a pele, as vias respiratórias e o intestino, *i.e.* a interface entre o organismo e o ambiente (TRAIDL-HOFFMAN *et al.*, 2009).

Embora as alergias sejam há muito conhecidas – há descrições das mesmas registradas pela antiga civilização chinesa, bem como pela literatura grega – existe um amplo consenso de que a prevalência de muitas doenças alérgicas tem aumentado mundialmente ao longo das últimas décadas (RING *et al.*, 2001). Dados da Europa, Austrália, África e América do Norte parecem revelar mudanças significativas na epidemiologia das doenças alérgicas, com destaque para a rinite e asma alérgicas, de forma que tais dados representam muito mais do que apenas artefatos metodológicos (BUSSE, W.W., 2000). De fato, é possível afirmar que, durante os últimos cinquenta anos, países ditos “ocidentalizados” vivem em meio a uma verdadeira epidemia de alergias (DOWES *et al.*, 2011).

Não existe alergia sem exposição a um alérgeno. A exposição aos alérgenos, tanto em ambientes fechados como externos, foi alterada de forma considerável, tanto quantitativa quanto qualitativamente, durante as últimas décadas. Os hábitos alimentares apresentam uma maior tendência para comidas exóticas e apimentadas, além do consumo aumentado de *fast food* (RING *et al.*, 2001). O crescimento das populações urbanas sujeita seus habitantes a níveis elevados de poluição do ar e à condições de moradia cada vez mais confinadas e populosas, o que acaba por criar microclimas excelentes para a proliferação de fungos e acúmulo de poeira (BUSSE, W.W., 2000).

Embora a susceptibilidade para o desenvolvimento de reações alérgicas apresente um importante componente genético (HOLGATE e BROIDE, 2003), as interações com o propício ambiente, acima descrito, permitiram que a incidência das doenças alérgicas alcançasse proporções mundialmente alarmantes (HOLGATE e POLOSA, 2008). A Organização Mundial de Saúde estima que 300 milhões de indivíduos sofram de asma alérgica, com um incremento de 100 milhões de novos asmáticos até o ano de 2025 (KUPCZIK *et al.*, 2010). A rinite alérgica afeta cerca de 10-20% da população mundial

(SMALL e KIM, 2011). Somente nos Estados Unidos são encontrados cerca de 30-60 milhões de indivíduos acometidos por rinite alérgica, a quinta doença crônica mais comum neste país (TRAN *et al.*, 2011). Resultados da ISAAC, (*International Study of Asthma and Allergy in Childhood*) para o Brasil, mostraram que a prevalência média de rinite alérgica foi de 29,6% para adolescentes e 25,7% para crianças, enquanto que a prevalência média de asma foi de 19 e 24,3%, para os mesmos respectivos grupos. O Brasil pertence ao grupo dos países que apresenta as maiores taxas de prevalência de asma e rinite no mundo (IBIRAPINA *et al.*, 2008).

Enquanto muitos pacientes reduzem os sintomas das alergias a simples inconveniências, ao invés de enxergar tais condições como verdadeiras doenças, o tributo econômico gerado pelas alergias não pode ser subestimado (TRAN *et al.*, 2011). Estima-se que, nos Estados Unidos, os gastos diretos com visitas médicas e medicações prescritas para o tratamento de rinite alérgica fiquem em torno de 4,5 bilhões de dólares, anualmente. Os gastos indiretos, correspondentes a dias de trabalho e aula perdidos, ficam estimados em 4 bilhões de dólares (CAMELO-NUNES e SOLÉ, 2010).

Apesar das diversas terapias oferecidas, o controle dos sintomas das doenças alérgicas, para muitos pacientes, permanece em níveis subótimos. Portanto, tratamentos adicionais, que façam uso de agentes com mecanismos de ação diferenciados, se fazem altamente desejáveis. A patofisiologia destas doenças tem sido extensivamente estudada e esforços que traduzam este conhecimento em novos medicamentos estão em curso (MASUDA e SHIMITZ, 2008).

1.2. Mastócitos

Os mastócitos foram descobertos no final do século XIX por Paul Erlich devido à marcante e característica coloração de seus densos grânulos citoplasmáticos, os quais contêm mediadores vasoativos (PRUSSIN e METCALFE, 2003). Tratam-se de células do sistema imune derivadas de células progenitoras hematopoiéticas e positivas para os marcadores CD34, CD117 e CD13 (TAYLOR e METCALFE, 2001). As células progenitoras, originárias da medula óssea, circulam no sangue e na linfa como células indiferenciadas e, subsequentemente, migram para tecidos periféricos, onde proliferam e se diferenciam em mastócitos maduros (TAYLOR e METCALFE, 2001).

Em vertebrados, os mastócitos estão amplamente distribuídos por tecidos vascularizados, particularmente aqueles próximos à superfícies expostas ao ambiente externo, incluindo a pele, vias respiratórias e o trato gastro-intestinal. Juntamente com as células dendríticas, os mastócitos estão bem posicionados para atuarem como umas das primeiras células do sistema imune a interagirem com antígenos e toxinas ambientais, ou patógenos invasores (GALLI e TSAI, 2010).

Os mastócitos ocupam um nicho crítico nas imunidades inata e adquirida, onde, dependendo das circunstâncias, estas células podem perturbar ou auxiliar no reestabelecimento da homeostase, com consequências que podem tanto promover a saúde como contribuir para a doença. Neste contexto, os mastócitos, mais conhecidos por seu papel nas desordens alérgicas, também podem exacerbar modelos de autoimunidade, aumentar a sensibilização e/ou fases efetoras de certas respostas de hipersensibilidade de contato cutânea e aumentar a inflamação e mortalidade durante algumas infecções bacterianas severas. Por outro lado, estas mesmas células podem limitar a inflamação e o dano tecidual: os mastócitos promovem resistência do hospedeiro a certos modelos bacterianos e de infecção parasitária, limitam a patologia durante respostas de imunidade adquirida a antígenos e têm propriedades adjuvantes que podem aumentar o desenvolvimento da proteção imune contra patógenos (GALLI e TSAI, 2010).

Os mastócitos têm a capacidade de liberar, rapidamente, uma ampla variedade de mediadores, tais como histamina, proteoglicanas, proteases e citocinas específicas (mediadores pré-formados). Outros mediadores são sintetizados *de novo* e incluem leucotrienos, prostaglandinas e o fator de agregação plaquetária (PAF) (mediadores neo-formados). Os mastócitos também são capazes de organizar uma resposta tardia, através da transcrição, tradução e secreção de uma ampla gama de citocinas imunorregulatórias e fatores de crescimento (mediadores neo-sintetizados) (TAYLOR e METCALFE, 2001; STONE *et al.*, 2010). Estas células também têm a capacidade única de sofrer múltiplos ciclos de liberação de mediadores e de responder a múltiplos estímulos, visto que um mastócito pode permanecer localizado em um tecido por pelo menos alguns meses (TAYLOR e METCALFE, 2001).

1.3. Ativação de mastócitos via IgE e liberação de mediadores alérgicos

Em uma resposta inflamatória alérgica, células apresentadoras de antígeno absorvem e processam um alérgeno na forma de pequenos fragmentos peptídicos, os quais são

apresentados, através de moléculas MHC de classe II, à células T *naive*, com o direcionamento destas células a favor de um fenótipo de células T *helper* tipo 2 (células T_{H2}) (HOLGATE e POLOSA, 2008). Células T_{H2} ativadas determinam rapidamente a expressão de CD40 ligante e a produção das interleucinas IL-4 e IL-13. A ligação destas citocinas, bem como de CD40, à células B, induzem estas células a promoverem a troca de classe de imunoglobulinas (Ig) a favor da síntese de IgE (STONE *et al.*, 2010) (**Figura 1**).

Figura 1. Síntese de IgE estimulada por um alérgeno. De forma resumida, células apresentadoras de antígeno (APC), por meio de moléculas MHC classe II (MHC II), levam à diferenciação de células T para T_{H2}, as quais levam à produção de IL-4 e IL-13, necessárias para induzir a produção preferencial de IgE por células B. Adaptado de Holgate e Polosa, 2008.

Uma vez produzidas, as moléculas de IgE ligam-se a receptores de alta afinidade, FcεRI, localizados na superfície de mastócitos e considerados o receptor central para a ativação destas células. O receptor FcεRI é um complexo tetramérico, que consiste de uma cadeia α, uma cadeia β e duas cadeias γ, estas últimas, ligadas por ponte dissulfeto (WU, L. C., 2010). A subunidade α do receptor FcεRI se liga à porção Fc da IgE e consiste de um domínio extracelular, um domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática curta. A subunidade β consiste de 4 domínios transmembrana com um único ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), este, um segmento de aminoácidos que contém resíduos canônicos de tirosina, os quais são fosforilados para dar início à transdução de sinais (CAMBIER, J. C., 1995). A subunidade dimérica γ apresenta um domínio ITAM em cada uma das duas cadeias (STONE *et al.*, 2010). Um esquema para a organização estrutural dos receptores FcεRI está ilustrado na **Figura 2**.

Figura 2. Estrutura polipeptídica do receptor de alta afinidade para IgE (FcεRI). A molécula de FcεRI é composta por 3 subunidades: uma cadeia α, que medeia a ligação com IgE, e três cadeias que contribuem para a sinalização intracelular, através de seus domínios ITAM, sendo uma cadeia β e um dímero de cadeias γ. Adaptado de Abbas *et al.*, 2000.

A ligação de IgE ao receptor FcεRI sensibiliza os mastócitos para um alérgeno específico, estabiliza o complexo receptor e causa um aumento substancial na expressão de FcεRI na superfície celular (MASUDA e SHIMITZ, 2008). A exposição subsequente de mastócitos, previamente sensibilizados, ao mesmo alérgeno multivalente, determina o inter cruzamento dos receptores FcεRI e o particionamento dos receptores agregados para microdomínios referidos como *lipid rafts*. Estes domínios são caracterizados por sua insolubilidade em alguns detergentes (não-inônicos) a 4°C e são enriquecidos em colesterol, esfingomielina, glicoesfingolípídeos e glicerofosfolípídeos saturados, além de um subconjunto de proteínas associadas à membranas, incluindo proteinoquinas da família Src (FIELD *et al.*, 1997; FIELD *et al.*, 1999). Foi demonstrado que a forma ativa da proteinoquinase Lyn está concentrada nestes domínios *raft*, no qual a referida quinase promove a fosforilação dos ITAMs de ambas subunidades β e γ de receptores FcεRI agregados (PAOLINI *et al.*, 1992; EISEMAN e BOLEN, 1992; FIELD *et al.*, 1995) e inicia uma cascata de sinalização intracelular como ilustra a **Figura 3**.

A fosforilação, mediada por Lyn, dos ITAMs das subunidades γ do receptor Fc ϵ RI, permite que a proteinoquinase citosólica relacionada às proteínas ZAP-70, Syk (*Spleen tyrosine kinase*), se associe ao receptor através de seus dois domínios SH2 (*Src Homology*) e seja, conseqüentemente, fosforilada e ativada (FIELD *et al.*, 1999). O recrutamento para o receptor e ativação de Syk promove a fosforilação da LAT (*Linker for activation of T cells*), uma proteína localizada nos *lipid rafts* da membrana plasmática. A fosforilação de LAT cria sítios de ligação para diversas proteínas sinalizadoras contendo domínios SH2, e permite que estas proteínas sejam fosforiladas e ativadas na membrana plasmática (SAITOH *et al.*, 2000). A partir da fosforilação da LAT e da formação de uma “plataforma macromolecular” para a ativação de proteínas, divergentes cascatas de sinalização são estabelecidas, as quais levam à liberação de mediadores alérgicos de natureza diversa (mediadores pré-formados, neo-formados e neo-sintetizados, CALLEJON, D. R., 2008).

A LAT ativada recruta proteínas adaptadoras para a membrana plasmática e ativa tais proteínas bem como fatores de troca GTP/GDP (guanosina trifosfato/difosfato), os quais geram a forma ativa das GTPases Ras/Rac. Estas últimas funcionam como um ativador alostérico da cascata de ativação das MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*). Uma vez ativada, a via das MAPK leva à fosforilação de fatores de transcrição nucleares, como a proteína JNK (*JUN amino-terminal kinase*), responsável pela produção de citocinas e fatores de crescimento (mediadores neo-sintetizados), os quais são secretados horas após o estímulo antigênico. Pela mesma via das MAPK ocorre a ativação da fosfolipase A₂ (PLA₂), a qual catalisa a conversão de fosfolipídeos de membrana em mediadores inflamatórios lipídicos como as prostaglandinas e leucotrienos (mediadores neo-formados) (ABBAS *et al.*, 2000).

A ativação da LAT também permite o translocamento da enzima fosfolipase C γ (PLC γ) do citosol para a membrana plasmática, onde a PLC γ catalisa a hidrólise de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PtdIns(4,5)P₂) para formar os segundos mensageiros inositol 1,4,5-trifosfato (InsP₃) e diacilglicerol (DAG) (BERRIDGE, M. J., 1993). InsP₃ liga-se a seu receptor no retículo endoplasmático e determina a liberação das reservas de Ca²⁺ do retículo para o citoplasma. A proteína STIM1 (*Stromal interaction molecule 1*), localizada no retículo endoplasmático, funciona como um sensor para Ca²⁺ e, devido à depleção das reservas deste íon mediada por InsP₃, STIM1 sofre alteração conformacional e oligomerização, eventos seguidos pela translocação desta proteína para regiões de justaposição entre o retículo endoplasmático e a membrana plasmática (LIOU *et al.*, 2005). Nestas junções, STIM1 acopla-se ao canal de Ca²⁺ Orai1/CRACM1 (*Ca²⁺ release activated channel*) para causar influxo de Ca²⁺ por meio de um processo denominado SOCE (*Store operated Ca²⁺ entry*)

(LEWIS, R. S., 2007). O aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} e a geração de DAG cooperam para a ativação da proteína quinase C (PKC), que, por sua vez, medeia a liberação exocítica dos conteúdos granulares pré-formados (WU *et al.*, 2011). Os passos terminais que resultam na exocitose dos grânulos de mastócitos são processos complexos e bem coordenados. Estes envolvem o translocamento e docagem das vesículas secretórias para a membrana plasmática, seguidos da fusão e liberação do conteúdo granular para o meio extracelular (GADI *et al.*, 2011).

Após seu intercruzamento por um antígeno multivalente, evento que dispara a cascata de eventos de sinalização e ativação de mastócitos, os complexos $\text{Fc}\epsilon\text{RI-IgE}$ sofrem endocitose. De forma resumida, vesículas endocíticas, contendo complexos $\text{Fc}\epsilon\text{RI-IgE}$ fundem-se à organelas especializadas denominadas endossomos, a partir das quais os receptores e seus ligantes podem seguir diferentes destinos. De maneira simples, os endossomos podem ser classificados em endossomos iniciais ou tardios, de acordo com o tempo de aparecimento de marcadores endocíticos nestes compartimentos após a internalização dos complexos $\text{Fc}\epsilon\text{RI-IgE}$ (SORKIN e ZASTROW, 2002). Os complexos internalizados podem ser reciclados para a membrana plasmática a partir de endossomos iniciais ou mesmo a partir dos compartimentos de reciclagem dos endossomos tardios. Estes mesmos complexos podem, ainda, ser transportados para endossomos tardios e lisossomos, nos quais estes complexos serão proteolísados (SORKIN e ZASTROW, 2002). O processo de endocitose, por si só, desempenha um papel importante no processo de transdução de sinais (OLIVER *et al.*, 2007). A endocitose é comumente aceita como um processo que leva ao término do processo de sinalização, em função da degradação dos complexos ligante-receptor ativados (FATTAKHOVA *et al.*, 2006). Contudo, é grande o número de evidências que indicam claramente que o processo de sinalização, iniciada pelo receptor, pode continuar mesmo após sua endocitose, de forma que estes sinais podem ser qualitativamente diferentes daqueles sinais iniciados na superfície celular (FATTAKHOVA *et al.*, 2006).

Figura 3. Esquema via de transdução de sinais em mastócitos. O intercruzamento de receptores FcεRI por um antígeno multivalente leva ao deslocamento dos receptores agregados para os *lipid rafts*, onde o receptor é fosforilado pela forma ativa de Lyn. O recrutamento para o receptor e ativação de Syk permite a fosforilação de LAT. LAT permite que a transdução de sinais seja divergida em cascatas que levarão à síntese e secreção de mediadores lipídicos e citocinas, através da ativação da via das MAP quinases, além de ativar a PLCγ, iniciando a via de sinalização para a degranulação mastocitária.

1.4. Mastócitos como alvo farmacológico para o tratamento de doenças alérgicas

As opções atuais de tratamento para as condições alérgicas incluem 1) evitar a exposição ao alérgeno, o que é frequentemente impraticável; 2) estratégias terapêuticas baseadas em imunoterapias com o intuito de dessensibilizar um paciente com relação à um alérgeno específico, uma opção que demanda tempo e que se encontra em fase de otimização e 3) uso de medicamentos que antagonizam a produção ou ação de mediadores alérgicos, que é a estratégia mais comum. Neste contexto, os anti-histamínicos atuam como agonistas inversos que estabilizam os receptores para histamina em sua forma inativa; os descongestionantes, como a pseudoefedrina, são aminas simpatomiméticas que antagonizam a congestão causada por mediadores vasodilatadores; os antileucotrienos bloqueiam a ação de

mediadores lipídicos específicos, os quais controlam a vasodilatação, inchaço e secreção de mucosas; além dos corticosteróides que inibem a produção de uma gama de citocinas pró-inflamatórias, por afetarem a transcrição gênica das mesmas (MASUDA e SHIMITZ, 2008).

Foi demonstrado que a ativação de mastócitos humanos através do receptor para IgE altera significativamente a expressão gênica de mais de 2400 genes, muitos dos quais com funções inflamatórias (MASUDA e SHIMITZ, 2008). Estas informações, somadas ao fato de que os mastócitos desempenham um papel fundamental durante o desenvolvimento das reações alérgicas, como exposto anteriormente, permitem sugerir estas células como um interessante alvo de inibição para o desenvolvimento de novos fármacos anti-alérgicos.

2. CONTRIBUIÇÕES

O crescimento preocupante da incidência das doenças alérgicas, associado à participação crucial dos mastócitos durante o desenvolvimento de uma reação alérgica, impulsionaram o presente estudo, cujo objetivo é contribuir com o desenvolvimento de bioativos capazes de modular a resposta secretória de mastócitos ativados, como uma etapa inicial do planejamento de novos fármacos anti-alérgicos.

O entendimento dos eventos que permitem a transdução de sinais e ativação de mastócitos, do momento em que receptores FcεRI são agregados por um antígeno, até a exocitose de mediadores alérgicos, é fundamental para a compreensão dos mecanismos de ação de compostos que inibam a atividade de mastócitos, sendo esta a motivação para os estudos apresentados no **Capítulo 1**. Este capítulo trata dos efeitos da redução da síntese do fosfoinosítídeo PtdIns(4,5)P₂ sobre a sinalização de mastócitos mediada por IgE. Como descrito anteriormente, PtdIns(4,5)P₂ tem uma participação fundamental na ativação de mastócitos ativados por um antígeno por funcionar como um substrato para a geração dos segundos mensageiros InsP₃ e DAG. Recentemente, foi estabelecido também que PtdIns(4,5)P₂ desempenharia papéis importantes durante o tráfego de vesículas, remodelagem do citoesqueleto de actina e ativação de canais iônicos e transportadores de membrana, conforme discutido em maiores detalhes no **Capítulo 1**. Desta forma, foi estudado como a inibição da síntese deste fosfoinosítídeo, por meio do uso de inibidores farmacológicos, poderia afetar eventos de sinalização intracelular intimamente associados à renovação constante de PtdIns(4,5)P₂. Inicialmente, avaliou-se o efeito de níveis reduzidos de PtdIns(4,5)P₂ sobre as respostas de Ca²⁺ a um estímulo celular. Foi encontrado que a inibição aguda da síntese de PtdIns(4,5)P₂ inibe rapidamente o influxo de Ca²⁺. A migração de

mastócitos em direção a um patógeno ou quimioatraente depende da dinâmica remodelagem do citoesqueleto e da polimerização de filamentos de actina. Neste sentido, foi encontrado que a inibição da síntese de PtdIns(4,5)P₂ impede a alteração da morfologia de mastócitos estimulados por um antígeno. Como mencionado anteriormente, a endocitose de complexos FcεRI-IgE, agregados por um antígeno, é um regulador chave para a sinalização de mastócitos. Dentro deste contexto, foi observado que a síntese reduzida de PtdIns(4,5)P₂ impediu que complexos FcεRI-IgE intercruzados e internalizados seguissem a via normal de endocitose. Estes resultados apontam a síntese de PtdIns(4,5)P₂ como um alvo em potencial para o desenvolvimento de inibidores da ativação de mastócitos.

Os **Capítulo 2** e **3** têm como principal foco destacar novos compostos, de origem natural ou sintética, como inibidores da secreção de mastócitos. O **Capítulo 2** apresenta os resultados do efeito inibitório de um conjunto de aril-cumarinas sobre a exocitose de mediadores alérgicos. Os estudos referentes a este capítulo não somente revelaram um grupo de novos compostos com potencial para inibir a resposta de mastócitos, como também reforçaram a aplicabilidade de um modelo biossensor baseado em mastócitos, para a triagem de bioativos moduladores da degranulação destas células.

Finalmente, no **Capítulo 3** estão descritos os resultados dos estudos que apresentaram a piridovericina, um metabólito isolado do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*, como um potente inibidor da degranulação de mastócitos. Estudos focados na compreensão do(s) alvos(s) moleculares de inibição deste composto revelaram que a piridovericina inibe substancialmente a mobilização de Ca²⁺ intracelular. Interessantemente, como provável efeito da piridovericina sobre a geração de transientes de Ca²⁺ nos mastócitos, foi observado também uma forte inibição da secreção estimulada de interleucina-4.

3. REFERÊNCIAS

ABBAS, K. A.; LITCHMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and Molecular Immunology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000.

BARSUMIAN, E. L.; ISERSKY, C.; PETRINO, M. G.; SIRAGANIAN, R. P. IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and non-releasing clones. **European Journal of Immunology**, v. 11, p. 317-323, 1981.

BERRIDGE, M.J. Inositol triphosphate and calcium signaling, **Nature**, v.361, p.315-325, 1993.

BUSSE, W.W. Mechanisms and advances in allergic diseases. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.105, p.S593-S598, 2000.

CALLEJON, D. R. **Estudo da interação de galectina-1 e mastócitos**. 2008. 122f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

CAMBIER, J. C. New nomenclature for the Reth motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL). **Immunology Today**, v.16, p.110, 1995.

DOWES, J.; BROOKS, C.; DALEN, C.; PEARCE, N. Importance of allergy in asthma: an epidemiologic perspective. **Current Allergy and Asthma Reports**, v.11, p.434-444, 2011.

EISEMAN, E.; BOLEN, J. B. Engagement of the high-affinity IgE receptor activates Src protein-tyrosine kinases, **Nature**, v.355, p.78-80, 1992.

ERICKSON, J.; KANE, P.; GOLDSTEIN, B.; HOLOWKA, D.; BAIRD, B. Cross-linking of IgE-receptor complexes at the cell surface – a fluorescence method for studying the binding of monovalent and bivalent haptens to IgE. **Molecular Immunology**, v.23, p.769-782, 1986.

FATTAKHOVA, G., MASILAMANI, M., BORREGO, F., GILFILLAN, A. M., METCALFE, D. D., COLIGAN, J. E. The high-affinity immunoglobulin-E receptor (FcεRI) is endocytosed by an AP-2/clathrin-independent, dynamin-dependent mechanism. **Traffic**, v.7, p.673-685, 2006.

FIELD, K. A.; HOLOWKA, D.; BAIRD, B. Compartmentalized activation of the high affinity immunoglobulin E receptor with membrane domains. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.42760-4280, 1997.

_____. FcεRI-mediated recruitment of p53/56^{lyn} to detergent-resistant membrane domains accompanies cellular signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.92, p.9201-9205, 1995.

_____. Structural aspects of the association of FcεRI with detergent-resistant membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.274, p.1753-1758, 1999.

GADI, D. Sequestration of phosphoinositides by mutated MARCKS effector domain inhibits stimulated Ca(2+) mobilization and degranulation in mast cells. **Molecular Biology of the Cell**, v.22, p.4908-4917, 2011.

GALLI, S. J.; TSAI, M. Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. **European Journal of Immunology**, v.40, p.1843-1851, 2010.

HOLGATE, S. T.; BROIDE, D. New Targets for allergic rhinitis – a disease of civilization. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v.2, p.1-12, 2003.

HOLGATE, S.T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nature Reviews: Immunology**, v.8, p.218-230, 2008.

- HOLOWKA, D.; METZGER, H. Further characterization of the beta-component of the receptor for immunoglobulin E. **Molecular Immunology**, v.19, p.219-227, 1982.
- IBIRAPINA, C. C.; SARINHO, E. S. C.; CAMARGOS, P. A. M.; ANDRADE, C. R.; FILHO, A. A. C. S. Allergic rhinitis: epidemiological aspects, diagnosis, and treatment. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.34, p.230-240, 2008.
- KUPCZIK, M.; HAAHTELA, T.; CRUZ, A. A.; KUNA, P. Reduction of asthma burden is possible through National Asthma Plans. **Allergy**, v.65, p.415-419, 2010.
- LEWIS, R. S. The molecular choreography of a store-operated calcium channel. **Nature**, v.446, p.284-287, 2007.
- LIU, J.; KIM, M. L.; HEO, W. D.; JONES, J. T.; MYERS, J. W.; FERREL, J. E.; MEYER, T. STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion triggered Ca^{2+} influx. **Current Biology**, v.15, p.1235-1241, 2005.
- MASUDA, E. S.; SHIMITZ, J. Syk inhibitors as treatment for allergic rhinitis. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v.21, p.461-467, 2008.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cyto-toxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.
- OLIVER, C.; FUJIMURA, A.; SOUZA, A. M. M. S.; CASTRO, R. O. SIRAGANIAN, R. P., JAMUR, M. C. Mast cell-specific gangliosides and FcεRI follow the same endocytic pathway from lipid rafts in RBL-2H3 cells. **Journal of Histochemistry and Biochemistry**, v.55, p.315-325, 2007.
- PAOLINI, R.; JOUVIN, M. H.; KINET, J. P. Phosphorylation and dephosphorylation of the high-affinity receptor for immunoglobulin-E immediately after receptor engagement and disengagement. **Nature**, v.353, p.855-858, 1991.
- PRUSSIN, C.; METCALFE, D. D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.111, p.S486-S493, 2003.
- RING, J.; KRÄMER, U.; SCHÄFER, T.; BEHRENDT, H. Why are allergies increasing? **Current Opinion in Immunology**, v.13, p.701-708, 2001.
- SAITOH, S.; ARUDCHANDRAN, R.; MANETZ, T. S.; ZHANG, W.; COMMERS, C. L.; LOVE, P. E.; RIVERA, J.; SAMELSON, L. E. ILAT is essential for FcεRI-mediated mast cell activation. **Immunity**, v.12, p.525-535, 2000.
- SORKIN, A.; ZASTROW, M. Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. **Nature Reviews in Molecular Cell Biology**, v.3, p. 600-614, 2002.
- SUBRAMANIAN, K.; HOLOWKA, D.; BAIRD, B.; GOLDSTEIN, B. The Fc segment of IgE influences the kinetics of dissociation of a symmetrical bivalent ligand from cyclic dimeric complexes. **Biochemistry**, v.35, p.5518-5527, 1996.

STONE, K. D.; PRUSSIN, C.; METCALFE, D. D. IgE, mast cell, basophils, and eosinophils. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.125, p.S73-80, 2010.

TAYLOR, M. L.; METCALFE, D. D. Mast cells in allergy and host defense. **Asthma and Allergy Proceedings**, v.22, p.115-119, 2001.

TRAIDL-HOFFMAN, C.; JAKOB, T.; BEHRENDT, H. Determinants of allergenicity. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.123, p.558-566, 2009.

TRAN, N. P.; VICKERY, J.; BLAISS, M.S. Management of rhinitis: allergic and non-allergic. **Allergy, Asthma et Immunology Research**, v.3, p.148-156, 2011.

VASUVEDAN, L. **Roles of phosphatidylinositol 4,5-biphosphate in FcεRI-mediated signaling in mast cells**. 2009. 203 f. Tese (Doutorado). Departamento de Química e Química Biológica – Universidade de Cornell, Ithaca, 2009.

WEETALL, M.; HOLOWKA, D.; BAIRD, B. Heterologous desensitization of the high affinity receptor for IgE (Fc epsilon R1) on RBL cells. **Journal of Immunology**, v.150, p.4072-4083, 1993.

WU, L. C. Immunoglobulin E receptor signaling and asthma. **The Journal of Biological Chemistry**, v.286, p.32891-32897, 2010.

CAPÍTULO 1

1. RESUMO

Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PtdIns(4,5)P₂) é um fosfolipídeo versátil que participa de vários eventos de sinalização associados à membranas biológicas. A produção de PtdIns(4,5)P₂ na membrana plasmática depende dos níveis de seu precursor, fosfatidilinositol 4-fosfato (PtdIns(4)P), este, sintetizado principalmente por duas enzimas intracelulares, fosfatidilinositol 4-quinases (PI4K) III α e III β ; sendo a última preferencialmente inibida pelo fármaco óxido de fenilsarsina (PAO). Foi encontrado que PAO e quercetina, outro inibidor de quinases lipídicas, inibem rapidamente as respostas de Ca²⁺ em células RBL estimuladas por antígeno, e que o influxo de Ca²⁺ ativado pela mobilização de Ca²⁺ intracelular, em células estimuladas por tapsigargina, é também inibido substancialmente pela quercetina. Além disso, quercetina e PAO são inibidores efetivos da ondulação da membrana plasmática e do espalhamento celular estimulados por antígeno, dois eventos independentes de Ca²⁺.

PAO e quercetina também inibem o desligamento de vesículas endocíticas da membrana plasmática formadas por complexos de receptores para IgE intercruzados. Estes resultados sugerem que estes compostos inibem a sinalização de receptores para IgE principalmente por interferirem com a síntese de PtdIns(4,5)P₂. Para caracterizar diretamente os efeitos destes agentes sobre a síntese de PtdIns(4,5)P₂, foi monitorado o reaparecimento do domínio PH-PLC δ 1-EGFP, um repórter específico para PtdIns(4,5)P₂, na membrana plasmática, após a hidrólise de PtdIns(4,5)P₂ induzida pelo ionóforo de Ca²⁺, A23187, seguida de quelação de Ca²⁺ extracelular com EGTA em excesso. Dentro destas condições, PtdIns(4,5)P₂ ressintetizado aparece, inicialmente, como agregados da ordem de micrômetros, localizado na ou próximo à membrana plasmática. A adição de quercetina, subsequente à hidrólise de PtdIns(4,5)P₂ induzida por A23187, inibe a resíntese de PtdIns(4,5)P₂ em tais agrupamentos, e PAO reduz a presença de PtdIns(4,5)P₂ na membrana plasmática enquanto aumenta o acúmulo de PtdIns(4,5)P₂ no complexo de Golgi. Estes resultados fornecem evidências de que a geração de PtdIns(4)P por PI4KIII α está dinamicamente acoplada às populações de PtdIns(4,5)P₂ da membrana plasmática que são importantes para o processo de sinalização intracelular ativadas pelos receptores de IgE em mastócitos.

2. ABSTRACT

Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) is a versatile phospholipid that participates in many membrane-associated signaling processes. PtdIns(4,5)P₂ production at the plasma membrane depends on levels of its precursor, phosphatidylinositol 4-phosphate (PtdIns(4)P), synthesized principally by two intracellular enzymes, PI4-kinases III α and III β ; the former is preferentially inhibited by phenylarsine oxide (PAO). We found that PAO and quercetin, another lipid kinase inhibitor, rapidly inhibit Ca²⁺ responses to antigen in RBL mast cells, and store-operated Ca²⁺ influx stimulated by thapsigargin is also substantially inhibited by quercetin. In addition, quercetin and PAO are effective inhibitors of antigen-stimulated ruffling and spreading in these cells, two Ca²⁺-independent processes. PAO and quercetin also inhibit pinching off of endocytic vesicles formed by crosslinking of IgE receptor complexes. These results suggest that these compounds inhibit IgE receptor signaling principally by interfering with PtdIns(4,5)P₂ synthesis. To directly characterize the effects of these agents on PtdIns(4,5)P₂ synthesis, we monitored the reappearance of the PtdIns(4,5)P₂-specific PH domain, PH-PLC δ 1-EGFP, at the plasma membrane after Ca²⁺ ionophore A23187-induced PtdIns(4,5)P₂ hydrolysis followed by Ca²⁺ chelation with excess EGTA. Under these conditions, re-synthesized PtdIns(4,5)P₂ initially appears as micron-sized patches at or near the plasma membrane. Addition of quercetin subsequent to A23187-induced PtdIns(4,5)P₂ hydrolysis inhibits PtdIns(4,5)P₂ re-synthesis in plasma membrane patches, and PAO reduces PtdIns(4,5)P₂ at the plasma membrane while enhancing PtdIns(4,5)P₂ accumulation at the Golgi complex. Taken together, these results provide evidence that PtdIns(4)P generated by PI4-kinase III α is dynamically coupled to PtdIns(4,5)P₂ pools at the plasma membrane that are important for downstream signaling processes activated by IgE receptors.

3. INTRODUÇÃO

3.1. Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato: uma molécula sinalizadora versátil

Fosfatidilinositol, um fosfolipídeo componente de membranas celulares, é formado por um grupo inositol, que compreende a cabeça de grupo hidrossolúvel deste lipídeo, ligado a duas cadeias de ácido graxo, por meio de um domínio glicerol, conforme esquema apresentado na **Figura 4** (VASUVEDAN, L., 2009).

Figura 4. Estrutura de um fosfatidilinositol. Fosfatidilinositol é composto de um grupamento inositol como cabeça de grupo, ligado à duas cadeias de ácido graxo por um grupamento glicerol.

O estudo destas espécies de lipídeo foi pioneirizado por Hokin e Hokin, no início da década de 1950, com a descoberta de derivados fosforilados do fosfatidilinositol, em uma variedade de tecidos (HECK *et al.*, 2007). Os fosfoinosítídeos, termo usado para se referir coletivamente aos derivados fosforilados do fosfatidilinositol, são gerados pela fosforilação reversível das posições D-3, D-4 e D-5 do anel inositol, em todas as combinações possíveis (D'ANGELO *et al.*, 2008). Como resultado, sete espécies distintas de fosfoinosítídeos são formadas e nomeadas de acordo com a posição do seu sítio de fosforilação, como ilustra a **Figura 5**.

Figura 5. Metabolismo de fosfoinosítídeos. Reações metabólicas que levam à geração dos sete fosfoinosítídeos, a partir de fosfatidilinositol (PtdIns). Reações indicadas por setas tracejadas foram apenas demonstradas *in vitro*. Adaptado de Di Paolo e De Camilli, 2006.

Fosfatidilinositol quinases específicas modificam, por fosforilação, as posições do grupamento inositol para produzir os fosfoinosítídeos indicados acima. As reações de fosforilação podem ser revertidas pela ação de fosfatases, que também atuam de maneira específica sobre os diferentes derivados de fosfatidilinositol. O balanço entre as atividades das fosfatidilinositol quinases e fosfatases, dentro dos diferentes compartimentos intracelulares, confere uma característica distinta ao metabolismo dos fosfoinosítídeos, que é sua precisa regulação espacial e temporal (DE MATTEIS e GODI, 2004). Desta forma, os derivados de fosfoinosítídeos podem se apresentar preferencialmente enriquecidos em determinadas organelas e compartimentos. Neste sentido, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PtdIns(4,5)P₂), está majoritariamente presente na camada interna da membrana plasmática, fosfatidilinositol (PtdIns) e fosfatidilinositol 4-fosfato (PtdIns(4)P) estão enriquecidos no

complexo de Golgi, enquanto que fosfatidilinositol 3-fosfato (PtdIns(3)P) atua como um marcador para compartimentos endossomais (DE MATTEIS e GODI, 2004).

PtdIns(4,5)P₂ constitui apenas 1% do total de fosfolipídeos localizados na membrana plasmática (McLAUGHLIN *et al.*, 2002), mas tem despertado grande atenção da comunidade científica durante a última década devido a sua habilidade em regular um grande número de eventos celulares. PtdIns(4,5)P₂ foi primeiramente estabelecido como um segundo mensageiro em vias de transdução de sinais por Berridge e colaboradores (1983), os quais demonstraram que a ativação, estimulada por agonistas, da fosfolipase C (PLC) resultava na clivagem de PtdIns(4,5)P₂ para a geração de inositol 1,4,5-trifosfato (InsP₃) e diacilglicerol (DAG) (BERRIDGE *et al.*, 1983). Subsequentemente, foi demonstrado que PtdIns(4,5)P₂ também serviria como substrato para fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) durante a síntese de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PtdIns(3,4,5)P₃), um regulador chave para a proliferação, migração, quimiotaxia, fagocitose, diferenciação e metabolismo celulares (CANTLEY, L.C., 2002). PtdIns(4,5)P₂ também tem sido implicado diretamente no controle de muitos processos, os quais incluem o tráfego vesicular, dinâmica de membranas, organização do citoesqueleto de actina e ativação de canais iônicos e transportadores (DI PAOLO e DE CAMILLI, 2006; BALLA *et al.*, 2009). Dada sua extraordinária versatilidade nos processos de sinalização celular, acredita-se que PtdIns(4,5)P₂ exista na forma de populações espacialmente e funcionalmente distintas (HINCHLIFFE, K., 2000; ODORIZZI *et al.*, 2000; JOHNSON *et al.*, 2008; CALLOWAY *et al.*, 2011).

Estudos recentes do grupo Baird-Holowka (Universidade de Cornell, EUA) têm destacado importantes papéis para PtdIns(4,5)P₂ durante a ativação de mastócitos. Vasuvedan e colaboradores (2009) forneceram evidências de que duas isoformas diferentes da enzima fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinase (PIP5K) sintetizam populações de PtdIns(4,5)P₂ na membrana plasmática funcionalmente diferentes, mais especificamente, com papéis distintos para a produção de InsP₃ estimulada por antígeno e para a SOCE (para revisão, ver capítulo de Introdução, **item 1.3**) (VASUVEDAN *et al.*, 2009). Mais recentemente, Calloway e colaboradores (2011) encontraram que a partição de PtdIns(4,5)P₂ entre domínios da membrana plasmática caracterizados pela ordenação lipídica, e resistentes a detergente, e domínios caracterizados pela desordenação lipídica e solubilização em detergente, regularia o acoplamento entre as proteínas STIM1 e Orai1 durante a ocorrência da SOCE (CALLOWAY *et al.*, 2011). Além disso, foi demonstrado que PtdIns(4,5)P₂ poderia facilitar o processo de degranulação de mastócitos, através de sua interação com a sinaptotagmina, um sensor para

Ca^{2+} que permanece ancorado à vesículas secretórias destas células (BAI *et al.*, 2004). Neste contexto, Gadi e colaboradores (2011) mostraram que se as populações de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, localizadas na membrana plasmática, se tornam inacessíveis, em função de sua interação estável com uma versão mutante da proteína MARCKS (*Myristoylated alanine-rich C-kinase*), esta última, um substrato da PKC; conseqüentemente, há um atraso na mobilização de Ca^{2+} e uma inibição da degranulação destas células, consistente com a necessidade de disponibilidade de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ para a ocorrência destes eventos (GADI *et al.*, 2011).

Os níveis limitantes de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ justificam a constante reposição deste lipídeo. $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ pode ser gerado a partir da fosforilação da posição D-5 de $\text{PtdIns}(4)\text{P}$, ou então por meio da fosforilação da posição D-4 de fosfatidilinositol 5-fosfato ($\text{PtdIns}(5)\text{P}$), como mostra a **Figura 6** (DI PAOLO e DE CAMILLI, 2006). Em células de mamífero, $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ é pelo menos 50 vezes mais abundante do que $\text{PtdIns}(5)\text{P}$ e, portanto, é amplamente aceito que a grande maioria de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ sintetizado deriva da fosforilação de $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ (KWIATKOWSKA, K., 2010). Desta forma, a produção de $\text{PtdIns}(4)\text{P}$, que ocorre a partir da fosforilação de PtdIns em sua posição 4, uma reação catalisada pela enzima fosfatidilinositol 4-quinase (PI4K), representa um ponto chave para a regulação da síntese subsequente de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$. Com base nestas informações, o presente estudo fez uso de inibidores da PI4K, nominalmente, os fármacos óxido de fenilarsina (PAO) e quercetina, como forma de redução da síntese de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$. O efeito da produção limitada de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ foi avaliado com base em eventos de sinalização mediados por IgE, os quais são passíveis de regulação por $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$.

Figura 6. Rotas metabólicas para a produção de PtdIns(4,5)P₂. PtdIns(4,5)P₂ pode ser produzido tanto via PtdIns(4)P como via PtdIns(5)P, embora a abundância de PtdIns(4)P em relação ao fosfoinosítídeo fosforilado na posição D-5 torne esta a primeira rota prevalente para a obtenção de PtdIns(4,5)P₂. A seta tracejada destaca que a via de síntese de PtdIns(5)P ainda não foi firmemente estabelecida. Adaptado de Balla e Balla, 2006.

4. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho apresentado no presente capítulo foi compreender como o processo de sinalização intracelular, desencadeado pela ativação dos receptores FcεRI para IgE, é afetado pela inibição da síntese de PtdIns(4,5)P₂, em células RBL-2H3.

4.1. Objetivos específicos

Avaliar o efeito da redução dos níveis de PtdIns(4,5)P₂ sobre os seguintes eventos de sinalização de mastócitos:

- o aumento estimulado da concentração de Ca²⁺ intracelular;
- a ondulação da membrana plasmática e do espalhamento celular, induzidos por antígeno;

- a internalização de endossomos contendo complexos IgE-FcεRI, após intercruzamento mediado por antígeno.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Material

O material mencionado abaixo foi utilizado sem tratamento prévio:

Meio mínimo essencial contendo sais de Eagle (MEM, Invitrogen, Gibco, Carlsbad, CA, EUA), soro bovino fetal (Invitrogen), sulfato de gentamicina (Invitrogen), tripsina-EDTA (Invitrogen), triton X-100 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), soro albumina bovina (BSA, Acros Organic, NJ, EUA), indicador de Ca^{2+} Fluo-4 AM (Invitrogen), sulfonpirazona (Sigma-Aldrich), quercetina (Sigma-Aldrich), óxido de fenilarsina (PAO, Sigma-Aldrich), gadolínio (Gd^{3+} , Sigma-Aldrich), EGTA (Sigma-Aldrich), Alexa568-faloidina (Invitrogen), Alexa555-Colera toxina B (A555-CtxB, Invitrogen), taptargina (Sigma-Aldrich) e forbol 1,2-dibutirato (Sigma-Aldrich). Os anticorpos Alexa488-IgE, IgG anti-coelho conjugada a Cy-5, Alexa555-IgG anti-coelho e anticorpo monoclonal de camundongo anti-GM130 foram adquiridos da Invitrogen. O anticorpo anti-fosfotirosina 4G10 conjugado a HRP (*horseradish peroxidase*) foi adquirido da Millipore (Billerica, MA, EUA).

- **Tampão de Tyrode:** composto de NaCl 135 mM; KCl 5 mM; MgCl_2 1 mM; CaCl_2 1,8 mM; D(+) glucose 5,6 mM e HEPES 20 mM (Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, NJ, EUA). Os sais foram dissolvidos em água Milli-Q e o pH da solução foi ajustado para 7,4. O tampão foi esterilizado por filtração em membrana com poro de tamanho 0,23 μm .

- **Anticorpo monoclonal específico para reconhecimento de dinitro-fenil (anti-DNP IgE):** foi purificado de células de fluido peritonial de ratos por cromatografia por afinidade (POSNER *et al.*, 1992) e cromatografia de filtração em gel (SUBRAMANIAN *et al.*, 1986).

- **Anti-DNP IgE conjugado a FITC (isotiocianato de fluoresceína), FITC-anti-DNP-IgE:** preparado como descrito anteriormente (ERICKSON *et al*, 1986).

- **Antígeno DNP-BSA:** foi preparado a partir da conjugação de BSA com um média de 15 grupos de DNP, conforme descrito por Weetal e colaboradores (WEETALL *et al.*, 1993).

- **4-metil-umbeliferil-*N*-acetil- β -D-glucosaminida (MUG):** uma solução estoque de MUG (Sigma-Aldrich) foi preparada pela solubilização de 46 mg do substrato em 1 mL de dimetilsulfóxido para uma concentração final igual a 0,12 M. A solução estoque foi armazenada em freezer a -20°C . Para cada experimento, foi utilizada uma solução, recém preparada, na concentração final de 1,2 mM, em tampão de Tyrode, pH 7,4.

5.2. Métodos

5.2.1. Cultura celular

Mastócitos da linhagem RBL-2H3 foram cultivados como monocamadas em MEM, suplementado com 15% de soro bovino fetal e 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina. As células foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 .

O subcultivo celular foi realizado a cada 2 ou 3 dias, em garrafas de 25 ou 75 cm^3 (Corning Incorp., Corning, NY, EUA), a 37°C e atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 , conforme descrito a seguir. As células foram suspensas na presença de 5 mL de tripsina-EDTA, por 5 minutos, e lavadas com meio de cultura (centrifugação por 5 minutos, 25°C , 1000 rpm, centrífuga Sorvall Legend, modelo Mach 1.6R). O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em meio de cultura a uma concentração de 1×10^6 células/mL.

5.2.2. Medidas de Ca^{2+} intracelular

Os níveis de Ca^{2+} citoplasmático foram medidos com o uso de um fluorímetro de estado estacionário, modelo SLM 8100C (SLM). Células RBL-2H3 (4×10^6 células/mL), suspensas em tampão de Tyrode/BSA, foram carregadas com o indicador de Ca^{2+} Fluo-4 AM (excitação em 490 nm, emissão de fluorescência em 520 nm) e sensibilizadas com anti-DNP IgE na presença de 0,5 mM de sulfinpirazona por 1h. Após lavagem com tampão de

Tyrode/BSA, as células foram ressuspensas em tampão de Tyrode, para uma concentração final na cubeta de 2×10^6 células/mL. No fluorímetro, as células foram mantidas sob agitação contínua e termostatizadas a 37°C , para posterior estímulo com $0,4 \mu\text{g/mL}$ de DNP-BSA, ou $0,2 \mu\text{M}$ de taspigargina, e tratamento com sucessivas adições de quercetina, PAO ou Gd^{3+} . A seguir, as células foram lisadas com a adição de triton X-100 $0,1\%$ para a obtenção do valor máximo de fluorescência do Fluo-4, a qual foi subsequentemente suprimida com 6 mM de EGTA para a obtenção de valores basais de fluorescência. Resultados de respostas de Ca^{2+} representativos foram expressos como a razão dos valores de fluorescência de Fluo-4 na presença, ou ausência, de fármacos pela diferença do valor de fluorescência entre aquele obtido após a adição de triton X-100 e aquele obtido após a adição de EGTA.

5.2.3. Ensaio para análise de ondulação da membrana plasmática e espalhamento de células aderidas, estimulados por antígeno

Células RBL-2H3, plaqueadas a uma densidade de subconfluência de $0,5 \times 10^6$ células/mL em discos do tipo MatTek de 35 mm (MatTek Corp., Ashland, MA, EUA), foram sensibilizadas com anti-DNP IgE por 24h. Em seguida, estas células foram lavadas com tampão de Tyrode e incubadas por 2 minutos com quercetina $20 \mu\text{M}$ ou PAO $2 \mu\text{M}$, seguido de estímulo celular com DNP-BSA ($0,5 \mu\text{g/mL}$) durante 10 minutos, a 37°C . Os mastócitos foram então fixados com o uso de uma solução de formaldeído 4% e glutaraldeído $0,1\%$ e permeabilizadas com triton X-100 $0,1\%$, para a posterior marcação de F-actina usando Alexa568-faloidina com objetivo de se visualizar o ondulamento da membrana plasmática (imagens focadas no dorso celular) e o espalhamento celular (imagens focadas no ventre celular). Imagens de microscopia confocal foram adquiridas com o uso de um sistema confocal de varredura a laser, modelo Leica TCS SP2 (Leica Microsystems, Exton, PA, EUA) acoplado a uma objetiva de imersão em água, aumento de $63\times$, modelo 63_0.9 NA, HCX APO L U-V-I. Para a quantificação do ondulamento da membrana plasmática, cerca de 200-300 células, para cada um de pelo menos três experimentos independentes, foram contadas e classificadas como células que sofreram, ou não sofreram, ondulação da membrana plasmática, ou ainda células que desenvolveram filopódias. Medidas de área celular de cerca de 20 células, para cada um de pelo menos 3 experimentos independentes, foram usadas para a quantificação de espalhamento celular. Tais medidas foram feitas com o uso do software ImageJ (National Institute of Health-NIH, EUA).

5.2.4. Ensaios para análise da internalização de complexos IgE/FcεRI agregados por antígeno

Para medidas da disponibilidade de IgE-FcεRI na superfície celular, antes e após o intercruzamento mediado por antígeno, células RBL-2H3 em suspensão (5×10^6 células/mL) foram sensibilizadas com 4 µg/ml de Alexa488-IgE por 45 minutos, a 37 °C. As células sensibilizadas foram então lavadas e ressuspensas em tampão de Tyrode e incubadas na presença, ou ausência, de PAO 2 µM ou quercetina 20 µM por 2 minutos, seguido pela adição de antígeno (0,4 µg/mL) por 20 minutos a 37 °C. As células foram então resfriadas a 4 °C, lavadas e incubadas por 60 minutos com anticorpo anti-Alexa488 de coelho (diluição 1:1000) e então lavadas e marcadas a 4 °C com anticorpo anti-coelho conjugado com Cy-5 (diluição 1:1000). Células marcadas foram fixadas com uma solução de formaldeído 4% e glutaraldeído 0,1% por 20 minutos, à temperatura ambiente, e então ressuspensas em solução de PBS/NaN₃ contendo 10 mg/mL de BSA. A marcação com Cy5 foi quantificada por citometria de fluxo (citômetro de fluxo modelo Beckman Coulter Epics XL-MCL, Ramsey, MN, EUA).

Para a localização subcelular de IgE-FcεRI, dentro de condições semelhantes às descritas acima, células aderentes foram plaqueadas por 24h a uma concentração de $0,5 \times 10^6$ células/mL em discos MatTek de 35 mm e então sensibilizadas com Alexa488-IgE por 2 horas a 37 °C. As células foram pre-incubadas, ou não, com PAO 2 µM ou quercetina 20 µM por 5 minutos, seguidos de estímulo antigênico por 10 minutos a 37 °C e fixação como acima descritos. Células fixadas foram marcadas com anticorpo anti-Alexa488 e então com anticorpo IgG anti-coelho marcado com Alexa555 (diluição 1:200), como descrito acima para as análises por citometria de fluxo. As distribuições de Alexa488 e Alexa555 foram visualizadas por meio de um sistema confocal a laser Zeiss 710 (Jena, Alemanha) com objetivas de imersão em óleo e aumento 63x 1.1 NA.

5.2.5. Medidas da acidificação de endossomos contendo complexos IgE-FcεRI

Para as medidas de acidificação, devido à endocitose, mastócitos RBL em suspensão (4×10^6 células/ml) foram sensibilizados com 5 µg/mL de FITC-IgE por 1h a 37°C, lavadas e ressuspensas em tampão de Tyrode para a monitorização da fluorescência de FITC como descrito previamente (MENON *et al.*, 1986). No fluorímetro, células sob agitação e termostatizadas a 37°C foram tratadas com PAO 2 µM ou quercetina 20 µM, seguidos do

tratamento celular com anti-IgE de coelho (diluição 1:200) a 37 °C. Medidas de fluorescência de FITC foram registradas em função do tempo.

5.2.6. Análise da síntese de PtdIns(4,5)P₂ na membrana plasmática

Células RBL-2H3 foram plaqueadas em discos de 35 mm MatTek a uma densidade de subconfluência de $0,5 \times 10^6$ células/mL e incubadas por 24h. Em seguida, estas células foram transfectadas transientemente com o plasmídeo que codifica PH-PLC δ ₁-EGFP, na concentração de 2 µg/disco, preparado de meio OptiMEM (Invitrogen), contendo FuGENE HD (0,8 µL/mL, Roche, Mannheim, Alemanha). Após incubação com os complexos DNA-FuGENE, por 1h, a 37 °C, as células foram tratadas com uma solução de 0,1 µM de forbol 1,2-dibutirato por 4h para otimizar a pinocitose e ingestão do DNA (GOOSE *et al.*, 2005). Em seguida, as células foram lavadas e mantidas incubadas em meio de cultura por 24h, a 37°C. Imediatamente antes da aquisição de imagens, as células foram lavadas com tampão de Tyrode e tratadas com A555-CtxB (diluição 1:1000) durante 15 minutos, à temperatura ambiente, com a subsequente lavagem das células. Para a aquisição das imagens de microscopia confocal, as células receberam 1,5 mL de tampão de Tyrode e foram mantidas a uma temperatura controlada de 37 °C durante todo o período de registro das imagens. A aquisição de imagens foi feita a cada 13 segundos por um intervalo de aproximadamente 25 minutos, o qual compreendeu o registro de imagens antes e após o estímulo celular com o ionóforo de Ca²⁺ A23187 (10 µM), seguido ou não do tratamento destas células com quercetina (20 µM) ou PAO (2 µM) para final quelatação de Ca²⁺ com EGTA (2 mM). A quantificação de fluorescência do domínio PH-PLC δ ₁-EGFP foi baseada na obtenção de um histograma correspondente ao perfil de fluorescência de um segmento de reta traçado ao longo do corpo da célula analisada. As análises foram realizadas com o auxílio do software ImageJ (SMITH *et al.*, 2010).

5.2.7. Ensaio para a quantificação da liberação de β -hexosaminidase

Medidas de degranulação de mastócitos mediadas por IgE foram determinadas como descrito por Naal e colaboradores (2004). Células RBL-2H3 foram inicialmente sensibilizadas com anti-DNP IgE (0,5 µg/mL) e cultivadas em placa de 96 poços (densidade 5×10^5 células/mL) por 24h. Após lavagem das células com tampão de Tyrode/BSA, estas foram tratadas por 15 minutos com diferentes concentrações de quercetina (0-100 µM) e

incubadas na presença DNP-BSA (100 ng/mL) por 1 hora a 37°C. A degranulação mastocitária foi parada em banho de gelo e então 25 µL do sobrenadante de cada poço foram transferidos para uma nova placa de 96 poços de fundo escuro, esta já contendo 100 µL/poço do substrato para a enzima β-hexosaminidase (MUG 1,2 mM), preparado em tampão acetato pH 4,5. A clivagem de MUG em metil-umbeliferona pela enzima β-hexosaminidase procedeu por 30 minutos, a 37 °C, e foi parada com a adição de 200 µL/poço de tampão carbonato, pH 10. Os controles para este ensaio incluíram amostras livre de estímulo (liberação espontânea de β-hexosaminidase), bem como amostras tratadas com 0,1% de triton X-100, para lise celular e liberação total de β-hexosaminidase para o sobrenadante. Medidas de fluorescência de metil-umbeliferona foram realizadas em um leitor de microplacas (BioTek, Winooski, VT, EUA), utilizando-se comprimentos de onda iguais a 360 e 450 nm, para excitação e emissão de fluorescência, respectivamente (NAAL *et al.*, 2004).

5.2.8. Western blot para análise da fosforilação de resíduos de tirosino-quinases

Células RBL-2H3 (4×10^6 células/ml) foram sensibilizadas por 24h com IgE anti-DNP (1 µg/mL) e, em seguida, tratadas com diferentes concentrações de quercetina, para subsequente estímulo da fosforilação de tirosino-quinases com DNP-BSA 0,1 µg/mL. Proteínas do lisado celular foram resolvidas por eletroforese em gel de poliacrilamida, 12,5% em SDS, e eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose. Após bloqueio da membrana para evitar reatividade não específica com 5% de gelatina de peixe (Sigma-Aldrich), estas membranas foram marcadas com anticorpo monoclonal anti-fosfotirosina 4G10 conjugado com *horseradish peroxidase* (diluição 1:2000). A imunoreatividade foi detectada com o uso de kit realçador de quimioluminescência (AMRESCO, Solon OH, EUA). O nível celular de β-actina foi usado para julgar o carregamento homogêneo das diferentes amostras. Para a quantificação dos western blots, as bandas referentes à proteína fosforilada Syk e à subunidade fosforilada β do receptor FcεRI foram analisadas. A quantificação dos experimentos foi expressa na forma de uma razão de intensidades relativas entre a banda de proteína correspondente às amostras tratadas com quercetina e àquelas correspondente ao controle (amostras somente estimuladas com antígeno). Intensidades em pixel das bandas proteicas foram determinadas por análise densitométrica das mesmas, as quais foram normalizadas em relação à intensidade da banda de β-actina, com o auxílio do software ImageJ.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Inibidores farmacológicos da síntese de fosfoinosítídeos inibem respostas de Ca^{2+} estimuladas em mastócitos RBL

Um estudo prévio demonstrou que concentrações micromolares de PAO causaram um aumento modesto da fosforilação de resíduos de tirosina, estimulado por antígeno, de uma série de proteínas de mastócitos RBL, consistente com a capacidade deste fármaco de inibir tirosino-fosfatases (ADAMCZEWSKI *et al.*, 1992). De certa forma surpreendente, foi demonstrado, também, que PAO inibiu a mobilização de Ca^{2+} e a consequente degranulação destas células. Subsequentemente, Wiedemann e colaboradores (1996) forneceram evidências de que a inibição da atividade da enzima PI4K por ambos, PAO e quercetina, levou à depleção concomitante dos níveis de $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ e $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, com a perda correlativa da responsividade secretória de células cromafins estimuladas (WIEDEMANN *et al.*, 1996).

Quatro diferentes isoformas da enzima PI4K foram clonadas e categorizadas como PI4K tipos II ou III, de acordo com a sensibilidade destas enzimas à adenosina e ao fármaco wortmannin, respectivamente (BALLA e BALLA, 2006). Tanto a PI4KII, como a PI4KIII, se apresentam nas formas α e β e contribuem para a produção de populações de $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ com distintas funções e localizações subcelulares. As enzimas PI4K tipo III são quase que totalmente citosólicas e encontram-se majoritariamente no retículo endoplasmático (III α) e no complexo da Golgi (III β), enquanto as enzimas tipo II encontram-se associadas integralmente com membranas celulares, por virtude da palmitoilação de múltiplos resíduos de cisteína localizados no domínio catalítico destas enzimas (JUNG *et al.*, 2011). Foi encontrado que PAO é um inibidor de PI4K tipo III com, relativamente, poucos efeitos sobre PI4K tipo II. Dentre as enzimas tipo III, PI4KIII α mostrou-se mais sensível ao efeitos de PAO do que PI4KIII β (BALLA *et al.*, 2002).

A quercetina é um flavonóide natural bastante conhecido (CHIRUMBOLO, S., 2010) com a capacidade de inibir PI4K e outras quinases por meio da competição entre este fármaco e moléculas de ATP pelo sítio ativo destas enzimas (MIDDLETON *et al.*, 2000). A capacidade da quercetina de inibir a degranulação de mastócitos, mediada por receptores para IgE, foi previamente estabelecida (FEWTRELL e GOMPERTS, 1977), mas os mecanismos responsáveis por esta inibição não foram determinados. A inibição dose-dependente da quercetina sobre a degranulação estimulada por antígeno foi confirmada no presente estudo, como mostra a **Figura 7**.

Figura 7. Quercetina inibe a degranulação mastocitária induzida por antígeno de forma dose-dependente. Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações de quercetina, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 $\mu\text{g/mL}$). Aliquotas do sobrenadante celular foram incubadas com MUG 1,2 mM e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de $*P < 0,05$ e $***P < 0,001$, em relação ao controle.

É de longa data reconhecido que respostas funcionais de mastócitos, tais como a degranulação mediada pela ativação de receptores FcεRI, requerem níveis elevados e sustentados de Ca^{2+} intracelular (MA e BEAVEN, 2009). A ativação, estimulada por antígeno, da enzima $\text{PLC}\gamma$ resulta na depleção, mediada por InsP_3 , das reservas de Ca^{2+} do retículo endoplasmático, o que por sua vez ativa a SOCE por meio dos chamados canais de Ca^{2+} ativados pela liberação de Ca^{2+} (*CRAC channels*) (VIG e KINET, 2009). Para investigar os mecanismos pelos quais PAO e quercetina inibem as respostas de Ca^{2+} mediadas por FcεRI em mastócitos RBL, os níveis de Ca^{2+} de células em suspensão foram monitorados pelo uso do indicador de Ca^{2+} , Fluo-4, e fluorimetria no estado estacionário.

Como mostra a **Figura 8A**, o estímulo antigênico de células RBL causou um aumento robusto da concentração citoplasmática de Ca^{2+} . A adição de 1 μM de PAO, após alguns minutos do estímulo, resultou na rápida inibição da resposta estimulada de Ca^{2+} , com um pequeno efeito inibitório adicional dado pelas adições subsequentes de 10 μM de quercetina e 1 μM de Gd^{3+} . Este último atua como um efetivo inibidor da SOCE nestas células (CALLOWAY *et al.*, 2011). Em outros experimentos, a adição de PAO em concentrações mais elevadas não aumentou significativamente a inibição das respostas de Ca^{2+} (observações de D. Holowka). De forma semelhante ao efeito do PAO sobre a mobilização de Ca^{2+} estimulada por antígeno, a adição de quercetina, na concentração de 10 μM , causou uma rápida inibição desta resposta, a qual não foi posteriormente inibida pelas adições subsequentes de PAO e Gd^{3+} (**Figura 8B**). Estes resultados sugerem que PAO e quercetina inibem o mesmo ou sobrepõem alvos moleculares.

Figura 8. PAO e quercetina inibem rapidamente a mobilização de Ca^{2+} induzida por antígeno. Células RBL, sensibilizadas com IgE anti-DNP e carregadas com Fluo-4, foram estimuladas com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 µg/mL) e posteriormente tratadas com PAO 1 µM, quercetina (Que) 10 µM e Gd^{3+} 1µM, como indicado. As identificações **A** e **B** indicam que os experimentos foram realizados separadamente.

Calloway e colaboradores (2011) forneceram evidências de que, além de seu papel como um substrato para a geração de influxo de Ca^{2+} mediado por InsP_3 , $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ desempenha também uma função na regulação da SOCE em células estimuladas com tapsigargina (CALLOWAY *et al.*, 2011). A tapsigargina atua como um ativador do acoplamento entre STIM1 e Orai1, através da depleção das reservas de Ca^{2+} do retículo endoplasmático, via inibição da ATPase SERCA (*Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase*), uma bomba de Ca^{2+} do retículo sarcoendoplasmático. Trata-se, portanto, de um estímulo para o influxo de Ca^{2+} que independe da produção de InsP_3 . Como mostra a **Figura 9**, a indução de SOCE pela tapsigargina não foi inibida por 1 μM de PAO, adicionado minutos após o estímulo celular. Entretanto, esta resposta foi substancialmente inibida por duas adições sucessivas de 10 μM de quercetina, com um efeito inibitório adicional decorrente da adição de 1 μM de Gd^{3+} .

A quantificação para os resultados de múltiplos experimentos, como aqueles apresentados nas **Figuras 8 e 9**, está resumida na **Figura 10**. Ela mostra que as respostas de Ca^{2+} ao estímulo antigênico foram rapidamente inibidas tanto pela quercetina como por PAO, e mostra também que a ativação de SOCE, independente de InsP_3 , i.e., estímulo celular com tapsigargina, é mais sensível à quercetina do que ao PAO.

Figura 9. PAO e quercetina inibem rapidamente a mobilização de Ca^{2+} induzida por tapsigargina. Células RBL, carregadas com Fluo-4, foram estimuladas com tapsigargina (tap, 200 nM) e posteriormente tratadas com PAO 1 μM , quercetina (Que) 10 μM e Gd^{3+} 1 μM , como indicado. As identificações **A** e **B** indicam que os experimentos foram realizados separadamente.

Figura 10. PAO e quercetina inibem rapidamente a mobilização de Ca^{2+} induzida por antígeno e tapsigargina. Representação quantitativa da inibição das respostas de Ca^{2+} estimuladas por antígeno (Ag) e tapsigargina (tap), na presença de quercetina (Qu) e PAO. Resultados expressam a quantificação de 3 experimentos independentes e barras de erro representam o desvio padrão da média destes três experimentos.

Foi demonstrado previamente que PAO inibe, de forma efetiva, a renovação de fosfoinosítídeos estimulada por antígeno, consistente com sua capacidade de inibir a liberação das reservas de Ca^{2+} do retículo endoplasmático, mediada por InsP_3 (ADAMCZEWSKI *et al.*, 1992). Para determinar de maneira mais direta se a quercetina inibe a mobilização de Ca^{2+} , através da inibição da liberação das reservas de Ca^{2+} estimulada por antígeno, examinou-se a resposta de Ca^{2+} ao antígeno na ausência de Ca^{2+} extracelular. Dentro destas condições, os transientes de Ca^{2+} observados são dependentes da liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático estimulada por InsP_3 (LEE *et al.*, 2005). A **Figura 11** mostra claramente que o transiente de Ca^{2+} gerado após estímulo antigênico foi fortemente inibido em células pré-tratadas com 20 μM de quercetina, consistente com um efeito da quercetina sobre a ativação da $\text{PLC}\gamma$ e/ou síntese de fosfoinosítídeos. A capacidade da quercetina de inibir SOCE estimulada por taspigargina é mais consistente com a possibilidade de inibição da síntese de fosfoinosítídeos por este fármaco.

Considerando que a quercetina mostrou ser capaz de inibir a ativação de uma variedade de quinases além das fosfatidilinositol quinases (MIDDLETON *et al.*, 2000), foi investigado se o efeito inibitório deste fármaco sobre a mobilização de Ca^{2+} , induzida por antígeno, poderia ser também atribuída à inibição de tirosinoquinases, as quais são ativadas por fosforilação, uma vez que os receptores $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ são intercruzados pelo antígeno. Como mostra a **Figura 12**, a quercetina, nas concentrações mais elevadas usadas neste estudo, causou alguma inibição da fosforilação da cadeia β do receptor $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$, um processo dependente de Lyn e da proteína de peso molecular 72, cuja fosforilação é dependente de Syk (BENHAMOU *et al.*, 1993); no entanto, tal inibição não foi estatisticamente significativa. Na concentração de 10 μM de quercetina, suficiente para inibir fortemente as respostas de Ca^{2+} ao antígeno, como mostrado anteriormente, nenhum efeito sobre a fosforilação das referidas quinases pôde ser observado.

Figura 11. Quercetina inibe transientes de Ca^{2+} induzidos por antígeno. Células RBL, carregadas com Fluo-4, foram estimuladas com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 $\mu\text{g/mL}$), após pré-tratamento com quercetina 20 μM (Que). Curva representativa para experimento realizado em triplicata.

A

B

Figura 12. Pequenas concentrações de quercetina não inibem a fosforilação de p72^{Syk} e da subunidade β do receptor Fc ϵ RI. (A) Células RBL, sensibilizadas com IgE anti-DNP, foram tratadas com diferentes concentrações de quercetina e a fosforilação dos resíduos de tirosina de p72^{Syk} e Fc ϵ RI- β foi estimulada por antígeno. O lisado celular foi analisado por SDS-PAGE e imunoblotting com anti-fosfotirosina. O controle de carregamento das amostras foi feito com marcação para β -actina. O blot ilustrado é representativo de três experimentos independentes. **(B)** Quantificação de três experimentos, onde barras de erro representam o desvio padrão da média. Análise estatística das médias por *One-way* ANOVA, seguida do teste de Dunnett revelou ausência de significância estatística entre as amostras tratadas com quercetina e as amostras controle.

Um estudo prévio forneceu evidências de que PI4KIII α seria uma PI4-quinase importante para a geração de populações de PtdIns(4,5)P₂ na membrana plasmática responsáveis por manter a sinalização de Ca²⁺, estimulada por angiotensina II em células HEK-293 que expressam o receptor para angiotensina AT_{1a} (BALLA *et al.*, 2008). Esta conclusão foi fortemente baseada na potente inibição de PI4KIII α por PAO, em comparação ao efeito deste fármaco sobre PI4KIII β ou outras PI4Ks. Os presente resultados são consistentes com um papel principal para PI4KIII α na sinalização de Ca²⁺ em mastócitos, visto que a mobilização de Ca²⁺, estimulada por antígeno, pôde se inibida por pequenas concentrações micromolares de PAO. A liberação de Ca²⁺ do retículo endoplasmático, estimulada por antígeno, foi inibida por PAO, o que pode ser correlacionado com o fato de que PAO inibiu seletivamente a fosforilação dos resíduos de tirosina da enzima PLC γ 1 (ADAMZEWSKI *et al.*, 1992). Devido ao fato de que esta isoforma da PLC é dependente da ativação de PI3K (BARKER *et al.*, 1998), o mecanismo para sua inibição é provavelmente dependente da inibição indireta da produção de PtdIns(3,4,5)P₃ por PAO.

Além disso, embora PAO não tenha inibido SOCE estimulado por tapsigargina, quando adicionado após o estímulo, este agente causou uma inibição substancial da SOCE quando adicionado pelo menos 10 minutos antes do estímulo (D. Holowka, resultados não-publicados). O fármaco wortmannin, quando utilizado nas concentrações de 10-20 μ M, atua como um inibidor de ambas as PI4-quinases III α e III β (BALLA e BALLA, 2006) e foi demonstrado que este agente também poderia causar uma inibição substancial da SOCE em mastócitos quando adicionado pelo menos 10 minutos antes do estímulo celular (BROAD *et al.*, 2001; CALLOWAY *et al.*, 2011). Wortmannin também inibe o acoplamento entre STIM1 e Orai1, sob estas mesmas condições (KORZENIOWSKI *et al.*, 2009; CALLOWAY *et al.*, 2011). O prolongado tempo de incubação, requerido para a inibição de PAO, é provavelmente devido à necessidade de que haja o consumo das populações de PtdIns(4)P, localizadas na membrana plasmática, antes que a inibição se torne aparente (BALLA *et al.*, 2008). Em contraste aos inibidores específicos de PI4K, a quercetina causou a rápida inibição das respostas de Ca²⁺ estimuladas por tapsigargina, quando adicionada após o início do estímulo celular. Este resultado sugere que a quercetina apresenta um efeito mais direto sobre as populações de PtdIns(4,5)P₂ importantes para SOCE.

6.2.Quercetina e PAO inibem alterações morfológicas em mastócitos RBL induzidas por antígeno

Além da liberação de mediadores alérgicos pré-formados (como a histamina) e recentemente sintetizados (como leucotrienos), o intercruzamento dos receptores FcεRI por um antígeno multivalente também determina um aumento da polimerização de filamentos de actina e o ondulamento da membrana plasmática, este último processo também referido como *ruffling*. Para células aderidas, a ativação de mastócitos mediada por FcεRI resulta no achatamento e espalhamento celular sobre o substrato de adesão, além do ondulamento da membrana plasmática (PFEIFFER *et al.*, 1985, PFEIFFER *et al.*, 1994). As interações entre o citoesqueleto de actina e a membrana plasmática constituem a força motriz para a formação e retração de lamelipódios (ondulações da membrana plasmática ou *ruffles*), filopódios e processos de adesão celular, em resposta à presença de quimioatraentes e outros estímulos celulares (RAUCHER *et al.*, 2000).

O envolvimento de PtdIns(4,5)P₂ na formação de filamentos de actina fica evidenciado por estudos que mostram aumentos transientes de PtdIns(4,5)P₂ em sítios de remodelagem dinâmica do citoesqueleto, como aquele observado nos lamelipódios (HONDA *et al.*, 1999), além dos estudos que demonstram que a superexpressão de PIP5K, ou de uma fosfatase específica para PtdIns(4,5)P₂ denominada sinaptojanina, levam à formação ou desestruturação de filamentos de actina, respectivamente (JANMEY *et al.*, 1999). PtdIns(4,5)P₂ não parece afetar a formação de actina diretamente; seu efeito decorre de sua interação com uma variedade de proteínas que se ligam à actina. A polimerização da actina ocorre preferencialmente através da adição de monômeros de actina ao terminal de rápido crescimento (+) dos núcleos de actina. Três mecanismos foram propostos: *(i)* a nucleação *de novo* de filamentos de actina pelo complexo Arp 2/3, ativado primariamente pela família das proteínas WASP (*Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*), as quais são estimuladas por PtdIns(4,5)P₂; *(ii)* escapeamento das extremidades (+) de filamentos de actina pré-existentes pela dissociação destes filamento e das proteínas de capeamento como gelsolina e CapZ, um processo mediado por PtdIns(4,5)P₂ e *(iii)* a quebra de filamentos de actina existente, pela família de proteínas da gelsolina, ou pelo fator de despolimerização cofilina/actina, para desta forma aumentar os sítios de nucleação de actina. Ambas as duas últimas proteínas são inibidas por PtdIns(4,5)P₂ (YIN e JANMEY, 2003). Uma vez formados, os filamentos de actina podem ser intercruzados em redes e fibras de actina, as quais serão conectadas à membrana plasmática por meio de uma série de proteínas reguladoras de actina, tais como vinculina, α-actinina e talina. PtdIns(4,5)P₂ se liga e regula a atividade de todas as proteínas mencionadas (TAKENAWA e ITOH, 2001).

Com base no que foi exposto, foram explorados os efeitos de PAO e quercetina sobre as mudanças morfológicas, induzidas por antígeno, em mastócitos. Como descrito previamente (PFEIFFER *et al.*, 1985), a ativação antigênica de mastócitos leva estas células a terem sua característica superfície microvilosa, assim apresentada na ausência de estímulo, transformada em ondulações marcantes, como mostram as imagens de microscopia confocal focadas no dorso celular, as quais destacam a F-actina, marcada com Alexa568-faloidina (**Figura 13**, painel superior). A incubação celular com quercetina por alguns minutos não alterou a morfologia destas células, mas a adição do fármaco, previamente ao estímulo antigênico, impediu o desenvolvimento de tais ondulações na membrana plasmática, para a maioria absoluta das células analisadas (**Figura 13**, painel superior). A incubação com PAO não teve nenhum efeito sobre células não-estimuladas com antígeno, mas, em resposta ao antígeno, estas células pré-tratadas com PAO desenvolveram filopódios, os quais são definidos como finas projeções citoplasmáticas que se estendem em direção a um estímulo quimiotático, e que são formações bem menos dramáticas do que os lamelipódios (ondulações da membrana plasmática) (**Figura 13**, painel superior). Dessa forma, é possível sugerir que o pré-tratamento celular com PAO levou a uma inibição das alterações morfológicas induzidas pelo estímulo antigênico. A enumeração quantitativa destes fenótipos está resumida na **Figura 14A**.

Imagens de microscopia confocal focadas na interface célula-substrato revelam um aumento do espalhamento das células estimuladas com antígeno, em relação às células não-estimuladas (**Figura 13**, painel inferior). Estas imagens, juntamente com medidas quantitativas de área celular de um representativo número de células, apresentadas na **Figura 14B**, mostram que tanto PAO como a quercetina inibiram o espalhamento celular estimulado por antígeno. Além disso, estes inibidores de PI4K reduziram o aparecimento de placas de F-actina intensamente fluorescentes na superfície ventral de células estimuladas por antígeno. Foi demonstrado que tais placas estariam envolvidas no processo de adesão de mastócitos ao substrato, um evento importante para o aumento da degranulação celular (HAMAWY *et al.*, 1992).

Estes resultados mostram que tanto o PAO como a quercetina atenuam fortemente as mudanças morfológicas de células RBL induzidas por antígeno. Considerando que estas alterações de morfologia não são dependentes da mobilização de Ca^{2+} estimulada por antígeno (PFEIFFER *et al.*, 1985; NAAL *et al.*, 2003), os resultados implicam que os fármacos PAO e quercetina devem agir através da inibição de um evento necessário para a ocorrência de tais mudanças morfológicas que vão além do efeito destes agente sobre as

respostas de Ca^{2+} . Um processo importante tanto para a mobilização de Ca^{2+} como para a indução destas alterações de morfologia é a síntese de fosfoinosítídeos.

Figura 13. Ondulamento da membrana plasmática e espalhamento celular, induzidos por antígenos, são inibidos por PAO e quercetina. Células RBL, sensibilizadas com IgE anti-DNP, foram pré-tratadas com quercetina (Que) 20 μ M, ou PAO 2 μ M, por 2 minutos e então estimuladas com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,5 μ g/mL) por 10 minutos. As células foram fixadas e marcadas para F-actina com Alexa568-faloidina para análise por microscopia confocal.

Figura 14. Quantificação dos experimentos apresentados na Figura 13. Contagem de células para ondulamento (A) e medidas de área celular para espalhamento (B) foram obtidos de 3 experimentos independentes, com barras de erros representando desvio padrão. A diferença entre a área de células estimuladas por antígeno e tratadas ou não com inibidores foi estatisticamente analisada usando-se o teste t de Student e foram consideradas significativas quando $^{**}P < 0,01$. Que = quercetina, Ag, antígeno e MP = membrana plasmática.

Assim como observado para as respostas de Ca^{2+} estimuladas por antígeno, o forte efeito inibitório de pequenas concentrações de PAO sobre as mudanças de morfologia de mastócitos ativados aponta as populações de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, derivadas da atividade de $\text{PI4KIII}\alpha$, como reguladoras da polimerização da actina requerida para a ocorrência de tais eventos. A perda da função do gene *Stt4*, o qual codifica a enzima *Stt4p*, ortóloga da $\text{PI4KIII}\alpha$ em fungos, levou a defeitos na estabilidade da parede celular e causou a formação de um citoesqueleto de actina anormal nestes organismos (STRAHL e THORNER, 2007). Tais defeitos puderam ser remediados pela expressão do gene *Mss4*, o qual codifica a única PIP5K de fungos. Fungos que carregavam mutações para o gene *Stt4* ou para o gene *Mss4* falharam em desenvolver corretamente o citoesqueleto de actina (FOTI *et al.*, 2001). A sobreposição dos fenótipos observados como resultado da inativação dos genes *Stt4* e *Mss4* sugerem que $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ funciona com um precursor para $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ neste processo, ao invés de exercer um efeito direto sobre a organização do citoesqueleto de actina (D'ÂNGELO *et al.*, 2008), consistente com nossos resultados.

6.3. PAO e quercetina inibem a internalização de complexos IgE-FcεRI inter cruzados

A endocitose mediada por clatrina é seguramente o exemplo mais estudado de endocitose de receptores, o que de certa forma encobre a existência de rotas de endocitose adicionais e generaliza todos os eventos de endocitose de receptores de superfície como processos dependentes de clatrina (LAMAZE *et al.*, 2001). Na endocitose de receptores de membrana mediada por clatrina, esta proteína forma uma espécie de treliça poligonal, a qual envolve o receptor internalizado para formar vesículas internalizadas revestidas por clatrina que se mantêm ligadas à membrana plasmática. Estas vesículas invaginadas são posteriormente despreendidas da membrana plasmática para formar vesículas revestidas por clatrina localizadas no citoplasma.

Contudo, estudos convincentes estabeleceram a existência de processos de endocitose de receptores que independem de clatrina. Como exemplos, Lamaze e colaboradores (2001) mostraram que receptores para interleucina-2 (IL-2) de linfócitos poderiam ser internalizados eficientemente apesar da inibição da maquinaria endocítica baseada em clatrina (LAMAZE *et al.*, 2001). Da mesma forma, Sauvonnnet e colaboradores (2008) demonstraram que a subunidade γ c de receptores para citocinas também poderia ser internalizada por endocitose

independente de clatrina (SAUVONNET *et al.*, 2008). Interessantemente, ambos os receptores acima mencionados agregam-se e concentram-se em domínios *lipid rafts*, antes de serem endocitados, sugerindo que *lipid rafts* poderiam mediar processos de endocitose que independem de clatrina. Foi demonstrado que o receptor FcεRI também localiza-se nos *lipid rafts* após o seu intercruzamento mediado por antígeno (FIELD *et al.*, 1999; FATTAKHOVA *et al.*, 2006). De maneira similar, foi demonstrado que a endocitose de receptores FcεRI ligados, também requer uma via que não é mediada por clatrina, de forma que os receptores internalizados permaneceriam associados com estruturas componentes dos *lipid rafts* durante as etapas subsequentes da endocitose (FATTAKHOVA *et al.*, 2006).

Um número consistente de estudos indicou que a pequena GTPase, Arf6, atuaria como um componente regulador de vias endocíticas independentes de clatrina durante a reciclagem de membranas (BROWN *et al.*, 2001; AIKAWA *et al.*, 2005). Estas observações indicam que PtdIns(4,5)P₂ é um importante mediador deste processo, visto que Arf6 atua como um regulador da atividade de enzimas PIP5K (HONDA *et al.*, 1999). A expressão de Arf6Q67L, um mutante de Arf6 com atividade GTPase comprometida, resultou na ativação persistente de PIP5K e, portanto, na síntese extensiva de PtdIns(4,5)P₂. Como resultado, foi observado um forte aumento da invaginação e internalização da membrana plasmática (AIKAWA *et al.*, 2005).

Com base no que foi exposto, PtdIns(4,5)P₂ apresenta-se como um forte candidato para regulação da endocitose de receptores FcεRI. Para investigar esta questão, foi investigado, inicialmente, se a depleção dos níveis de PtdIns(4,5)P₂ afetaria a internalização de complexos IgE-FcεRI, induzida após estímulo antigênico. Para tanto, monitorou-se a disponibilidade na superfície celular de IgE conjugada à Alexa488, antes e após o estímulo antigênico, através de medição de citometria de fluxo. Para discriminar entre a IgE que foi internalizada e a que permaneceu disponível na superfície dos mastócitos, após o estímulo do processo de internalização, as células RBL-2H3 foram tratadas com anticorpo anti-A488, seguidos de um anticorpo secundário conjugado ao marcador fluorescente Cy5. O monitoramento, por citometria de fluxo, da fluorescência de Cy5, mostraram que, na ausência de antígeno, Alexa488-IgE está localizado na superfície celular, mas sua disponibilidade na superfície foi reduzida para aproximadamente 65% após o intercruzamento dos receptores FcεRI mediado por estímulo antigênico (**Figura 15**). A agregação dos receptores para IgE com antígeno, a 4 °C, reduziu a disponibilidade de anti-Alexa488 na superfície celular em menos de 5% (A. Singhai e D. Holowka, resultados não-publicados). A pré-adição tanto de

PAO 2 μ M como quercetina 20 μ M não preveniu de forma significativa que a acessibilidade de Alexa488 ao anticorpo anti-Alexa488 fosse reduzida após o estímulo celular com antígeno, ou seja, ambos os fármacos não inibiram a internalização estimulada de Alexa488-IgE.

Figura 15. Quercetina e PAO não afetaram a internalização estimulada de complexos IgE/Fc ϵ RI em células RBL suspensas. Células em suspensão, sensibilizadas com A488-IgE, foram pré-tratadas com 20 μ M de quercetina (Que) ou 2 μ M de PAO por 2 min, seguindo-se a ligação cruzada de IgE-Fc ϵ RI induzida por antígeno (Ag) a 37°C, por 20 minutos. As células foram então marcadas a 4°C com anticorpo primário anti-Alexa488 e com anticorpo secundário conjugado a Cy5 antes da fixação celular. A disponibilidade de IgE na superfície celular foi avaliada através de medidas de citometria de fluxo da fluorescência de Cy5. Os valores apresentados representam a média $\pm$ desvio padrão para três experimentos independentes e diferenças em relação ao controle foram consideradas estatisticamente não-significativas, quando analisadas pelo teste t de Student.

Uma vez internalizados, após seu intercruzamento mediado por antígeno, complexos IgE-FcεRI trafegam em direção ao lisossomos, onde serão degradados proteoliticamente (FURUICHI *et al.*, 1985). Devido ao fato de que os endossomos tardios, bem como os lisossomos, são acídicos (pH 4,5-5,5) (SORKIN e ZASTROW, 2002), este tráfego pode ser monitorado pelo uso de um indicador fluorescente, tal qual a fluoresceína, conjugado à IgE (FITC-IgE) (MENON *et al.*, 1984). Vale ressaltar que a fluoresceína é um marcador sensível ao pH, cuja fluorescência pode ser suprimida em pHs acídicos. É importante destacar ainda que, para estes experimentos de monitoramento da acidificação de complexos IgE-FcεRI internalizados, anti-IgE foi utilizada para intercruzar moléculas de FITC-IgE, ao invés de antígeno, com intuito de evitar a significativa supressão de fluorescência de FITC-IgE causada pela sua ligação com DNP-BSA, como demonstrado anteriormente (XU *et al.*, 1998).

Como mostra a **Figura 16**, a adição de anti-IgE à células sensibilizadas com FITC-IgE determinou uma diminuição da fluorescência de FITC, de forma tempo-dependente, consistente com a supressão da fluorescência de FITC em decorrência da endocitose de complexos FITC-IgE-FcεRI intercruzados e subsequente digestão destes complexos em compartimentos lisossomais. A pré-incubação destas células, com 2 μM de PAO ou 20 μM de quercetina, resultou em uma redução substancial da supressão de fluorescência de FITC induzida por anti-IgE, como exibido na **Figura 16**. Os resultados indicam que os complexos IgE-FcεRI aparentemente internalizados (como sugerido pelos resultados de citometria de fluxo) não puderam ser subsequentemente degradados nos lisossomos, dentro das condições estudadas. Considerando que a endocitose, assim como a subsequente acidificação, são eventos que independem da concentração intracelular de Ca^{2+} (BECKER *et al.*, 1973; FURUICHI *et al.*, 1984), é pouco provável que a capacidade destes agentes em inibir a acidificação endossomal seja decorrente de sua capacidade de inibir a mobilização de Ca^{2+} .

Figura 16. PAO e Qu inibem a acidificação de complexos IgE/FcεRI internalizados após estímulo com anti-IgE . Células RBL em suspensão foram sensibilizadas com FITC-IgE e tratadas com 20 μ M de Qu ou 2 μ M de PAO. Após agregação dos complexos IgE/FcεRI com anti-IgE no tempo=0, a acidificação destes complexos subsequente à sua internalização foi monitorada pela supressão de fluorescência de FITC-IgE.

Com o objetivo de entender como PAO e quercetina causam a inibição da acidificação dependente do intercruzamento de receptores FcεRI, enquanto permitem a perda da acessibilidade do anticorpo anti-Alexa488 à superfície dos mastócitos, foi avaliada a distribuição espacial de Alexa488-IgE, ligada ao receptor FcεRI, por imagens de microscopia confocal. Para este experimento, assim como para as medidas de citometria de fluxo, mastócitos foram sensibilizados com Alexa488-IgE e então estimulados ou não com antígeno por 10 minutos a 37 °C, na presença ou ausência de PAO ou quercetina. As células foram então fixadas e marcadas com anti-Alexa488 e um anticorpo secundário.

Como mostra a **Figura 17**, painel superior, o anticorpo anti-Alexa488 marcou uniformemente a membrana plasmática, além de suprimir a fluorescência de Alexa488-IgE neste mesmo compartimento. O intercruzamento de Alexa488-IgE mediado por antígeno causou a endocitose de uma ampla porcentagem dos complexos IgE-receptor, que, então, distribuíram-se pelo citoplasma e se tornaram inacessíveis à marcação por anti-Alexa488 e ao anticorpo secundário, como evidencia a **Figura 17**, segundo painel. Uma pequena porcentagem de Alexa488-IgE permaneceu localizada na membrana plasmática e sua marcação por anti-Alexa488 (em vermelho) foi fracamente visível nas ondulações (lamelipódios) da membrana plasmática induzidas por antígeno.

Interessantemente, o pré-tratamento celular com PAO, bem como com quercetina, seguido de estímulo antigênico, resultou na distribuição de Alexa488-IgE na forma de pequenos agregados, os quais localizaram-se majoritariamente na membrana plasmática, mas não puderam ser eficientemente marcados por anti-Alexa488 (**Figura 17**, dois painéis inferiores). O exame detalhado das distribuições de Alexa488-IgE, em verde, e de anti-Alexa488, em vermelho, revela que estes fluoróforos estão muito pouco correlacionados, embora ambos localizem-se na membrana plasmática. Estes resultados sugerem que tanto PAO, como quercetina, permitem a formação de endossomos contendo complexos IgE-FcεRI, entretanto estes falham em se desprender da membrana plasmática para posteriormente sofrerem digestão em compartimentos lisossomais.

Figura 17. PAO e quercetina inibem que endossomos contendo complexos IgE-FcεRI se desprendam da membrana plasmática. Células RBL aderidas foram sensibilizadas com Alexa488-IgE e tratadas ou não com 20 μ M de quercetina (Que) ou 2 μ M de PAO por 5 minutos, anterior ao estímulo antigênico (Ag, DNP-BSA, 0,5 μ g/mL) por 10 minutos a 37 °C. Após a fixação celular, a acessibilidade de IgE foi detectada por sua marcação com anti-Alexa488 e A555-anti-coelho para aquisição de imagens de microscopia confocal.

Os resultados mostram que a inibição da síntese de PtdIns(4,5)P₂ não impede a internalização de receptores FcεRI intercruzados, mas, uma vez internalizados, estes receptores permanecem ligados à membrana plasmática. Sauvonnnet e colaboradores (2008) demonstraram que a internalização do receptor γc, independente de clatrina, requer dinamina e a polimerização de actina (SAUVONNET *et al.*, 2008). Assim como os receptores γc, a endocitose de FcεRI foi inibida tanto pela expressão de uma versão mutante da dinamina (FATTAKHOVA *et al.*, 2006) quanto pela citocalasina D, um inibidor da polimerização de microfilamentos de actina (XU *et al.*, 1998). O desligamento de endossomos da membrana plasmática requer dinamina, a qual contém um domínio de ligação para PtdIns(4,5)P₂, além de um domínio carboxi-terminal rico em resíduos de prolina e arginina que se liga diretamente aos domínios SH3 de proteínas associadas à actina (ORTH e McNIVEN, *et al.*, 2003). Foi demonstrado que o uso de fármacos perturbadores da polimerização de actina, como a latrunculina A, causaram a paralização do processo de endocitose no estágio de invaginação de vesículas recobertas por clatrina, o que sugere que o citoesqueleto de actina provê a força que dirige o despreendimento vesicular da membrana plasmática (LMAZE *et al.*, 1997). Os efeitos de PAO e quercetina sobre a remodelagem do citoesqueleto de actina, induzido por antígeno, foram estudados e discutidos em seção anterior e estão de acordo com suas prováveis implicações para a inibição da endocitose de receptores FcεRI agregados.

6.4. PAO e quercetina inibem a ressíntese de PtdIns(4,5)P₂ na membrana plasmática

Para caracterizar diretamente os efeitos de PAO e quercetina sobre a síntese de PtdIns(4,5)P₂, a dinâmica deste fosfoinosítídeo na membrana plasmática foi monitorada através do uso do domínio PH (*Pleckstrin homology*) da enzima PLCδ₁, por ser conhecido que este domínio se liga com elevada especificidade a PtdIns(4,5)P₂ (STAUFFER *et al.*, 1998; VÁRNAI *et al.*, 1998). Desta forma, células RBL foram transientemente transfectadas com o plasmídeo codificador para PH-PLCδ₁-EGFP e, através da aquisição de imagens de microscopia confocal, pôde-se monitorar o metabolismo de PtdIns(4,5)P₂ quando da estimulação celular.

Como mostra a **Figura 18**, painel superior, para duas células representativas, mastócitos RBL transfectados com PH-PLCδ₁-EGFP exibiram uma distribuição homogênea desta proteína ao longo da membrana plasmática, consistente com a localização predominante de PtdIns(4,5)P₂ neste compartimento (MICHELL e HAWTHORNE, 1965). O tratamento

destas células com o ionóforo de Ca^{2+} A23187, e consequente ativação da enzima $\text{PLC}\gamma$, resultou na hidrólise de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, o que, por sua vez, causou uma translocação substancial do domínio PH da membrana plasmática para o citoplasma (**Figura 18**, segundo, terceiro e quarto painéis), consistente com uma depleção significativa de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, sob estas condições. Subsequente à hidrólise de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, estimulada por A23187, a quelação de Ca^{2+} extracelular com EGTA em excesso reduziu a atividade de $\text{PLC}\gamma$ e permitiu que a ressíntese deste fosfoinosítídeo fosse monitorada. Surpreendentemente, como mostra a **Figura 18**, quinto e subsequentes painéis, com a quelação de Ca^{2+} , o domínio PH- $\text{PLC}\delta_1$ -EGFP foi redistribuído frequentemente na forma de amplos agregados localizados próximos ou na membrana plasmática e se tornaram evidentes com 1 minuto da adição de EGTA, mantendo-se estáveis durante todo o período de aquisição de imagens (8-10 minutos). A organização de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ em tais agregados é semelhante aos chamados “*PIK patches*”, agrupamentos formados pela fosfoinosítídeo quinase Stt4p (BAIRD *et al.*, 2008). É importante destacar ainda que a presença de PH- $\text{PLC}\delta_1$ -EGFP, na membrana plasmática, com uma distribuição mais uniforme ao longo deste compartimento, tornou-se evidente após 5-8 minutos da adição de EGTA.

Interessantemente, o marcador para membrana plasmática, Alexa555-cólera toxina B (A555-CtxB), que inicialmente exibiu uma distribuição uniforme ao longo da membrana plasmática, passou também a se concentrar com PH- $\text{PLC}\delta_1$ -EGFP nos agregados localizados às margens da membrana plasmática, após a quelação de Ca^{2+} (**Figura 18**). É importante ressaltar que o marcador CtxB apresenta um particionamento preferencial pelos domínios *lipid raft* da membrana plasmática, o que sugere que tais agregados de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ poderiam ser formados majoritariamente em tais domínios. De fato, Hope e Pike descreveram os *lipid rafts* como domínios enriquecidos em lipídeos de inositol, em particular, $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ (HOPE e PIKE, 1996). Foi demonstrado que populações de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, localizadas em *lipid rafts*, regulariam localmente a dinâmica e organização da actina (CARONI *et al.*, 2001). Consistente com estes estudos, Johnson e colaboradores (2008) encontraram que níveis reduzidos de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ em domínios *raft* levaram à obtenção de células deficientes em lamelipódios e filopódios, os quais ocorrem em células normais, além de um aumento no número de bolhas (*blebs*) formadas na membrana plasmática (JOHNSON *et al.*, 2008). A hidrólise de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, após estímulo celular com A23187 também levou à formação de bolhas na membrana plasmática de células RBL, como mostram as **Figuras 18, 19A e 20**, segundo e terceiro painéis horizontais. Raucher e colaboradores (2000) demonstraram que baixos níveis de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ reduzem a energia de adesão entre o

citoesqueleto e a membrana plasmática, o que, associado à pressão causada pelo inchaço celular, levam à dissociação da membrana plasmática e do citoesqueleto subjacente, com a consequente formação de bolhas na membrana plasmática (RAUCHER *et al.*, 2000).

Figura 18. PtdIns(4,5)P₂ ressintetizado reaparece na membrana plasmática na forma de amplos agregados. Células RBL-2H3 foram transfectadas com o domínio PH-PLCδ₁ fundido à proteína GFP e estimuladas com 10 μM de A23187 por ~8min, seguidos da adição de 2 mM de EGTA por adicionais ~8min. Séries representativas de imagens de microscopia confocal de seções equatoriais de células foram adquiridas antes da ativação celular e em diferentes tempos seguindo-se a adição de A23187 e EGTA, a 37°C. As células foram incubadas com o marcador para membrana plasmática A555-CtxB por 15 min à temperatura ambiente, antes da aquisição de imagens.

Para testar a capacidade de PAO e quercetina em interferir com a ressíntese de PtdIns(4,5)P₂, após a hidrólise deste fosfoinosítídeo induzida por A23187, as células foram tratadas por 5 minutos com estes inibidores antes da adição de EGTA. Para as células tratadas com PAO, o recém-sintetizado PtdIns(4,5)P₂ reapareceu na membrana plasmática de maneira uniforme, mas a intensidade de fluorescência do domínio PH-PLCδ₁, foi bem menor, se comparada às células não tratadas com o fármaco, o que sugere uma síntese reduzida de PtdIns(4,5)P₂ na membrana plasmática (**Figura 19A**, quinto e subsequentes painéis). Interessantemente, um acúmulo adicional de PH-PLCδ₁-EGFP ocorreu em uma estrutura perinuclear semelhante ao complexo de Golgi (**Figura 19A**, quinto e subsequentes painéis). Imagens de microscopia confocal de células fixadas e marcadas com anticorpo para a proteína GM130, um marcador para a rede *cis*-Golgi, mostraram uma colocalização parcial entre esta proteína e PtdIns(4,5)P₂ marcado por PH-PLCδ₁-EGFP nesta região (**Figura 19B**). Estes resultados indicam que PAO altera a extensão e a distribuição subcelular das recém-sintetizadas populações de PtdIns(4,5)P₂. Como mencionado anteriormente, PI4KIIIβ é a PI4K majoritariamente localizada no complexo de Golgi (BALLA e BALLA, 2006). Godi e colaboradores (1999) demonstraram que PI4KIIIβ e PIP5K são recrutadas para o complexo de Golgi por Arf, onde ambas as fosfatidilinositol quinases serão responsáveis pela produção de consideráveis quantidades de PtdIns(4)P e PtdIns(4,5)P₂, implicados principalmente na manutenção da integridade estrutural da organela (GODI *et al.*, 1999).

Para células tratadas com quercetina, a ressíntese de PtdIns(4,5)P₂ próxima ou na membrana plasmática também foi reduzida, comparada às células controle, mas sem que houvesse o aparecimento notável de PtdIns(4,5)P₂ na região caracterizada como sendo o complexo de Golgi (**Figura 20**, quinto e subsequentes painéis). Assim como para as células não-tratadas com os fármacos, algumas células tratadas com quercetina exibiram a ressíntese de PtdIns(4,5)P₂ na forma de agregados localizados nas proximidades da membrana plasmática.

Com o objetivo de quantificar os efeitos de PAO e quercetina sobre a ressíntese de PtdIns(4,5)P₂ na membrana plasmática, determinou-se a razão entre a fluorescência de PH-PLCδ₁-EGFP na membrana plasmática por aquela encontrada no citoplasma, em um número significativo de células, como descrito no **item 5.2.6** deste capítulo. Como indicado na **Figura 21**, foi encontrado que 2 μM de PAO inibem a ressíntese de PtdIns(4,5)P₂ em cerca de 30% e que 20 μM de quercetina foi responsável por uma redução da síntese de PtdIns(4,5)P₂ em cerca de 60%. Com base nestes dados, pode-se sugerir que os efeitos

inibitórios de PAO e quercetina sobre a mobilização estimulada de Ca^{2+} e alterações de morfologia celular, assim como sobre a endocitose estimulada de receptores $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ agregados, são consistentes com um modelo em que a inibição da síntese estimulada de fosfoinosítídeos por estes compostos é primariamente responsável por seus efeitos sobre a sinalização mediada pelos receptores para IgE. A especificidade de PAO pela enzima $\text{PI4KIII}\alpha$ revela a grande importância desta quinase para a produção daquelas populações de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ que regulam os eventos estudados.

Figura 19. A adição de PAO causa a redução da ressíntese de PtdIns(4,5)P₂ na membrana plasmática, mas também resulta no seu aparecimento em regiões perinucleares próximas ou mesmo no complexo de Golgi. (A) Após a hidrólise de PtdIns(4,5)P₂ induzida por A23187, a qual foi monitorada pela translocação do domínio PH-PLC δ_1 -EGFP, da membrana plasmática para o citosol, células RBL foram tratadas com 2 μ M de PAO por 5 min antes da quelação de Ca²⁺ com EGTA. Imagens para duas células representativas são exibidas. (B) Células tratadas como em (A) foram fixadas e marcadas para *cis*-Golgi com anti-GM130, conjugado a Alexa647, para a obtenção de imagens de microscopia confocal.

Figura 20. O tratamento das células com quercetina reduz consideravelmente a ressíntese de PtdIns(4,5)P₂ na membrana plasmática. Após a hidrólise de PtdIns(4,5)P₂ induzida por A23187, a qual foi monitorada pela translocação do domínio PH-PLC δ_1 -EGFP, da membrana plasmática para o citosol, células RBL foram tratadas com 20 μ M de quercetina por 5 min antes da quelação de Ca²⁺ com EGTA. Imagens para duas células representativas são exibidas.

Figura 21. A ressíntese de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ na membrana plasmática é significativamente inibida por PAO e quercetina. Quantificação para ressíntese de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ na membrana plasmática. Os plots mostram a razão entre fluorescência de PH-PLC δ_1 -EGFP na membrana plasmática e àquela do citoplasma adjacente, determinada como descrita no **item 5.2.6**. Para cada condição, 30 células foram quantificadas, advindas de pelo menos 4 experimentos independentes. Barras de erro representam o desvio padrão da média, as quais foram consideradas significativas para $*P < 0,05$, em análises pelo teste t de student.

7. CONCLUSÃO

No presente capítulo, foram apresentados resultados acerca dos efeitos dos fármacos PAO e quercetina sobre eventos de sinalização desencadeados pela ativação de receptores FcεRI de mastócitos RBL-2H3. Foi demonstrado que a incubação celular com pequenas concentrações de ambos os agentes, rapidamente inibiu a mobilização estimulada de Ca^{2+} , bem como impediu que a morfologia de mastócitos fosse alterada, pela formação de ondulações na membrana plasmática e espalhamento das células aderidas ao substrato, em resposta ao estímulo antigênico. Foi demonstrado que, na presença de PAO e quercetina, complexos IgE-FcεRI são endocitados, seguindo o intercruzamento destes complexos mediado por antígeno, mas uma vez internalizados, estes endossomos não conseguem se desprender da membrana plasmática para posterior degradação em compartimentos lisossomais. Foi observado que a síntese estimulada de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ na membrana plasmática se deu na forma de agrupamentos deste fosfoinosítídeo da ordem de micrômetros. A síntese de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ em tal forma foi inibida por ambos PAO e quercetina. Considerando que PAO, quando usado em pequenas concentrações, como aquelas aplicadas no presente estudo, inibe com alta seletividade a enzima $\text{PI4KIII}\alpha$, este estudo fornece fortes evidências para a síntese de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ em domínios característicos localizados na membrana plasmática, por meio de uma via que está dinamicamente acoplada a síntese de $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ por $\text{PI4KIII}\alpha$, sendo tais populações de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ importantes para a produção estimulada de InsP_3 e para a sinalização intracelular de mastócitos ativados via receptores FcεRI.

Com base nos resultados apresentados, é possível afirmar ainda que PAO e quercetina podem atuar como ferramentas úteis para a exploração dos efeitos da síntese de fosfoinosítídeos em outros contextos de sinalização celular. Embora o PAO apresente efeitos inibitórios adicionais sobre tirosino-fosfatases, esta atividade resulta em consequências positivas para a sinalização mediada por receptores para IgE, e, portanto, podem ser facilmente distinguíveis de seus efeitos inibitórios sobre a síntese de $\text{PtdIns}(4)\text{P}$. Já a quercetina apresenta um efeito inibitório sobre a fosforilação estimulada de resíduos de tirosina, mas este ocorre em concentrações maiores do que aquelas necessárias para a inibição de Ptd-quinases. Em complemento a estudos baseados em genética molecular, estes compostos fonecem um ponto de partida para o entendimento de como a síntese de fosfoinosítídeos pode regular a sinalização celular.

Estes resultados também destacam que compostos bioativos, capazes de interferirem com a síntese de fosfoinosítídeos, podem comprometer a ativação de mastócitos e, portanto, apresentarem elevado potencial terapêutico como inibidores de respostas alérgicas.

8. REFERÊNCIAS

- ADAMCZEWSKI, M., PAOLINI, R., KINET, J. Evidence for two distinct phosphorylation pathways activated by high affinity immunoglobulin E receptors. **The Journal of Biological Chemistry**, v.267, p.18126-18132, 1992.
- AIKAWA, Y., MARTIN, T. F. ADP-ribosylation factor 6 regulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis, endocytosis, and exocytosis. **Methods in Enzymology**, v.404, p.422-431, 2005.
- BAI, J., TUCKER, W. C., CHAPMAN, E. R. PIP2 increases the speed of response of synaptotagmin and steers its membrane-penetration activity toward the plasma membrane. **Nature Structural and Molecular Biology**, v.11, p.36-44, 2004.
- BAIRD, D., STEFAN, C., AUDHYA, A., WEYS, S., EMR, S. D. Assembly of the PtdIns 4-kinase Stt4 complex at the plasma membrane requires Ypp1 and Efr3. **The Journal of cell Biology**, v.183, p.1061-1074, 2008.
- BALLA, A., BALLA, T. Phosphatidylinositol 4-kinases: old enzymes with emerging functions. **Trends in Cell Biology**, v.16, p.351-361, 2006.
- BALLA, A., KIM, Y. J., VARNAI, P., SZENTPETERY, Z., KNIGHT, Z., SHOKAT, K. M., BALLA, T. Maintenance of hormone-sensitive phosphoinositide pools in the plasma membrane requires phosphatidylinositol 4-kinase III α . **Molecular Biology of the Cell**, v.19, p.711-721, 2008.
- BALLA, T., SZENTPETERY, Z., KIM, Y. J. Phosphoinositide signaling: new tools and insights. **Physiology**, v.24, p.231-244, 2009.
- BALLA, A., TUYMETOVA, G., BARSHINAT, M., BEISZT, M., BALLA, T. Characterization of type II phosphatidylinositol 4-kinase isoforms reveals association of the enzymes with endosomal vesicular compartments. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, p.20041-20050, 2002.
- BECKER, K. E., ISHIZAKA, T., METZGER, H., ISHIZAKA, H., GRIMLEY, P. M. Surface IgE on human basophils during histamine release. **The Journal of Experimental Medicine**, v.138, p.394-409, 1973.
- BENHAMOU, M., RYBA, N. J. P., KIHARA, H., NISHIKATA, H., SIRAGANIAN, R. P. Protein-tyrosine kinase p72^{syk} in high-affinity receptor signaling. Identification as a component of pp72 and association with the receptor γ chain after receptor aggregation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.268, p.23318-23324, 1993.

BERRIDGE, M. J., DAWSON, R. M., DOWNES, C. P., HESLOP, J. P., IRVINE, R. F. Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. **Biochemistry Journal**, v.212, p.473-482, 1983.

BROAD, L. M., BRAUN, F., LIEVREMONT, J., BIRD, G. St. J., KUROSAKI, T., PUTNEY, J. W. Role of phospholipase C-inositol 1,4,5-triphosphate pathway in calcium release-activated calcium current and capacitative calcium entry. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.15945-15952, 2001.

BROWN, F. D., ROZELLE, A. L., YIN, H. L., BALLA, T., DONALDSON, J. G. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf-6 regulated membrane traffic. **The Journal of Cell Biology**, v.154, p.1007-1017, 2001.

CALLOWAY, N., OWENS, T., CORWITH, K., RODGERS, W., HOLOWKA, D., BAIRD, B. Stimulated association of STIM1 and Orai1 is regulated by the balance of PtdIns(4,5)P₂ between distinct membrane pools. **The Journal of Cell Science**, v.124, p.2602-2610, 2011.

CANTLEY, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**, v.296, p.1655-1657, 2002.

CARONI, P. Actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P₂ rafts. **The EMBO Journal**, v.20, p.4332-4346, 2001.

CHIRUMBOLO, S. The role of quercetin, flavonols and flavones in modulating inflammatory cell function. **Inflammation & Allergy-Drug Targets**, v.9, p.263-285, 2010.

D'ANGELO, G., VICINANZA, M., DI CAMPI, A., DE MATTEIS, M. A. The multiple roles of PtdIns(4)P- not just the precursor of PtdIns(4,5)P₂. **The Journal of Cell Science**, v.121, p.1955-1963, 2008.

DE MATTEIS, M. A., GODI, A. PI-losing membrane traffic. **Nature Cell Biology**, v.6, p.487-492, 2004.

DI PAOLO, G., DE CAMILLI, P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. **Nature Reviews**, v.443, p.651-657, 2006.

ERICKSON, J., KANE, P., GOLDSTEIN, B., HOLOWKA, D., BAIRD, B. Cross-linking of IgE-receptor complexes at the cell surface: a fluorescence method for studying the binding of monovalent and bivalent haptens to IgE. **Molecular Immunology**, v.23, p.769-781, 1986.

FATTAKHOVA, G., MASILAMANI, M., BORREGO, F., GILFILLAN, A. M., METCALFE, D. D., COLIGAN, J. E. The high-affinity immunoglobulin-E receptor (FcεRI) is endocytosed by an AP-2/clathrin-independent, dynamin-dependent mechanism. **Traffic**, v.7, p.673-685, 2006.

FEWTRELL, C. M. S., GOMPERTS, B. D. Effect of flavone inhibitors of transport ATPases on histamine secretion from mast cells. **Nature**, v.265, p.6335-636, 1977.

FIELD, K., HOLOWKA, D., BAIRD, B. Structural aspects of the association of FcεRI with detergent-resistant membranes. **Biological Chemistry**, v.274, p.1753-1758, 1999.

- FOTI, M., AUGHYA, A., EMR, S. D. Sac1 lipid phosphatase and Stt4 phosphatidylinositol 4-kinase regulate a pool of phosphatidylinositol 4-phosphate that functions in the control of the actin cytoskeleton and vacuole morphology. **Molecular Biology of the Cell**, v.12, p.2396-2411, 2001.
- FURUICHI, K., RIVERA, J., ISERSKY, C. The fate of IgE bound to Rat Basophilic Leukemia cells III. Relationship between antigen-induced endocytosis and serotonin release. **The Journal of Immunology**, v.133, p.1513-1520, 1984.
- FURUICHI, K., RIVERA, J., TRICHE, T., ISERSKY, C. The fate of IgE bound to Rat Basophilic Leukemia cells IV. Functional association between receptors for IgE. **The Journal of Immunology**, v.134, p.1766-1773, 1985.
- GADI, D., WAGENKNETCH-WIESNER, A., HOLOWKA, D., BAIRD, B. Sequestration of phosphoinositides by mutated MARCKS effector domain inhibits stimulated Ca^{2+} mobilization and degranulation in mast cells. **Molecular Biology of the Cell**, v.22, p.4908-4917, 2011.
- GODI, A., PERTILE, P., MEYERS, R., MARRA, P., DI TULLIO, G., IURISCI, C., LUINI, A., CORDA, D., DE MATTEIS, M. A. ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase- β and stimulates synthesis of PtdIns(4,5) P_2 on the Golgi complex. **Nature Cell Biology**, v.1, p.280-287, 1999.
- GOSSE, J. A., WAGENKNECHT-WIESNER, A., HOLOWKA, D., BAIRD, B. Transmembrane sequences are determinants of immunoreceptor signaling. **The Journal of Immunology**, v.175, p.2123-2131, 2005.
- HAMAWY, M. M., OLIVER, C., MERGENHAGEM, S. E., SIRAGANIAN, R. P. Adherence of rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells to fibronectin-coated surfaces enhances secretion. **The Journal of Immunology**, v.149, p.615-621, 1992.
- HECK, J. N., MELLMAN, D. L., LING, K., SUN, Y., WAGONER, M. P., SCHILL, N. J., ANDERSON, R. A. A conspicuous connection: structure defines function for the phosphatidylinositol-phosphate kinase family. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.42, p.15-39, 2007.
- HINCHLIFFE, K. Intracellular signaling: is PIP_2 a messenger too? **Current Biology**, v.10, p.R104-R105, 2000.
- HONDA, A., NOGAMI, M., YOKOZEKI, T., YAMAZAKI, T., NAKAMURA, H., WATANABE, H., KAWAMOTO, K., NAKAYAMA, K., MORRIS, A., FROHMAN, A. J., KANAHO, Y. Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase α is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. **Cell**, v.99, p.521-532, 1999.
- HOPE, H. R., PIKE, L. J. Phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzymes in detergent-insoluble lipid domains. **Molecular Biology of the Cell**, v.7, p.843-851, 1996.

JANMEY, P. A., XIAN, W., FLANAGAN, L. A. Controlling cytoskeleton structure by phosphoinositide-protein interactions: phosphoinositide binding protein domains and effects of lipid packing. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.101, p.93-107, 1999.

JOHNSON, C., CHICHILI, G. R., RODGERS, W. Compartmentalization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate signaling evidenced using targeted phosphatases. **The Journal of Biological Chemistry**, v.283, p.29920-29928, 2008.

JUNG, G., BARYLKO, B., LU, D., SHU, H., YIN, H., ALBANESI, J. P. Stabilization of phosphatidylinositol 4-kinase type II β by interaction with Hsp90. **The Journal of Biological Chemistry**, v.286, p.12775-12784, 2011.

KAPP-BARNEA, Y., MELNIKOV, S., SHEFLER, I., JEROMIN, A., SAGI-EISENBERG, R. Neuronal calcium sensor-1 and phosphatidylinositol 4-kinase β regulate IgE receptor-triggered exocytosis in cultured mast cells. **The Journal of Cell Immunology**, v.171, 0.5320-5327, 2003.

KORZENIOWSKI, M. K., POPOVIC, M. A., SZENTPETERY, Z., VARNAI, P., STOJILKOVIK, S. S., BALLA, T. Dependence of STIM1/Orai1-mediated calcium entry on plasma membrane phosphoinositides. **The Journal of Biological Chemistry**, v.284, p.21027-21035, 2009.

KWIATKOWSKA, K. One lipid, multiple functions: how various pools of PI(4,5)P₂ are created in the plasma membrane. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.67, p.3927-3946, 2010.

LAMAZE, C., FUJIMOTO, L. M., YIN, H. L., SCHIMID, S. L. The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.20332-20335, 1997.

LAMAZE, C., DUJEANCOURT, A., BABA, T., LO, C. G., BENMERAH, A., CAUTRY-VARSAT, A. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. **Molecular Cell**, v.7, p.661-671, 2001.

LEE, H., PARK, C., LEE, Y. M., SUKA, H. Y., CLEMONS, T. C. M., CHOI, O. H. Antigen-induced Ca²⁺ mobilization in RBL-2H3 cells: Role of I(1,4,5)P₃ and S1P and necessity of I(1,4,5)P₃ production. **Cell Calcium**, v.38, p.581-592, 2005.

MA, H., BEAVEN, M. A. Regulation of Ca²⁺ signaling with particular focus on mast cells. **Critical Reviews in Immunology**, v.29, p.155-186, 2009.

MCLAUGHLIN, S., WANG, J., GAMBHIR, A., MURRAY, D. PIP₂ and proteins: interactions, organization, and information flow. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v.31, p.151-175, 2002.

MENON, A. K., HOLOWKA, D., BAIRD, B. Small oligomers of immunoglobulin E (IgE) cause large-scale clustering of IgE receptors on the surface of Rat Basophilic Leukemia cells. **The Journal of Cell Biology**, v.98, p.577-583, 1984.

MENON, A. K., HOLOWKA, D., WEBB, W. W., BAIRD, B. Cross-linking of receptor-bound IgE to aggregates larger than dimers leads to rapid immobilization. **The Journal of Cell Biology**, v.102, p.541-550, 1986.

MICHELL, R. H., HAWTHORNE, J. N. The site of the diphosphoinositide synthesis in rat liver. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.21, p.333-338, 1965.

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

NAAL, R. M. Z. G., HOLOWKA, E. P., BAIRD, B., HOLOWKA, D. Antigen-stimulated trafficking from the recycling compartment to the plasma membrane in RBL mast cells. **Traffic**, v.4, p.190-200, 2003.

NAAL, R. M. Z. G., TABB, J., HOLOWKA, D., BAIRD, B. In situ measurement of degranulation as a biosensor based on RBL-2H3 mast cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v.20, p.791-796, 2004.

ODORIZZI, G., BABST, M., EMR, S. D. Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. **Trends in Biochemical Science**, v.25, p.229-235, 2000.

ORTH, J. D., McNIVEN, M. A. Dynamin at the actin-membrane interface. **Current Opinion in Cell Biology**, v.15, p.31-39, 2003.

PFEIFFER, J. R., OLIVER, J. M. Tyrosine-kinase dependent assembly of actin plaques linking Fc ϵ RI cross-linking to increased cell substrate adhesion in RBL-2H3 tumor mast cell. **The Journal of Immunology**, v.152, p.270-279, 1994.

PFEIFFER, J. R., SEAGRAVE, J. C., DAVIS, B. H., DEANIN, G. G., OLIVER, J. M. Membrane and cytoskeletal changes associated with IgE-mediated serotonin release from rat basophilic leukemia cells. **The Journal of Cell Biology**, v.101, p.2145-2155, 1985.

POSNER, R. G., LEE, B., CONRAD, D. H., HOLOWKA, D., BAIRD, B., GOLDSTEIN, B. Aggregation of IgE-receptor complexes on rat basophilic leukemia cells does not change the intrinsic activity but can alter the kinetics of the ligand-IgE interaction. **Biochemistry**, v.31, p.5350-5356, 1992.

RAUCHER, D., STAUFFER, T., CHEN, W., SHEN, K., GUO, S., YORK, J. D., SHEETZ, M. P., MEYERS, T. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton plasma membrane adhesions. **Cell**, v.100, p.221-228, 2000.

SAUVONNET, N., DUJEANCOURT, A., DAUTRY-VARSAT, A. Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of γ c cytokine receptor. **The Journal of Cell Biology**, v.168, p.155-163, 2005.

SMITH, N. L., HAMMOND, S., GADI, D., WAGENKNECHT-WIESNER, BAIRD, B., HOLOWKA, D. Sphingosine derivatives inhibit cell signaling by electrostatically neutralizing polyphosphoinositides at the plasma membrane. **Self/Nonsense**, v.1, p.133-143, 2010.

SORKIN, A., ZASTROW, M. Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. **Nature Reviews**, v.3, p.600-614, 2002.

SUBRAMANIAN, K.; HOLOWKA, D.; BAIRD, B.; GOLDSTEIN, B. The Fc segment of IgE influences the kinetics of dissociation of a symmetrical bivalent ligand from cyclic dimeric complexes. **Biochemistry**, v.35, p.5518-5527, 1996.

STAUFFER, T. P., AHN, S., MEYER, T. Receptor-induced transient reduction in plasma membrane PtdIns(4,5)P₂ concentration monitored in living cells. **Current Biology**, v.8, p.343-346, 1998.

STRAHL, T., THORNER, J. Synthesis and function of membrane phosphoinositides in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1771, p.353-404, 2007.

TAKENAWA, T., ITOH, T. Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1533, p.190-206, 2001.

VÁRNAI, P., BALLA, T. Visualization of phosphoinositides that bind pleckstrin homology domains: calcium- and agonist-induced dynamic changes and relationship to myo-[³H]inositol-labeled phosphoinositide pools. **The Journal of Cell Biology**, v.143, p.501-510, 1998.

VASUVEDAN, L. **Roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in FcεRI-mediated signaling in mast cells**. 2009. 203 f. Tese (Doutorado). Departamento de Química e Química Biológica – Universidade de Cornell, Ithaca, 2009.

VASUVEDAN, L., JEROMIN, A., VOLPICELLI-DALEY, L., DE CAMILLI, P., HOLOWKA, D., BAIRD, B. The β- and γ-isoforms of type I PIP5K regulate distinct stages of Ca²⁺ signaling in mast cells. **The Journal of Cell Science**, v.122, p.2567-2574, 2009.

VIG, M., KINET, J. Calcium signaling in immune cells. **Nature Immunology**, v.10, p.21-27, 2009.

WEETALL, M., HOLOWKA, D., BAIRD, B. Heterologous desensitization of the high affinity receptor for IgE (Fc epsilon R1) on RBL cells. **The Journal of Immunology**, v.150, p.4072-4083, 1993.

WIEDEMANN, C., SCHÄFER, T., BURGER, M. M. Chromaffin granule-associated phosphatidylinositol 4-kinase activity is required for stimulated secretion. **The EMBO Journal**, v.15, p.2094-2101, 1996.

XU, K., WILLIAMS, R. M., HOLOWKA, D., BAIRD, B. Stimulated release of fluorescently labeled IgE fragments that efficiently accumulate in secretory granules after endocytosis in RBL-2H3 mast cells. **The Journal of Cell Science**, v.111, p.2385-2396, 1998.

YIN, H. L., JANMEY, P. A. Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. **Annual Review of Physiology**, v.65, p.761-789, 2003.

CAPÍTULO 2

1. RESUMO

Devido à severidade das doenças alérgicas, à falta de tratamento adequado e à alta porcentagem de indivíduos que sofrem de várias formas destas condições, existe um grande interesse pela busca e desenvolvimento de substâncias capazes de inibir processos alérgicos. Neste contexto, derivados 3-arilcumarínicos emergem como compostos promissores para o tratamento de desordens desta natureza, uma vez que estes podem ser facilmente sintetizados e compartilham de notável semelhança estrutural com os flavonóides, cuja atividade anti-alérgica tem sido extensivamente reportada. O objetivo do presente trabalho é realizar a triagem de uma coleção de 3-aril-cumarinas e avaliar o potencial inibidor desses bioativos na degranulação de mastócitos, uma etapa chave para o desenvolvimento de reações alérgicas. Para isso, foi utilizado o modelo biossensor baseado em mastócitos da linhagem RBL-2H3, cujo ensaio *in vitro* possibilita essa triagem, com alta capacidade de processamento, e permite apontar algumas características estruturais, dentre estas cumarinas, importantes para sua atividade biológica. Os resultados mostraram, inicialmente, a viabilidade do modelo biossensor em discriminar, com elevada sensibilidade e reprodutibilidade, derivados cumarínicos que não afetaram, ou que causaram, diferentes graus de inibição da exocitose, estimulada por antígeno. Dentre as cumarinas ativas, foi possível destacar algumas substituições as quais puderam ser atribuídas à atividade inibitória de seus compostos, tais como a hidroxilação das posições 6, 8, 2' e 3' de 3-fenilcumarinas, assim como a substituição de 3-piperonilcumarinas com grupamentos 6-amino e 6-tiofen-2-il-metanimina. Desta forma, sugere-se que derivados 3-arilcumarínicos sejam candidatos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade anti-alérgica.

2. ABSTRACT

Due to the severity of allergic diseases, lack of adequate treatment, and high percentage of individuals who suffer from various forms of this condition, there is growing interest in the search for and development of substances capable of inhibiting allergic processes. In this context, 3-arylcoumarin derivatives emerge as promising compounds for the treatment of disorders of this nature, because they can be easily synthesized and closely mimic the structure of flavonoids, whose anti-allergic activity has been extensively reported. The aim of this work is to perform the screening of a set of 3-arylcoumarins and evaluate their inhibitory potential against mast cell degranulation, a key event for the development of allergic reactions. For that purpose, it was utilized a biosensor model based on RBL-2H3 mast cells, whose in vitro assay allows for that screening, in a high throughput fashion, and also permits pointing out some structural features, within those coumarins, that are important for their biological activity. The results showed, firstly, the feasibility of the mast cell-based biosensor to discriminate, with high sensitivity and reproducibility, between coumarin derivatives that unaffected or caused different degrees of inhibition of stimulated granule exocytosis. Among the active coumarins, some substituents could be accounted for the inhibition of their compounds, such as the hydroxylation of positions 6, 8, 2' e 3' of 3-phenylcoumarins, as well as the substitution of 3-piperonylcoumarins with 6-amino and 6-(2-phenyl-2-yl-)methanamine groups. In this way, 3-arylcoumarin derivatives are suggested to be promising candidates for the development of new drug with anti-allergic activity.

3. INTRODUÇÃO

3.1. Cumarinas

A cumarina, o membro mais simples do grupo dos heterociclos oxigenados denominado 1,2-benzopirona, está representada na **Figura 22** (SMYTH *et al.*, 2009). As cumarinas ocorrem naturalmente como metabólitos secundários de plantas, fungos e bactérias (SMYTH *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2009; RIVEIRO *et al.*, 2010).

Figura 22. Estrutura química da cumarina (1,2-benzopirona).

Até o momento, ao menos 1300 derivados cumarínicos foram isolados a partir de mais de 800 espécies de plantas e fungos (HOULT e PAYÁ, 1996; WU *et al.*, 2009). A inspeção das estruturas químicas destes compostos revela que múltiplas permutações e substituições podem ocorrer nos seis sítios disponíveis do núcleo cumarínico, o que prontamente contribui para explicar porque tantos compostos cumarínicos ocorrem naturalmente (HOULT e PAYÁ, 1996). Tamanha diversidade estrutural gerou, como consequência, uma classe de substâncias com uma ampla aplicabilidade biológica e farmacológica. Estudos de compostos cumarínicos revelaram que um vasto espectro de extratos de plantas medicinais, em uso desde períodos tão antigos como 1000 A.C., continham um alto teor de cumarinas (WU *et al.*, 2009). Desta forma, as cumarinas constituem uma classe importante de agentes farmacológicos detentora de uma ampla variedade de atividades fisiológicas, as quais incluem anti-câncer (WU *et al.*, RIVEIRO *et al.*, 2010), anti-coagulante (HOULT e PAYÁ, 1996), anti-inflamatória (KONTOGIORGIS e HADJIPAVLOU-LITINA, 2003; BISSONNETTE *et al.*, 2009; MELAGRAKI *et al.*, 2009; KANG *et al.*, 2009; CHAN *et al.*, 2010), anti-microbiana (WAFFO *et al.*, 2000; SMYTH *et al.*, 2009) e anti-oxidante (KONTOGIORGIS e HADJIPAVLOU-LITINA, 2003; MELAGRAKI *et al.*, 2009). De fato, foi estabelecido que esta família de compostos obedece

à regras de Lipinski e exibem elevada permeabilidade celular, as quais são características comuns encontradas na maioria dos fármacos disponíveis (GALKIN *et al.*, 2009).

A capacidade de derivados cumarínicos em inibir processos alérgicos também tem sido reportada. Choi e Yan (2009) demonstraram que a escoparona (6,7-dimetóxi-cumarina) inibe reações de anafilaxia cutânea passiva em ratos e reduz a liberação de histamina, a expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias, o influxo de Ca^{2+} e a ativação de p38 de mastócitos estimulados por antígeno (CHOI e YAN, 2009). Joo e colaboradores (2010) forneceram evidências para a atividade anti-alérgica do extrato etanólico de *Angelica gigas*, rico em cumarinas. Foi demonstrado, ainda, que este extrato reduz respostas alérgicas *in vivo* e inibe respostas de degranulação de mastócitos ativados (JOO *et al.*, 2010). Além disso, é responsável por uma redução drástica dos níveis induzidos de óxido nítrico sintetase e fator de necrose tumoral- α . (JOO *et al.*, 2010).

Em vista do potencial anti-alérgico das cumarinas, foi proposto para o trabalho apresentado no presente capítulo, o estudo dos efeitos de um conjunto de derivados cumarínicos, sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno. O conjunto de cumarinas sob investigação é formado por 3-arilcumarinas, divididas entre 3-fenilcumarinas e 3-piperonilcumarinas, como mostra a **Figura 23B**. Tratam-se de cumarinas sintéticas cuja produção foi reportada em trabalhos anteriores (MARCHI *et al.*, 2004; KABEYA *et al.*, 2007). É de grande importância ressaltar que a racionalização para a síntese destas cumarinas foi baseada na semelhança destes compostos com flavonóides (**Figura 23A**) (MARCHI *et al.*, 2004). Os flavonóides são potentes inibidores de processos alérgicos e seus efeitos inibitórios sobre a atividade de mastócitos têm sido extensivamente reportados (KAWAI *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2009; CHIRUMBOLO, S., 2010; LEE *et al.*, 2010), o que motivou a escolha deste conjunto de cumarinas para o estudo de suas propriedades como moduladoras da degranulação de mastócitos.

Figura 23. Estrutura química do flavonóide quercetina (A) e das 3-arylumarinas estudadas. A semelhança estrutural entre os derivados aril-cumarínicos e flavonóides, cuja atividade anti-alérgica é bem conhecida, motivou o estudo da atividade inibitória das cumarinas sobre a degranulação de células RBL-2H3.

3.2. Biossensores baseados em mastócitos da linhagem RBL-2H3

Biossensores são dispositivos analíticos que integram um componente biológico a um transdutor eletrônico, sendo este último responsável por converter o sinal biológico em uma resposta elétrica quantificável. O transdutor de sinais pode ser eletroquímico, acústico, óptico ou eletrônico (SCHELLER *et al.*, 2001). A função do biossensor dependerá da especificidade bioquímica do material biologicamente ativo (DURICK e NEGULESCO, 2001; STENGER *et al.*, 2001).

Os sensores biológicos que empregam células como elemento sensível constituem um campo emergente com inúmeras aplicações, incluindo a triagem para compostos com potencial farmacológico, monitoramento ambiental e diagnóstico clínico (CURTIS *et al.*, 2008). Estes sistemas podem dispor de bactérias e fungos (KARUBE I., 1989), células vegetais (SIDWELL e RECHNITZ, 1986), células animais (MARGINEAU e VAIS, 1990) e até mesmo tecidos completos (WIJESURIYA e RECHNITZ, 1993), o que lhes confere muitas vantagens sobre os dispositivos baseados somente em enzimas ou anticorpos (McCORMACK *et al.*, 1998), uma vez que as células são uma fonte de grande produção de proteínas em seu ambiente natural, onde os caminhos enzimáticos já estão otimizados e os cofatores, substratos e reagentes estão disponíveis. Além disso, os receptores e proteínas sinalizadoras, sensíveis a um analito, são mantidos e regenerados pela própria célula, conforme necessário (CURTIS *et al.*, 2008).

Os mastócitos oferecem um potencial excelente para a sua aplicação em biossensores uma vez que estas células são robustas e podem ser facilmente sensibilizadas para reconhecer antígenos específicos, o que conduz a eventos de ativação potencialmente transdutíveis, quando precedidos pela exposição antigênica (PAGE e PIZZICONI, 1997).

A linhagem de células RBL-2H3 (*Rat Basophilic Leukemia*), derivada de mastócitos de ratos, é bem apropriada para o emprego em sensores biológicos. Estas células crescem em cultura, associadas a substratos sólidos, e podem expressar mais do que 1×10^5 receptores FcεRI por célula. Ao contrário de mastócitos nativos, cujos receptores já são ligados à moléculas de IgE de especificidade desconhecida, as células RBL podem ser marcadas com IgE exógenas de especificidade conhecida e de acordo com o interesse do estudo (XU *et al.*, 1998). Como a ligação de IgE ao FcεRI é forte, o receptor pode ser totalmente ocupado em concentrações de IgE menores do que 5×10^{-10} M (aproximadamente 1 µg/mL). Além disso, somente poucas centenas de moléculas de FcεRI, na membrana celular, precisam ser inter cruzadas para disparar a exocitose de grânulos secretórios. Por esse motivo, os

mastócitos da linhagem RBL-2H3 podem ser sensibilizados com um anticorpo IgE simples e caracterizados como um sistema biossensor altamente sensível, apto para identificar moléculas inibidoras do processo de degranulação mastocitária.

Como consequência do processo de degranulação, uma série de mediadores alérgicos são secretados pelos mastócitos. Dentre estes mediadores, a histamina é certamente o mais estudado e esta desempenha papéis subsequentes nos processos alérgicos relacionados à ativação de outras células inflamatórias (PASSANTE e FRANKISH, 2009). Além da histamina, a enzima β -hexosaminidase também se encontra armazenada em grânulos secretórios e é liberada como consequência da degranulação estimulada por um antígeno. O papel da β -hexosaminidase em processos inflamatórios e alérgicos permanece desconhecido, embora hipóteses sugiram que esta enzima poderia atuar em conjunto com triptases e quimases no processo de degradação de glicoproteínas e proteoglicanas da matriz extracelular, um evento importante para a remodelagem de tecidos inflamados (PASSANTE e FRANKISH, 2009). Pelo fato de que a β -hexosaminidase é liberada em paralelo com a histamina, esta enzima tem sido amplamente empregada como um marcador para a degranulação de mastócitos (MATSUDA *et al.*, 2002; MORIKAWA *et al.*, 2003; KAWA *et al.*, 2003).

Neste sentido, ensaios biológicos para a quantificação de β -hexosaminidase têm sido extensivamente utilizados com o objetivo de monitorar a degranulação de mastócitos estimulados por um antígenos (NAAL *et al.*, 2004). Este ensaio é conveniente tanto para estudar os mecanismos de transdução de sinais que levam à exocitose (BAROODY, F. M., 2003), quanto para monitorar o potencial de novas células em bloquear a ativação e degranulação de mastócitos (GRANBERG *et al.*, 2001). Além disso, esse ensaio tem sido empregado para a detecção de antígenos que se ligam a imuno-complexos localizados na membrana de mastócitos (HOFFMANN *et al.*, 1999).

Métodos atuais para a quantificação de β -hexosaminidase usam substratos enzimáticos colorimétricos (SEREBRIISKI E GOLEMIS, 2000; AKETANI *et al.*, 2001) ou fluorimétricos (DEMO *et al.*, 1999; FISCHER e DE MOL, 1999). No presente estudo, fez-se uso do substrato fluorogênico metilumbeliferil-*N*-acetil- β -D-glucosaminida, o qual fornece o produto fluorescente metilumbeliferona, quando clivado pela enzima β -hexosaminidase, como ilustra a **Figura 24**.

Figura 24. Reação de clivagem de MUG para a formação do produto fluorescente metilumbeliferona. A enzima β -hexosaminidase catalisa a clivagem de metilumbeliferil-*N*-acetil- β -D-glucosaminida (MUG) para gerar o produto fluorescente metilumbeliferona. A quantificação da fluorescência de metilumbeliferona é frequentemente empregada como uma medida da degranulação de mastócitos.

O ensaio mais comumente empregado para a quantificação de mastócitos, referido no presente estudo como ensaio padrão, consiste em um número expressivo de etapas, as quais incluem a sensibilização celular com IgE, estímulo celular por um antígeno, aliquotamento do sobrenadante celular para a reação enzima-substrato (β -hexosaminidase-MUG) e medida de fluorescência da metilumbeliferona produzida. A reação enzima-substrato, para este ensaio, é tipicamente conduzida em pH 4,4, o qual é ótimo para a atividade da β -hexosaminidase. A reação é suprimida com o aumento do pH reacional de 4 para 10. Um fluxograma detalhado para este ensaio está ilustrado na **Figura 25**.

O considerável número de etapas que envolve este ensaio, incluindo a transferência do sobrenadante das células aderidas, tornam o ensaio padrão inadequado para análises que requeiram alta capacidade de processamento (*high-throughput analysis*). Para adaptar as condições deste ensaio a um modelo que permitisse a triagem, em tempo hábil, de um grande número de amostras com capacidade de inibir a degranulação de mastócitos, foi desenvolvido o chamado ensaio direto para a quantificação de β -hexosaminidase. Trata-se de um ensaio conduzido *in situ*, realizado em um número significativamente reduzido de etapas (**Figura 25**), que pode ser prontamente utilizado como um modelo biossensor baseado em mastócitos capaz de analisar um expressivo número de amostras com alta sensibilidade e reprodutibilidade (NAAL *et al.*, 2004).

Com base no que foi exposto, o presente modelo biossensor foi usado, neste estudo, para a triagem de derivados arilcumarínicos visando destacar novos inibidores da degranulação de mastócitos.

Figura 25. Fluxograma para os ensaios de quantificação de β -hexosaminidase padrão e direto. A redução do número de etapas requeridas para o ensaio direto, em comparação com o ensaio padrão, associada ao fato de que o ensaio direto é conduzido totalmente na presença de células, permite sua aplicação como um biossensor para a triagem de inibidores da degranulação mastocitária.

4. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é contribuir com o desenvolvimento de novas substâncias capazes de inibir a degranulação de mastócitos, um dos eventos responsáveis pelas respostas alérgicas.

4.1. Objetivos específicos

- Identificar derivados arilcumarínicos como inibidores da degranulação estimulada de mastócitos;
- Destacar, dentro do conjunto de cumarinas ativas, quais os grupos substituintes que contribuem para a atividade biológica.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Material

O material mencionado abaixo foi utilizado sem tratamento prévio:

Meio mínimo essencial contendo sais de Eagle (MEM, Invitrogen, Gibco, Carlsbad, CA, EUA), soro bovino fetal (Invitrogen), sulfato de gentamicina (Invitrogen), tripsina-EDTA (Invitrogen), triton X-100 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), soro albumina bovina (BSA, Acros Organic, NJ, EUA), fumarato de cetotifeno (Sigma-Aldrich), 7-metóxi-cumarina (Sigma-Aldrich), 3-fenil-cumarina (Sigma-Aldrich) e 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-brometo difenil tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich).

- **Tampão de Tyrode:** composto de NaCl 135 mM; KCl 5 mM; MgCl₂ 1 mM; CaCl₂ 1,8 mM; D(+) glucose 5,6 mM e HEPES 20 mM (Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, NJ, EUA). Os sais foram dissolvidos em água Milli-Q e o pH da solução foi ajustado para 7,4. O tampão foi esterilizado por filtração em membrana com poro de tamanho 0,23 µm.

- **Anticorpo monoclonal específico para reconhecimento de dinitro-fenil (anti-DNP IgE):** foi purificado de células de fluido peritoneal de ratos por cromatografia por afinidade (POSNER *et al.*, 1992) e cromatografia de filtração em gel (SUBRAMANIAN *et al.*, 1986).

- **Antígeno DNP-BSA:** foi preparado a partir da conjugação de BSA com um média de 15 grupos de DNP, conforme descrito por Weetal e colaboradores (WEETALL *et al.*, 1993).

- **4-metil-umbeliferil-*N*-acetil- β -D-glucosaminida (MUG):** uma solução estoque de MUG (Sigma-Aldrich) foi preparada pela solubilização de 46 mg do substrato em 1 mL de dimetilsulfóxido para uma concentração final igual a 0,12 M. A solução estoque foi armazenada em freezer a -20 °C. Para cada experimento, foi utilizada uma solução, recém preparada, na concentração final de 1,2 mM, em tampão de Tyrode, pH 7,4.

- **Cumarinas:** As aril-cumarinas apresentadas na **Figura 23B** (MARCHI *et al.*, 2004; KABEYA *et al.*, 2007) foram disponibilizadas pela Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo, do Departamento de Ciências Farmacêuticas – FCFRP-USP.

5.2. Métodos

5.2.1. Cultura celular

Mastócitos da linhagem RBL-2H3 foram cultivados como monocamadas em MEM, suplementado com 15% de soro bovino fetal e 50 μ g/mL de gentamicina. As células foram mantidas a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

O subcultivo celular foi realizado a cada 2 ou 3 dias, em garrafas de 25 ou 75 cm³ (Corning Incorp., Corning, NY, EUA), a 37 °C e atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, conforme descrito a seguir. As células foram suspensas na presença de 5 mL de tripsina-EDTA, por 5 minutos, e lavadas com meio de cultura (centrifugação por 5 minutos, 25 °C, 1000 rpm, centrífuga Sorvall Legend, modelo Mach 1.6R). O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão em meio de cultura a uma concentração de 1x10⁶ células/mL.

5.2.2. Ensaio direto (modelo biossensor) para a quantificação da liberação de β -hexosaminidase

Células RBL-2H3 foram inicialmente sensibilizadas com anti-DNP IgE (0,5 μ g/mL) e cultivadas em placa de 96 poços (densidade 5x10⁵ células/mL) por 24h. Após lavagem das

células com tampão de Tyrode/BSA, estas foram tratadas com 100 µL de diferentes concentrações da substância teste, em uma faixa de concentração que variou entre 0-100 µM, seguido da adição de 100 µL do antígeno DNP-BSA (concentração final 100 ng/mL). Em seguida, as células foram incubadas por 60 minutos a 37 °C. A degranulação mastocitária foi finalizada colocando-se a placa em banho de gelo. A seguir, foram adicionados 100 µL do substrato fluorogênico, MUG, para posterior incubação por 30 minutos, à temperatura de 37 °C. Os controles para este ensaio incluíram amostras livre de estímulo (liberação espontânea de β-hexosaminidase), bem como amostras tratadas com 0,1% de triton X-100, para lise celular e liberação total de β-hexosaminidase para o sobrenadante. Medidas de fluorescência de metil-umbeliferona foram realizadas em um leitor de microplacas (BioTek), utilizando-se comprimentos de onda iguais a 360 e 450 nm, para excitação e emissão de fluorescência, respectivamente. As soluções estoque dos derivados cumarínicos foram preparadas em dimetil sulfóxido (DMSO) em volume mínimo deste solvente, de forma a evitar que o DMSO afetasse a viabilidade celular ou interferisse no ensaio.

5.2.3. Forma de análise dos resultados obtidos para a liberação de β-hexosaminidase

Valores de porcentagem de β-hexosaminidase foram normalizados para a liberação total desta enzima (amostras tratadas com triton X-100), de acordo com a equação abaixo:

$$\% \beta\text{-Hexosaminidase} = \left(\frac{S - N}{T - N} \right) \times 100$$

Onde: **S**=Sample: fluorescência referente à β-hexosaminidase liberada de células estimuladas ou não

N=Normal: fluorescência do veículo (tampão de Tyrode)

T=Total: fuorescência referente à β-hexosaminidase liberada de células lisadas com triton X-100

Valores de CI_{50} foram determinados graficamente e expressam a média $\pm$ desvio padrão de pelo menos 3 experimentos independentes. Análises de variância (ANOVA), seguidas de pelo teste de Dunnett representam comparações das porcentagens de inibição da liberação de β -hexosaminidase de amostras tratadas com os derivados cumarínicos, em relação ao controle e foram estatisticamente significativos para $*P < 0,05$, $**P < 0,01$ e $***P < 0,001$.

5.2.4. Ensaio para inibição da atividade da enzima β -hexosaminidase

Este ensaio foi conduzido com o objetivo de assegurar que os efeitos das cumarinas testadas sobre a porcentagem de β -hexosaminase quantificada no ensaio anterior foram devidos a inibição da degranulação mastocitária e não devidos à inibição da atividade da enzima em questão. Para tanto, células suspensas na concentração de $1,5 \times 10^5$ cel/mL foram sonificadas por 20 minutos para ruptura das mesmas e centrifugadas. Alíquotas (45 μ L/poço) do sobrenadante foram plaqueadas em conjunto com soluções da substância teste, nas concentrações finais de 0-100 μ M (5 μ L/poço), além de 45 μ L/poço de uma solução de MUG. A reação do substrato MUG com a β -hexosaminidase liberada foi conduzida por 1h e finalizada com a adição de tampão carbonato, pH 10. Medidas de fluorescência foram registradas nas mesmas condições mencionadas no item anterior.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Jeong e colaboradores (2007) avaliaram a atividade inibitória de análogos de 4-senecioilóxi-metil-6,7-dimetóxi-cumarinas, os quais apresentaram grupamentos alquílicos, cíclicos e aromáticos como substituinte do carbono 4 do núcleo cumarínico, sobre a degranulação de mastócitos RBL-2H3. Os resultados indicaram que aqueles compostos formados por substituintes como grupos fenil, piridinil e furanil exibiram maior atividade inibitória sobre a degranulação, em comparação aos substituintes acíclicos ou cíclicos não-aromáticos, o que os levou a sugerir que a presença de substituintes aromáticos poderiam ser importantes para a atividade biológica (JEONG *et al.*, 2007).

Com base nestas informações, avaliou-se o efeito da 3-fenilcumarina (composto 1, **Figura 23B**) sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno. Como mostram a **Figura 26** e a **Tabela 1**, a 3-fenilcumarina não apresentou qualquer efeito sobre a liberação da enzima β -hexosaminidase, ou seja, este composto não afetou a degranulação mastocitária,

o que sugere, que, dentro destas condições de estudo, a presença de um substituinte aromático não confere, por si só, ganho de atividade. Estes resultados estão de acordo com os estudos de Kabeya e colaboradores (2007 e 2008), os quais reportaram que as atividades da enzima *horseradish* peroxidase, bem como o metabolismo oxidativo de neutrófilos, não foram sensíveis à 3-fenilcumarina (KABEYA *et al.*, 2007; KABEYA *et al.*, 2008).

Figura 26. Cumarina 1 não afeta a degranulação de mastócitos estimulada por antígeno. Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 1, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 $\mu\text{g/mL}$). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett não indicaram significância estatística das amostras tratadas com o derivado cumarínico em relação ao controle.

Embora a estrutura da 3-fenilcumarina seja bastante semelhante ao esqueleto químico dos flavonóides (**Figura 23**), cuja atividade inibitória sobre a degranulação de mastócitos já foi mencionada, a ausência de grupamentos substituintes, como hidroxilas, na estrutura da 3-fenilcumarina, as quais estão presentes nos flavonóides, pode contribuir para justificar a ausência de atividade do derivado cumarínico. Desta forma, foi investigado o efeito de 3-fenilcumarinas substituídas sobre a degranulação induzida de células RBL.

A hidroxilação do carbono 6 conferiu ao composto resultante, 6-hidróxi-3-fenilcumarina (cumarina 2), ganho de atividade, em relação à 3-fenilcumarina não substituída, com uma inibição moderada da degranulação mastocitária e um valor de CI_{50} de $28 \pm 2,6 \mu M$, como exibem a **Figura 27** e a **Tabela 1**. Consistente com estes resultados, Cheong e colaboradores demonstrara que o grupamento 6-hidroxila seria importante para o efeito inibitório de flavonas e flavonóis sobre a secreção de mastócitos (CHEONG *et al.*, 1998).

Em contraste, a hidroxilação do carbono 4' resultou em um composto inativo (4'-hidróxi-3-fenilcumarina, cumarina 3), como ilustram a **Figura 28** e a **Tabela 1**. Interessantemente, enquanto o grupamento 4'-hidroxila não foi significativo para a inibição da degranulação de mastócitos, a hidroxilação da 3-fenilcumarina nas posições 6 e 4' (6,4'-diidróxi-3-fenilcumarina, cumarina 4) resultou em um composto com perfil inibitório muito semelhante ao exibido pela 6-hidróxi-3-fenilcumarina, como demonstrado na **Figura 29**. O valor de CI_{50} (concentração que inibe 50% da resposta de degranulação) para esta cumarina foi de $28,3 \pm 1,7 \mu M$ (**Tabela 1**). Estes resultados indicam que a atividade inibitória do composto 4 se deve, majoritariamente, à presença da hidroxila na posição 6.

Figura 27. Efeito inibitório da cumarina 2 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno. Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 2, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 $\mu\text{g/mL}$). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, em relação ao controle.

Figura 28. Efeito inibitório da cumarina 3 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno. Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 3, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 $\mu\text{g/mL}$). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metilumbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de $**P < 0,01$, em relação ao controle.

Figura 29. Efeito inibitório da cumarina 4 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno. Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 4, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 $\mu\text{g/mL}$). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de $**P < 0,01$, em relação ao controle.

Visto que a hidroxilação da posição 4' resultou em um composto inativo (cumarina 3) ou não representou melhora de atividade da cumarina 4, em relação à cumarina 2, o efeito inibitório da cumarina 5 (8,4'-diidróxi-3-fenilcumarina, $CI_{50}=31,6 \pm 1,5 \mu M$ - **Figura 30, Tabela 1**) foi atribuído à hidroxilação da posição 8 do anel cumarínico, ainda que este composto seja hidroxilado também na posição 4'.

Novamente, enquanto a hidroxilação do carbono 4' não foi significativa para a atividade, o derivado cumarínico hidroxilado na posição 3' (3'-hidróxi-3-fenilcumarinas, cumarina 6) foi responsável por uma considerável redução da resposta de degranulação, exibindo um CI_{50} no valor de $19,2 \pm 0,8 \mu M$ (**Figura 31, Tabela 1**). Diferenças na densidade eletrônica do anel, bem como nas interações com o alvo molecular (se aplicável), quando as hidroxilações nas posições 3' e 4' são comparadas, podem contribuir para os resultados observados.

Foi demonstrado, até o presente momento, que a hidroxilação dos carbonos 6, 8 e 3' de 3-fenilcumarinas levaram à obtenção de compostos capazes de inibir a degranulação estimulada de mastócitos. Interessantemente, trabalhos prévios, baseados em estudos de relação estrutura-atividade (SAR), demonstraram que a hidroxilação das exatas mesmas posições seriam necessárias para os efeitos inibitórios de 3-fenil-isocumarinas sobre a degranulação de células RBL-2H3 induzida por antígeno (YOSHIKAWA *et al.*, 1996; WANG *et al.*, 2007; KURUME *et al.*, 2008).

A presença adicional de um grupamento hidroxila na posição 2' na cumarina 7 (6,2'-diidróxi-3-fenilcumarina) levou a uma redução significativa da resposta de degranulação (**Figura 32 e Tabela 1**, $CI_{50}=13,4 \pm 1,5 \mu M$), quando comparada ao efeito causado pela 6-hidróxi-3-fenilcumarina (cumarina 2, $CI_{50}=28 \mu M$), o que sugere que esta substituição pode ser importante para modular a degranulação de células RBL. A proximidade do substituinte 2'-hidroxila com o grupamento carboxila do anel cumarínico poderia permitir o estabelecimento de uma ligação de hidrogênio intramolecular, ainda que fraca, que poderia contribuir para a melhora de atividade observada.

Ainda que a cumarina 8, substituída por hidroxilações nas posições 6, 3' e 4' (6,3',4'-triidróxi-3-fenilcumarina), inibiu a liberação de β -hexosaminidase com potência semelhante à cumarina 6 (**Figura 33, Tabela 1**), que apresenta uma única hidroxilação na posição 3' (cumarina 8, $CI_{50}=16,1 \pm 1,7 \mu M$; cumarina 6, $CI_{50}=19,2 \mu M$), sua atividade foi superior à da cumarina 4 ($CI_{50}=28,3 \mu M$), diidroxilada nas posições 6 e 4'. O ganho de atividade inibitória da cumarina 8, em relação à cumarina 4, pode ser atribuído à presença de uma hidroxila adicional, no caso, na posição 3', mostrada ser importante para o efeito biológico, mas

também pode ser atribuído à formação de um domínio catecólico, cuja presença aumenta a potência de inibição da degranulação de células RBL por flavonóides (MATSUDA *et al.*, 2002).

Figura 30. Efeito inibitório da cumarina 5 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno. Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 5, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 $\mu\text{g/mL}$). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metilumbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$, em relação ao controle.

Figura 31. Efeito inibitório da cumarina 6 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno. Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 6, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 $\mu\text{g/mL}$). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metilumbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de $**P < 0,01$, em relação ao controle.

Figura 32. Efeito inibitório da cumarina 7 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno. Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 7, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 $\mu\text{g/mL}$). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de $**P < 0,01$, em relação ao controle.

Figura 33. Efeito inibitório da cumarina 8 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno. Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 8, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 $\mu\text{g/mL}$). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de $**P < 0,01$, em relação ao controle.

A esterificação do grupamento 6-hidroxila (6-acetóxi-3-fenilcumarina, cumarina 9) reduziu fortemente a atividade inibitória, em comparação ao seu análogo hidroxilado, a cumarina 2 (cumarina 9, $CI_{50} > 100 \mu M$; cumarina 2, $CI_{50}=28,3 \mu M$), como mostram a **Figura 34** e a **Tabela 1**. De maneira similar, a acetilação de ambos os grupamentos hidroxila das posições 6 e 4' (6,4'-diacetóxi-3-fenilcumarina, cumarina 10) resultou em um composto inativo (**Figura 35** e **Tabela 1**), enquanto que seu análogo hidroxilado 6,4'-diidróxi-3-fenilcumarina (cumarina 4) exibiu atividade inibitória moderada ($CI_{50}=28,3 \mu M$). Estes resultados indicam que, para o conjunto de compostos estudados, a acetilação de 3-fenilcumarinas leva à perda de atividade.

Da mesma forma que a esterificação de 3-fenilcumarinas hidroxiladas conduziu a uma perda da capacidade dos derivados hidroxilados em reduzir a liberação de β -hexosaminidase, a proteção das hidroxilas 3' e 4' catecólicas, na forma de um grupamento metilenodióxi, resultou em uma cumarina inativa (3-piperonilcumarina, cumarina 11 - **Figura 36** e **Tabela 1**), cuja atividade não pôde ser recuperada através da hidroxilação do carbono 6 (6-hidróxi-3-piperonilcumarina, cumarina 12 - **Figura 37** e **Tabela 1**), ou através da hidroxilação do carbono 8 (8-hidróxi-3-piperonilcumarina, cumarina 13 - **Figura 38** e **Tabela 1**), dois grupamentos hidroxila que levaram à obtenção de derivados 3-fenilcumarínicos ativos. Grupamentos catecólicos tampouco resultaram em ganho de atividade para este conjunto de 3-piperonilcumarinas, como representado pela cumarina 14, a qual apresenta duas hidroxilações adjacentes nas posições 7 e 8 do núcleo cumarínico (7,8-diidróxi-3-piperonilcumarina - **Figura 39** e **Tabela 1**) e apresentou uma inibição pouco representativa da secreção de mastócitos somente para as maiores concentrações testadas.

Apesar da fraca aplicação das 3-piperonilcumarinas, testadas até o momento, como inibidoras da degranulação de mastócitos, a substituição destes compostos por um grupamento amino na posição 6 (6-amino-3-piperonilcumarina, cumarina 15) representou um ganho considerável de atividade inibitória, como denotam a **Figura 40** e **Tabela 1**. O valor de CI_{50} determinado foi de $28,5 \pm 4,2 \mu M$. A atividade inibitória da amino-3-piperonilcumarina pôde ainda ser otimizada através da extensão da cadeia lateral deste substituinte pela introdução de um grupamento tiofeno. O derivado cumarínico substituído por um grupamento tiofen-2-il-metanimina (cumarina 16) inibiu substancialmente a degranulação mastocitária, com um CI_{50} de $10,5 \pm 1,8 \mu M$, sendo o composto de maior atividade dentro do conjunto de derivados cumarínicos estudado (**Figura 41** e **Tabela 1**). Interessantemente, Marchi e colaboradores (2004) encontraram que, para um grupo semelhante de 3-piperonilcumarinas, a cumarina 16 exibiu a maior atividade tripanomicida,

demonstrada através da inibição da atividade da enzima glicossomal gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* (MARCHI *et al.*, 2004).

Figura 34. Efeito inibitório da cumarina 9 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno. Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 9, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 $\mu\text{g/mL}$). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$, em relação ao controle.

Figura 35. Efeito inibitório da cumarina 10 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno. Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 10, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 $\mu\text{g/mL}$). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$, em relação ao controle.

Figura 36. Efeito inibitório da cumarina 11 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno. Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 11, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 $\mu\text{g/mL}$). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metilumbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett não indicaram significância estatística quando as amostras tratadas com a cumarina 11 foram comparadas com a amostra controle.

Figura 37. Efeito inibitório da cumarina 12 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno. Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 12, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 $\mu\text{g/mL}$). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de $*P<0,05$ e $**P<0,01$, em relação ao controle.

Figura 38. Efeito inibitório da cumarina 13 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno. Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 13 seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 $\mu\text{g/mL}$). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de $*P<0,05$ e $**P<0,01$, em relação ao controle.

Figura 39. Efeito inibitório da cumarina 14 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno. Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 14 seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 $\mu\text{g/mL}$). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de $**P < 0,01$, em relação ao controle.

Figura 40. Efeito inibitório da cumarina 15 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno. Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 15 seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 $\mu\text{g/mL}$). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metilumbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de $**P < 0,01$, em relação ao controle.

Figura 41. Efeito inibitório da cumarina 16 sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno. Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações da cumarina 16 seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 $\mu\text{g/mL}$). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de $**P < 0,01$, em relação ao controle.

É importante ressaltar que, dentre todos os derivados cumarínicos que exibiram atividade inibitória, esta atividade foi consideravelmente superior à inibição da resposta de degranulação conferida pelo fármaco fumarato de cetotifeno, comumente empregado como controle positivo para ensaios de degranulação desta natureza (KURUME *et al.*, 1996; MATSUDA *et al.*, 2003; MATSUDA *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2007; YAMADA *et al.*, 2008). O cetotifeno foi recentemente classificado como um fármaco de múltiplas ações, por combinar atividades anti-histamínica, estabilizadora de mastócitos e anti-inflamatória (LAMBIASE *et al.*, 2009). O(s) mecanismo(s) exato pelo qual este fármaco inibe a ativação de mastócitos permanece desconhecido, mas uma das possibilidades seria o bloqueio de canais de Ca^{2+} ativados pela ativação de receptores para IgE, o que impediria a liberação de histamina e outros mediadores alérgicos (LAMBIASE *et al.*, 2009). Além disso, a inibição da elevação dos níveis de Ca^{2+} intracelular levaria a uma inibição das isoformas de PKC que são Ca^{2+} dependentes, outro fator crítico para a ocorrência da exocitose dos conteúdos granulares (KIMATA *et al.*, 1999). O valor de CI_{50} para o fumarato de cetotifeno foi de $154,7 \pm 6,4 \mu\text{M}$, como apresentado na **Tabela 1** e seu perfil de inibição da liberação de β -hexosaminidase está apresentado na **Figura 42**.

Figura 42. Efeito inibitório do fumarato de cetotifeno sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno. Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações de cetotifeno seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 $\mu\text{g/mL}$). Após incubação a 37 °C por 1h, as células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metilumbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de *** $P < 0,001$, em relação ao controle.

Tabela 1. Efeito inibidor de 3-aryl-cumarinas sobre a liberação da enzima β -hexosaminidase de mastócitos da linhagem RBL-2H3, induzida por antígeno.

Composto	Estrutura	CI ₅₀ , μ M
cumarina 1		-----
cumarina 2		$28 \pm 2,6$
cumarina 3		-----
cumarina 4		$28,3 \pm 1,7$
cumarina 5		$31,6 \pm 1,5$
cumarina 6		$19,2 \pm 0,8$
cumarina 7		$13,4 \pm 1,5$
cumarina 8		$16 \pm 1,7$
cumarina 9		~ 100

cumarina 10		-----
cumarina 11		-----
cumarina 12		-----
cumarina 13		> 100
cumarina 14		> 100
cumarina 15		28,5 ± 4,2
cumarina 16		10,5 ± 1,8
cetotifeno		154,7 ± 6,4

Para aquelas arilcumarinas que levaram a uma diminuição da liberação de β -hexosaminidase, foi avaliado se o efeito de tais compostos foi realmente devido a uma inibição da degranulação dos mastócitos ou se foi causado por um efeito direto destas substâncias sobre a atividade da enzima β -hexosaminidase, o que também poderia levar a uma redução do sinal de fluorescência quantificado. Nesta curva representativa para todas as cumarinas ativas, apresentada na **Figura 43**, fica evidenciado que a atividade da enzima β -hexosaminidase sofreu uma pequena redução apenas na presença de concentrações mais elevadas da cumarina 16 e tal inibição de atividade não foi estatisticamente significativa. Estes resultados confirmam a capacidade dos derivados cumarínicos ativos em, controlar, de fato, a secreção de mastócitos.

Figura 43. Cumarina 16 não afeta significativamente a atividade da enzima β -hexosaminidase. O sobrenadante de células RBL-2H3, previamente lisadas por sonicação, foi tratado com diferentes concentrações da cumarina 16 e incubada com solução de MUG, pH 4,4, por 1h a 37 °C. A reação enzima-substrato foi parada em tampão pH 10. A quantificação da atividade enzimática foi baseada nas medidas de fluorescência da metil-umbeliferona produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett não indicaram significância estatística das amostras tratadas com o derivado cumarínico em relação ao controle.

7. CONCLUSÃO

No presente capítulo, foi investigado o efeito de derivados 3-arilcumarínicos sobre a degranulação de células RBL-2H3, quando estimuladas por antígeno. As medidas de degranulação foram realizadas através do uso de um modelo biossensor baseado em mastócitos, previamente desenvolvido pelo grupo. A elevada sensibilidade e reprodutibilidade dos experimentos conduzidos no presente estudo reforçam a aplicabilidade deste modelo biossensor para a triagem de compostos bioativos capazes de modular a atividade de mastócitos. Tais compostos podem, futuramente, representar o ponto de partida para o desenvolvimento de fármacos anti-alérgicos.

O conjunto de 3-arilcumarinas estudado incluiu substâncias que apresentavam um núcleo cumarínico comum, mas que se diferenciavam em função de sua substituição por grupamentos hidroxila, em diferentes posições e número, grupamentos acetóxi e amino, este último também extendido na forma de um grupo tiofeno-metanimina. Como os compostos estudados exibiram um perfil bem variado de atividade, incluindo substâncias inativas, de moderada e elevada potência de inibição da secreção de mastócitos, algumas substituições puderam ser apontadas como importantes para a atividade biológica: (i) hidroxilação dos carbonos 6, 8, 2' e 3' de 3-fenilcumarinas, (ii) a substituição do carbono 6 de 3-piperonilcumarinas por um grupamento amino e (iii) a extensão da cadeia lateral do composto anterior por um anel tiofeno. Este é o primeiro estudo que avalia a capacidade de 3-arilcumarinas em inibir a resposta secretória de mastócitos, uma etapa fundamental para a iniciação e propagação de respostas alérgicas e, portanto, abre um campo de possibilidades para que tais compostos possam levar ao desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de desordens alérgicas.

8. REFERÊNCIAS

- AKETANI, S., TESHIMA, R., UMEZAWA, Y., SAWADA, J. Correlation between cytosolic calcium concentration and degranulation in RBL-2H3 cells in the presence of various concentrations of antigen-specific IgEs. **Immunology Letters**, v.75, p.185-189, 2001.
- BAROODY, F. M. Allergic rhinitis: Broader disease effects and implications for management. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v.128, p.616-631, 2003.
- BISSONNETTE, E. Y., TREMBLAY, G. M., TURMEL, V., PIROTTE, B., REBOUD-RABAU, M. Coumarinic derivatives show anti-inflammatory effects on alveolar

- macrophages, but their anti-elastase activity is essential to reduce lung inflammation *in vivo*. **International Immunopharmacology**, v.9, p.49-54, 2009.
- CHAN, Y., LI, C., SHEN, Y., WU, T. Anti-inflammatory Principles from the Stem and Root Barks of *Citrus medica*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.58, p61-65, 2010.
- CHEONG, H., RYU, S. Y., OAK, M. H., CHEON, S. H., YOO, G. S., KIM, K. M. Studies of structure activity relationship of flavonoids for the anti-allergic actions. **Archives of Pharmacal Research**, v.21, p.478-480, 1998.
- CHOI, Y. H., YAN, G. H. Anti-allergic effects of scoparone on mast cell-mediated allergy model. **Phytomedicine**, v.16, p.1089-1094, 2009.
- CURTIS, T., NAAL, R. M. Z. G., BATT, C., TABB, J., HOLOWKA, D. Development of a mast cell-based biosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v.23, p.1024-1031, 2008.
- DEMO, S. D., MASUDA, E., ROSSI, A. B., THRODSET, A. B., GERARD, A. L., CHAN, E. H., ARMSTRONG, R. J., FOX, B. P., LORENS, J. B., PAYAN, D. G., SHCELLER, R. H., FISHER, J. M. Quantitative measurement of mast cell degranulation using a novel flow cytometric annexin-V binding assay. **Cytometry**, v.36, n.4, Aug 1, p.340-348. 1999.
- DURICK, K.; NEGULESCO, P. Cellular biosensors for drug discovery. **Biosensors & Bioelectronics**, v.16, p.587-592, 2001.
- FISCHER, M. J. E.; DE MOL, N. J.. Mechanism of action of the nonlipophilic antiallergic drug eclazolast (REV 2871) in the inhibition of mediator release in a mast cell model. **Inflammation Research**, v.48, p.569-574, 1999.
- GALKIN, A., FALLARERO, A., VUORELA, P. M., Coumarins permeability in Caco-2 cell model. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.61, p.177-184, 2009.
- GRANBERG, M., FOWLER, C. J., JACOBSON, S. O. Effects of the cannabimimetic fatty acid derivatives 2- arachidonoylglycerol, anandamide, palmitoylethanolamide and methanandamide upon IgE-dependent antigen-induced beta- hexosaminidase, serotonin and TNF alpha release from rat RBL- 2H3 basophilic leukaemia cells. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.364, p.66-73, 2001.
- HOFFMANN, A., JAMIN, A., FOESTISCH, K., MAY, S., AULEPP, H., HAUSTEIN, D., VIETHS, S. Determination of the allergenic activity of birch pollen and apple prick test solutions by measurement of beta- hexosaminidase release from RBL-2H(3) cells. Comparison with classical methods in allergen standardization. **Allergy**, v.54, p.446-454, 1999.
- HOULT, J. R. S., PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. **General Pharmacology**, v.27, p.713-722, 1996.
- JEONG, H. G., LEE, J. H., JUNG, S. H., HAN, E. H., KIM, J. H., KIM, D. H., KIN, M., SIRIPURAM, P. M., CHOI, Y., SON, G. Y. Structure-activity relationships of 4-

- senecioyloxymethyl-6,7-dimethoxycoumarin analogues as anti-allergic agents. **Bulletins of the Korean Chemical Society**, v.28, p.1725-1728, 2007.
- JOO, S. S., PARK, D., SHIN, S., JEON, J. H., KIM, T. K., CHOI, Y. J., LEE, S. H., KIM, J. S., PARK, S. K., HWANG, B. Y., LEE, B. Y., LWW, D. I., KIM, Y. B. Anti-allergic effects and mechanisms of action of the ethanolic extract of *Angelica gigas* in dinitrofluorobenzene-induced inflammation models. **Enviromental Toxicology and Pharmacology**, v.30, p.127-133, 2010.
- KABEYA, L. M., DA SILVA, C. H., KANASHIRO, A., CAMPOS, J. M., AZZOLINI, A. E., POLIZELLO, A. C., 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**, v.43, p.996-1007, 2008.
- KABEYA, L. M., DE MARCHI, A. A., KANASHIRO, A., LOPES, N. P., DA SILVA, C. H. T., PUPO, M. T., LUCISANO-VALIM, Y. M.. Inhibition of horseradish peroxidase catalytic activity by new 3-phenylcoumarin derivatives: synthesis and structure-activity relationship. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.15, p.1516-1524, 2007.
- KANG, K. W., KONG, C. S., SEO, Y., KIM, M. M., KIM, S. K. Anti-inflammatory effect of coumarins isolated from *Corydalis heterocarpa*. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p.2129-2134, 2009.
- KARUBE, I. Micro-organism based biosensors. In: **Biosensors: Fundamental and Applictions**. Ed.A.P.F. Turner, I. Karube, G.S. Wilson. Oxford University Press. New-York, 1989. p.13-29.
- KAWA, T., TAKEDA, K., HARADA, S., HATTA, T., MORIGUCHI, J., MIKI, S., MORIMOTO, S., ITOH, H., NAKATA, T., SASAKI, S., NAKAHAWA, M. The role of the hypothalamic nitric oxide in the pressor responses elicited by acute environmental stress in awake rats. **Life Sciences**, v.72, p.2427-2428. 2003.
- KIMATA, M., SCHICHIJO, M., MIURA, T. Ca^{2+} and protein kinase C signaling for histamine and sulfoleukotrienes released from human cultured mast cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.257, p.895-900, 1999.
- KONTOGIORGIS, C., HADJIPAVLOU-LITINA, D. Biological evaluation of several coumarin derivatives designed as possible anti-inflammatory/antioxidant agents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v.18, p.63-69, 2003.
- KURUME A., KAMATA, Y., YAMASHITA, M., WANG, Q., MATSUDA, H., YOSHIKAWA, M., KAWASAKI, I., OHTA, S. Synthesis of 3-substituted isocoumarins and their inhibitory effects on degranulation of RBL-2H3 cells induced by antigen. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v.56, p.1264-1269, 2008.
- LAMBIASE, A., MICERA, A., BONINI, S. Multiple action agents and the eye: Do they stabilize mast cells? **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v.9, p.454-465, 2009.

- MARCHI, A. A., CASTILHO, M. S., NASCIMENTO, P. G., ARCHANJO, P. G., DEL PONTE, G., OLIVA, G., PUPO, M. T. New 3-piperonylcoumarins as inhibitors of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) from *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 4823-4833, 2004.
- MARGINEAU, D.G.; VAIS, H. **Bioelectrochemical sensors with living cells**. Butterworths, Boston. 1990.
- MATSUDA, H., MORIKAWA, T., MANAGI H., YOSHIKAWA, M. Antiallergic principles from *Alpinia galanga*: structural requirements of shenylpropanoids for inhibition of degranulation and release of TNF- α and IL-4 in RBL-2H3 cells. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v.13, p.3197-3202, 2003.
- MASTUDA, H., MORIKAWA, T., UEDA, K., MANAGI, H., YOSHIKAWA, M. Structural requirements of flavonoids for inhibition of antigen-induced degranulation, TNF-alpha and IL-4 production from RBL-2H3 cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.10, p.3123-3128, 2002.
- MATSUDA, H., TEWTRAKUL, S., MORIKAWA, T., NAKAMURA, A., YOSHIKAWA, M. Anti-allergic principles from *Thai zedoary*: structural requirements of curcuminoids for inhibition of degranulation and effect on the release of TNF- α and IL-4 in RBL-2H3 cells. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.12, p.5891-5898, 2004.
- McCORMACK et al. **Principles of Chemical and Biological Sensors**. Wiley, New-York, p.178-183, 1998.
- MELAGRAKI, G., AFANTITIS, A., IGGLESSI-MARKOPOULOU, O., DETSI, A., KOUFARI, M., KONTOGIORGIS, C., HADJIPAVLOU-LITINA, D. J. Synthesis and evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory activity of novel coumarin-3-aminoamides and their alpha-lipoic acid adducts. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.44, p.3020-3026, 2009.
- MORIKAWA, T., TAO, J., UEDA, K., MATSUDA, H., YOSHIKAWA, M. Medicinal foodstuffs. XXXI. Structures of new aromatic constituents and inhibitors of degranulation in RBL-2H3 cells from a Japanese folk medicine, the stem bark of *Acer nikoense*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.51, p.62-67. 2003.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival - Application to Proliferation and Cyto-Toxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.
- NAAL, R. M. Z. G., TABB, J.; HOLOWKA, D. AND BAIRD, B. In situ measurement of degranulation as a biosensor based on RBL-2H3 mast cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v.20, p. 791-796, 2004.
- PAGE, D. L., PIZZICONI, V. B. A cell-based immunobiosensor with engineered molecular recognition--Part II: Enzyme amplification systems. **Biosensors and Bioelectronics**, v.12, p.457-466, 1997.
- PASSANTE, E., FRANKISH, N. The RBL-2H3 cell line: its provenance and suitability as a model for the mast cell. **Inflammation Research**, v.58, p.737-745, 2009.

- POSNER, R. G., LEE, B., CONRAD, D. H., HOLOWKA, D., BAIRD, B., GOLDSTEIN, B. Aggregation of IgE-receptor complexes on rat basophilic leukemia cells does not change the intrinsic activity but can alter the kinetics of the ligand-IgE interaction. **Biochemistry**, v.31, p.5350-5356, 1992.
- RIVEIRO, M. E., DE KIMPE, N., MOGLIONI, A., VÁSQUEZ, R., MONCAOR, F., SHAYO, C., DAVIO, C. Coumarins: old compounds with novel promising therapeutic perspectives. **Current Medicinal Chemistry**, v.17, p.1325-1338, 2010.
- SCHELLER, F. W., WOLLENBERGER, U., WARSINKE, A., LISDAT, F.. Research and development in biosensors. **Current Opinion in Biotechnology**, v.12, p.35-40, 2001.
- SEREBRIISKII, I. G.; E. A. GOLEMIS. Uses of lacZ to study gene function: Evaluation of beta-galactosidase assays employed in the yeast two-hybrid system. **Analytical Biochemistry**, v.285, p.1-15. 2000.
- SIDWELL, J.S.; RECHNITZ, G.A. Progress and challenges for biosensors using plant tissue materials. **Biosensors**, v.2, p.221-233, 1986.
- SMYTH, T., RAMACHANDRAN, V. N., SMYTH, W. F. A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.33, p.421-426, 2009.
- STENGER, D. A., GROSS, G. W., KEEFER, E. W., SHAFFER, K. M., ANDREADIS, J. D., PANCRAZIO, J. J. Detection of physiologically active compounds using cell-based biosensors. **Trends in Biotechnology**, v.19, p.304-309, 2001.
- SUBRAMANIAN, K.; HOLOWKA, D.; BAIRD, B.; GOLDSTEIN, B. The Fc segment of IgE influences the kinetics of dissociation of a symmetrical bivalent ligand from cyclic dimeric complexes. **Biochemistry**, v.35, p.5518-5527, 1996.
- WAFFO, A. K., AZEBAZE, G. A., NKENGFAK, A. E., FOMUM, Z. T., MEYER, M., BODO, B., VAN HEERDEN, F. R. Indicanines B and C, two isoflavonoid derivatives from the rootbark of *Erythrina indica*. **Phytochemistry**, v.53, p.981-985, 2000.
- WANG, Q., MATSUDA, H., MATSUHIRA, K., NAKAMURA, S., YUAN, D., YOSHIKAWA, M. Inhibitory effects of thunberginols A, B, and F on degranulations and releases of TNF- α and IL-4 in RBL-2H3 cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.30, p.388-392, 2007.
- WEETALL, M., HOLOWKA, D., BAIRD, B. Heterologous desensitization of the high affinity receptor for IgE (Fc epsilon R1) on RBL cells. **The Journal of Immunology**, v.150, p.4072-4083, 1993.
- WIJESURIYA, D.C.; REZHNITZ, G.A. Biosensors based on plant and animal tissues. **Biosensors & Bioelectronics**, v.8, p.155-160, 1993.

- WU, L., WANG, X., XU, W., FARNAZEH, F., XU, R. The structure and pharmacological functions of coumarins and their derivatives. **Current Medicinal Chemistry**, v.16, p.4236-4260, 2009.
- XU, K., WILLIAMS, R. M, HOLOWKA, D., BAIRD, B. Stimulated release of fluorescently labeled IgE fragments that efficiently accumulate in secretory granules after endocytosis in RBL-2H3 mast cells. **The Journal of Cell Science**, v.111, p.2385-2396, 1998.
- YAMADA, M., ZARROUK, M., KAWASAKI, K., ISODA, H. Inhibitory effect of various Tunisian olive oils on chemical mediator release and cytokine production by basophilic cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v.116, p.279-287, 2008.
- YOSHIKAWA, M., MATSUDA, H., SHIMODA, H., SHIMADA, H., HARADA, H., NAITOH, Y., MIKI, A., YAMAHARA, J., MURAKAMI, N. Development of bioactive functions in *Hydrangeae dulcis* folium. V. On the antiallergic and antimicrobial principles of hydrangeae dulcis folium. (2). Thunberginol C, D, and E, thunberginol G 3'-O-glucoside, (-)-hydrangenol 4'-o-glucoside, and (+)-hydrangenol 4'-O-glucoside. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.44, p.1440-1447, 1996.

CAPÍTULO 3

1. RESUMO

Os mastócitos desempenham um papel crucial durante o desenvolvimento de uma resposta alérgica. Após ativação mediada por um alérgeno e IgE, via receptores FcεRI, estas células liberam histamina e outros mediadores que iniciam e propagam reações de hipersensibilidade imediata. Os mastócitos também secretam citocinas que regulam a resposta imune. Neste trabalho foi demonstrado que a piridovericina, um metabólito secundário isolado do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*, foi responsável por inibir, substancialmente e quase que de forma equipotente, a degranulação de mastócitos estimulados por vias dependentes e independentes da ativação dos receptores FcεRI. A piridovericina determinou ainda uma forte inibição da secreção de IL-4 estimulada por antígeno. As respostas de degranulação e de secreção de citocinas são, totalmente, ou em parte, reguladas por aumentos da concentração intracelular de Ca^{2+} , induzida pela ativação dos receptores FcεRI. Neste sentido, foi observado que a piridovericina inibe as respostas de Ca^{2+} estimuladas por antígeno. Portanto, a piridovericina foi apontada como um potente inibidor dos processos de exocitose de mediadores alérgicos e inflamatórios de mastócitos, sendo seu provável mecanismo de ação, a inibição do aumento estimulado da concentração citosólica de Ca^{2+} .

2. ABSTRACT

Mast cells play a critical role during the development of an allergic response. Upon activation by an allergen and IgE, via FcεRI receptors, mast cells release histamine and other mediators that initiate and propagate immediate hypersensitivity reactions. Mast cells also secrete cytokines that regulate the immune response. In the present work, it was demonstrated that pyridovericin, a secondary metabolite isolated from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, was responsible for inhibiting, in a substantial and with comparable potencies, the degranulation of cells stimulated by dependent- or independent-FcεRI pathways. Pyridovericin also determined a strong inhibition of antigen stimulated secretion of IL-4. One of the events shared by degranulation and cytokine secretion responses is the elevation of cytoplasmic Ca²⁺ levels. In this way, it was observed that pyridovericin inhibits Ca²⁺ responses to antigen. Therefore, pyridovericin is considered to be a potent inhibitor of exocytosis of mast cell allergic mediators, and mechanism of action is likely to be the inhibition of stimulated increase in cytosolic Ca²⁺ concentration.

3. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais, bem como os compostos químicos derivados de ou relacionados aos produtos naturais, têm servido às comunidades farmacêutica e médica como uma fonte importante de candidatos a novos fármacos (MISIEK e HOFFMEISTER, 2007). A inspeção das novas entidades químicas aprovadas para uso como fármacos, durante a última década, revela que 50% destas moléculas são produtos de origem natural ou diretamente derivadas desta fonte (NEWMAN e CRAGG, 2012).

A análise cautelosa de um conjunto extensivo de dados permitiu a Newman e Cragg (2012) afirmarem que a contínua contribuição dos produtos naturais para a expansão do armamento terapêutico é evidente, em especial quando se tratam de produtos naturais de origem marinha e microbiológica (NEWMAN e CRAGG, 2012). No contexto dos microrganismos e seu papel como fonte de novas entidades biologicamente ativas, os fungos despontam como produtores de metabólitos secundários de grande contribuição às ciências farmacêuticas, tendo como exemplo a penicilina, ciclosporinas e estatinas. Os produtos de origem fúngica incluem ainda potentes venenos como as aflatoxinas e tricotecenos e os chamados “metabólitos de face de Janus”, que apresentam aplicações tanto terapêuticas, como tóxicas, como é o caso da ergotamina (HOFFMEISTER e KELLER, 2006).

O estudo sistemático dos metabólitos secundários de origem fúngica foi iniciado em 1922 sob a liderança de Harold Raistrick, o qual foi responsável pela caracterização de mais de 200 metabólitos provenientes do bolor. Contudo, somente após a descoberta e desenvolvimento da penicilina, em 1928, é que grandes estudos de triagem para metabólitos de origem fúngica foram iniciados (KELLER *et al.*, 2005). A partir de então, companhias farmacêuticas instigaram estudos extensivos pela busca de produtos derivados de fungos, de forma que, na década de 1950, uma expressiva quantidade de produtos microbianos com aplicabilidade farmacêutica havia sido descoberta. A busca por metabólitos secundários bioativos manteve-se intensa, a partir de então, e milhares de compostos capazes de inibir o crescimento de bactérias, fungos, protozoários, vírus, insetos e até mesmo células tumorais foram descobertos (KELLER *et al.*, 2005). Muitas outras moléculas com efeitos citotóxico, mutagênico, teratogênico, imunossupressor e outros efeitos biológicos também foram encontradas. De fato, a análise dos cerca de 1500 metabólitos fúngicos, isolados entre os anos de 1993 e 2001, revela que mais da metade destes compostos apresenta atividade antibacteriana, antifúngica ou antitumoral (KELLER *et al.*, 2005).

Interessantemente, a diversidade química de derivados fúngicos, conhecida atualmente, representa apenas “a ponta do *iceberg*”: Sequências completas do genoma de várias espécies de fungos sugerem que as habilidades biossintéticas destes organismos, para produtos naturais, vai muito além do que previam analistas químicos, anteriormente aos projetos genoma. De acordo com estimativas recentes, apenas 6-7% das espécies fúngicas são conhecidas e têm sido descritas, indicando que uma riqueza praticamente ilimitada de produtos naturais de origem fúngica ainda espera por ser descoberta (SCHNEIDER, 2008).

O papel desempenhado pelos metabólitos secundários na biologia dos fungos permanece elusivo. A vantagem mais provável, conferida pelos metabólitos secundários para o organismo produtor, é que estes metabólitos permitem que o organismo sobreviva em seu nicho ecológico. Muitos fungos vivem como saprófitos de solo, onde estão expostos a um ambiente hostil e habitado por uma ampla variedade de organismos competidores. Desta forma, muitos dos metabólitos secundários são produzidos por fungos patogênicos, cuja virulência está associada à proteção destes fungos contra amebas, nemátodos e outros invertebrados ambientais que se alimentam de tais fungos (FOX e HOWLLET, 2008).

Neste contexto, os fungos entomopatogênicos despontam como uma fonte promissora de metabólitos secundários biologicamente ativos (TAKAHASHI *et al.*, 1998a). Presume-se que muitos fungos entomopatogênicos levem à morte de seu hospedeiro pela inibição de enzimas e por interferirem com o sistema regulatório do hospedeiro através da produção de metabólitos tóxicos e enzimas patogênicas (TAKAHASHI *et al.*, 1998b).

Muitos dos gêneros de fungos entomopatogênicos, atualmente estudados, pertencem aos filos Zygomycota e Deuteromycota (SHAH e PELL, 2003), sendo que aqueles fungos pertencentes ao segundo filo parecem ser os preferidos como fonte para a triagem por novos metabólitos bioativos, uma vez que estes fungos podem ser facilmente cultivados em meio artificial (TAKAHASHI *et al.*, 1998b). Membro do filo Deuteromycota, a *Beauveria* é um gênero cosmopolita e anamórfico de fungos patogênicos para artrópodes, que também pode ocorrer como fungos saprófitos e endofíticos de plantas. Os fungos deste gênero produzem uma ampla variedade de metabólitos secundários, os quais incluem pigmentos não-peptídicos, policetídeos, antibióticos peptídicos e outros metabólitos implicados na patogenia e virulência contra insetos, com aplicações farmacêutica, industrial e agrônômica (REHNER *et al.*, 2011). De fato, formulações produzidas a partir do fungo *Beauveria bassiana*, tem sido comercializadas para o controle de insetos em plantações (SHAH e PELL, 2003; REHNER *et al.*, 2011).

O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* apresenta, como principal componente de seu bolo micelial, o alcalóide 4-hidróxi-2-piridona denominado piridovericina. O isolamento e caracterização da piridovericina foram realizados em 1998 por Takahashi e colaboradores. Trata-se de um metabólito composto por um grupamento 4-hidróxi-5-(*p*-hidróxifenil)piridina e um domínio 4-metil-6-hidróximetil-octa-2,4-dienoil, além de um carbono quiral na posição 12 com configuração em *R*, como ilustra a **Figura 44**. Os alcalóides 4-hidróxi-2-piridona constituem uma família de produtos naturais com ricas diversidade química e atividade biológica, esta última incluindo ações antifúngica, antibacteriana, inseticida e citotóxica (CHENG *et al.*, 2006; de SILVA *et al.*, 2009). Embora quimicamente bem caracterizada, a atividade biológica da piridovericina reportada até o momento inclui, somente, um fraco efeito inibitório deste metabólito sobre a atividade de tirosinoquinasas de células NIH3T3/v-src (TAKAHASHI *et al.*, 1998b).

O potencial terapêutico pouco explorado da piridovericina abre um vasto campo de estudos acerca de seus efeitos farmacológicos e aplicações para o tratamento de doenças humanas. Neste sentido, os estudos apresentados neste capítulo foram focados no efeito deste metabólito sobre a responsividade de mastócitos estimulados por um antígeno, como uma etapa inicial dos estudos que possam revelar a aplicabilidade da piridovericina no tratamento de desordens alérgicas.

Figura 44. Estrutura química da piridovericina. O metabólito secundário piridovericina, isolado de culturas do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*, teve seu efeito inibitório, sobre a ativação de mastócitos, investigado no presente estudo.

4. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é contribuir com o desenvolvimento de novos inibidores da ativação de mastócitos.

4.1. Objetivos específicos

Avaliar o efeito do produto natural piridovericina sobre:

- a degranulação estimulada de células RBL-2H3;
- a elevação da concentração intracelular de Ca^{2+} em mastócitos estimulados por antígeno;
- a secreção celular de IL-4, induzida por antígeno;
- a viabilidade de células RBL-2H3.

5. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

Meio mínimo essencial contendo sais de Eagle (MEM, Invitrogen, Gibco, Carlsbad, CA, EUA), soro bovino fetal (Invitrogen), sulfato de gentamicina (Invitrogen), tripsina-EDTA (Invitrogen), triton X-100 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), soro albumina bovina (BSA, Acros Organic, NJ, EUA), indicador de Ca^{2+} , Fluo-4 AM (Invitrogen), sulfinpirazona (Sigma-Aldrich), fumarato de cetotifeno (Sigma-Aldrich), tapsigargina (Sigma-Aldrich) e resazurina sódica (Sigma-Aldrich).

- **Tampão de Tyrode:** composto de NaCl 135 mM; KCl 5 mM; MgCl_2 1 mM; CaCl_2 1,8 mM; D(+) glucose 5,6 mM e HEPES 20 mM (Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, NJ, EUA). Os sais foram dissolvidos em água Milli-Q e o pH da solução foi ajustado para 7,4. O tampão foi esterilizado por filtração em membrana com poro de tamanho 0,23 μm . Para alguns experimentos, foi adicionado BSA ao tampão de Tyrode, previamente inativado a 56 °C por 30 minutos, na concentração de 1 mg/mL.

-Anticorpo monoclonal específico para reconhecimento de dinitro-fenil (anti-DNP IgE): foi purificado de células de fluido peritonial de ratos por cromatografia por afinidade (POSNER *et al.*, 1992) e cromatografia de filtração em gel (SUBRAMANIAN *et al.*, 1986).

-Antígeno DNP-BSA: foi preparado a partir da conjugação de BSA com uma média de 15 grupos de DNP, conforme descrito por Weetal e colaboradores (WEETALL *et al.*, 1993).

-4-metil-umbeliferil-N-acetil- β -D-glucosaminida (MUG): uma solução estoque de MUG (Sigma-Aldrich) foi preparada pela solubilização de 46 mg do substrato em 1 mL de dimetilsulfóxido para uma concentração final igual a 0,12 M. A solução estoque foi armazenada em freezer a -20 °C. Para cada experimento, foi utilizada uma solução, recém preparada, na concentração final de 1,2 mM, em tampão de Tyrode, pH 7,4.

-Piridovericina: A piridovericina foi isolada a partir do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*, caracterizada e disponibilizada pelo grupo do prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos, do Departamento de Ciências Farmacêuticas – FCFRP-USP.

4.2.Métodos

4.2.1. Cultura de células RBL-2H3

As células foram cultivadas como monocamadas em MEM, suplementado com 15% de soro bovino fetal e 50 μ g/mL de gentamicina. As células foram mantidas a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

O subcultivo celular foi realizado a cada 2 ou 3 dias, em garrafas de 25 ou 75 cm³ (Corning Incorp., Corning, NY, EUA), a 37°C e atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, conforme descrito a seguir. As células foram suspensas na presença de 5 mL de tripsina-EDTA, por 5 minutos, e lavadas com meio de cultura (centrifugação por 5 minutos, 25 °C, 1000 rpm, centrífuga Sorvall Legend, modelo Mach 1.6R). O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em meio de cultura a uma concentração de 1x10⁶ células/mL.

4.2.2. Medidas de Ca²⁺ intracelular

Os níveis de Ca^{2+} citoplasmático foram medidos com o uso de um fluorímetro de estado estacionário, HITACHI modelo F-4500 (Tóquio, Japão). Células RBL-2H3 (4×10^6 células/mL), suspensas em tampão de Tyrode/BSA, foram carregadas com o indicador de Ca^{2+} , Fluo-4 AM (0,5 μM ; excitação em 490 nm, emissão de fluorescência em 520 nm) e sensibilizadas com anti-DNP IgE (1 $\mu\text{g/mL}$), na presença de 0,5 mM de sulfinpirazona por 1h. Após lavagem com tampão de Tyrode/BSA, as células foram ressuspensas no mesmo tampão, para uma concentração final na cubeta de fluorescência de 2×10^6 células/mL. No fluorímetro, as células foram mantidas sob agitação contínua, termostatizadas a 37°C e pré-incubadas, ou não, com piridovericina por 20 minutos, seguido de estímulo celular com 0,4 $\mu\text{g/mL}$ de DNP-BSA. A seguir, as células foram lisadas com a adição de triton X-100 0,1% para a determinação do valor máximo de fluorescência de Fluo-4.

4.2.3. Ensaio padrão para a quantificação da liberação de β -hexosaminidase

Células RBL-2H3 foram inicialmente sensibilizadas com anti-DNP IgE (0,5 $\mu\text{g/mL}$) e cultivadas em placa de 96 poços (densidade 5×10^5 células/mL) por 24h. Após lavagem das células com tampão de Tyrode/BSA, estas foram tratadas por 20 minutos com diferentes concentrações da substância teste (0-100 μM) e incubadas na presença de diferentes estímulos celulares (DNP-BSA, 100 ng/mL e tapsigargina, 200nM) por 1h a 37°C . A degranulação mastocitária foi parada em banho de gelo e, então, 25 μL do sobrenadante de cada poço foram transferidos para uma nova placa de 96 poços de fundo escuro, esta já contendo 100 μL /poço do substrato para a enzima β -hexosaminidase (MUG, 1,2 mM), preparado em tampão acetato pH 4,5. A clivagem de MUG em metil-umbeliferona pela enzima β -hexosaminidase procedeu por 30 minutos, a 37°C , e foi parada com a adição de 200 μL /poço de tampão carbonato, pH 10. Os controles para este ensaio incluíram amostras livres de estímulo (liberação espontânea de β -hexosaminidase), bem como amostras tratadas com 0,1% de triton X-100, para lise celular e liberação total de β -hexosaminidase para o sobrenadante. Medidas de fluorescência de metil-umbeliferona foram realizadas em um leitor de microplacas (BioTek), utilizando-se comprimentos de onda iguais a 360 e 450 nm, para excitação e emissão de fluorescência, respectivamente.

4.2.4. Forma de análise dos resultados obtidos para a liberação de β -hexosaminidase

Valores de porcentagem de β -hexosaminidase foram normalizados para a liberação total desta enzima (amostras tratadas com triton X-100), de acordo com a equação abaixo:

$$\% \beta\text{-Hexosaminidase} = \left(\frac{S - N}{T - N} \right) \times 100$$

Onde: **S**=Sample: fluorescência referente à β -hexosaminidase liberada de células estimuladas ou não

N=Normal: fluorescência do veículo (tampão de Tyrode)

T=Total: fluorescência referente à β -hexosaminidase liberada de células lisadas com triton X-100

Valores de CI_{50} foram determinados graficamente e expressaram a média $\pm$ desvio padrão de pelo menos 3 experimentos independentes. Análises de variância (ANOVA), seguidas de pelo teste de Dunnett representam comparações das porcentagens de inibição da liberação de β -hexosaminidase pela piridovericina em relação ao controle e foram estatisticamente significativos para $*P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,001$ e $****P < 0,0001$.

4.2.5. Ensaio para inibição da atividade da enzima β -hexosaminidase

Este ensaio foi conduzido com o objetivo de assegurar que os efeitos da piridovericina sobre a porcentagem de β -hexosaminase, quantificada no ensaio anterior, foram devidos à inibição da degranulação mastocitária e não devidos à inibição da atividade da enzima em questão. Para tanto, células suspensas na concentração de $1,5 \times 10^5$ células/mL foram sonificadas por 20 minutos para ruptura das mesmas e centrifugadas. Alíquotas (45 μ L/poço) do sobrenadante foram plaqueadas em conjunto com soluções de piridovericina, nas concentrações finais de 0-100 μ M (5 μ L/poço), além de 45 μ L/poço de uma solução de MUG. A reação MUG + β -hexosaminidase foi conduzida por 1h e terminada com a adição de tampão carbonato, pH 10. Medidas de fluorescência foram registradas nas mesmas condições mencionadas no item anterior.

4.2.6. Ensaio para quantificação da secreção de interleucina-4

Células RBL, plaqueadas a uma densidade de 1×10^5 células/mL, foram sensibilizadas com 1 $\mu\text{g/mL}$ de anti-DNP IgE e cultivadas por 24h. Em sequência, tais células foram tratadas com diferentes concentrações de piridovericina e incubadas por 4h a 37°C , após estímulo com DNP-BSA (0,5 $\mu\text{g/mL}$) para a secreção de interleucina-4 (IL-4). Findadas as 4h, congelou-se o sobrenadante de tais amostras. A quantificação da secreção de IL-4 foi realizada pela técnica de ELISA sanduíche, e seguiu o protocolo do fabricante para o kit ELISA IL-4 (BD OptEIA ELISA kit IL-4 anti-rat, Becton Dickinson, San Diego, CA, EUA). Resumidamente, placas de 96 compartimentos para ELISA, previamente recobertas com o anticorpo de captura para IL-4 anti-rato (diluição de 1:250), foram lavadas e bloqueadas com tampão específico por 1h, para posterior adição das amostras teste compostas pelo sobrenadante celular (previamente congelado), além de concentrações conhecidas de padrões para IL-4. Após um período de incubação de 2h, a placa foi novamente lavada e tratada com o anticorpo de detecção, IL-4 anti-rato biotilado (diluição 1:250), por 1h. A seguir, após mais uma etapa de lavagem, a placa foi adicionada com solução enzimática estreptavidina-*horseradish* peroxidase (diluição 1:250) e incubada por 30 min. Após cautelosa lavagem da placa, seguiu-se a adição da solução de substrato, formada por uma mistura 1:1 de TMB (tetra-metil-benzidina) e peróxido de hidrogênio, e a reação enzimática prosseguiu até que o sobrenadante adquirisse uma coloração azulada. Neste momento, a reação enzimática foi terminada com a adição do tampão de parada e a absorbância das soluções foi medida em 450 nm utilizando-se um leitor de microplacas.

4.2.7. Ensaios para análise de viabilidade celular

Células RBL-2H3 foram semeadas em placas de cultura de células com 96 compartimentos, nas concentrações de $3,5 \times 10^5$ e $2,5 \times 10^5$ células/mL, referentes aos períodos de incubação célula-piridovericina de 1 e 4h, respectivamente. Uma vez semeadas como indicadas, as células foram incubadas por 24h a 37°C . A seguir, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com 200 mL de PBS. Adicionou-se, então, novo meio à cultura celular, junto de diferentes concentrações de piridovericina (0-100 μM) e as células foram incubadas com piridovericina pelos períodos já mencionados, a 37°C . Findados os períodos de incubação célula-piridovericina, às amostras foram adicionados 5 μL de uma solução estoque 10 mg/mL de resazurina sódica, seguido de nova incubação celular, a 37°C ,

por 3h ou até que as amostras adquirissem uma forte coloração rosa. As medidas de viabilidade celular foram baseadas na leitura de fluorescência das microplacas nos comprimentos de onda de 530 e 590 nm para excitação e emissão de fluorescência, respectivamente. Medidas de fluorescência para amostras controle não-tratadas com piridovericina foram usadas como um indicador de 100% de viabilidade celular.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como mencionado em capítulos anteriores, durante uma reação alérgica, o intercruzamento de receptores FcεRI, sensibilizados com moléculas de IgE, causa a degranulação de mastócitos e a consequente liberação de mediadores tais como a histamina e serotonina, os quais provocam um rápido aumento da permeabilidade vascular e contração da musculatura lisa dos órgãos expostos ao alérgeno, e, portanto, desempenham um papel chave na patogênese das alergias e desordens inflamatórias (TANIFUJI *et al.*, 2010; HUBER *et al.*, 2012; CHANDRASHEKAR *et al.*, 2011). A enzima β-hexosaminidase, armazenada nos grânulos secretórios de mastócitos, assim como a histamina, é liberada juntamente com este último mediador quando os mastócitos são imunologicamente ativados. Desta forma, a secreção de β-hexosaminidase é frequentemente usada para determinar a extensão da degranulação mastocitária e para avaliar o potencial anti-alérgico de inibidores deste processo (LEE *et al.*, 1999).

A degranulação de células RBL-2H3, estimulada pelo antígeno DNP-BSA, foi substancialmente inibida pela piridovericina, de forma concentração-dependente, como mostra a **Figura 45**. O valor de CI_{50} para a inibição da degranulação foi de $7,4 \pm 1,2 \mu M$. Vale ressaltar, assim como destacado no **Capítulo 2**, que a potência da atividade inibitória da piridovericina foi drasticamente maior em comparação à atividade do estabilizador de mastócitos, fumarato de cetotifeno, comumente empregado como controle positivo para ensaios desta natureza ($CI_{50}=155 \mu M$, ver **Figura 45, Capítulo 2**). A maior concentração de piridovericina testada ($100 \mu M$) inibiu fortemente a liberação de β-hexosaminidase, enquanto que esta mesma concentração determinou uma fraca redução, ainda que estatisticamente significativa, da viabilidade das células RBL-2H3, como ilustra a **Figura 46**. Além disso, a resposta de degranulação foi atenuada em concentrações menores de piridovericina, as quais não causaram morte celular. Como a morte celular poderia também determinar uma redução da liberação de β-hexosaminidase, estes resultados sugerem que a inibição da degranulação induzida por antígeno não foi devida aos efeitos citotóxicos da piridovericina.

Figura 45. Efeito inibitório da piridovericina sobre a degranulação de mastócitos induzida por antígeno. Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações de piridovericina, seguido de estímulo celular com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 $\mu\text{g/mL}$). Após incubação, a 37 °C, por 1h, células foram incubadas com MUG, 1,2 mM, por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett, indicaram significância estatística de * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, em relação ao controle.

Figura 46. A piridovericina não afeta, substancialmente, a viabilidade de mastócitos RBL. Células RBL-2H3, incubadas com diferentes concentrações de piridovericina, por 1h, tiveram sua viabilidade avaliada através de medidas de fluorescência da resofurina, resultante da redução da resazurina, por células viáveis. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett, indicaram significância estatística de $**P < 0,01$, em relação ao controle.

Como já discutido no capítulo anterior, é importante investigar se a redução da fluorescência quantificada no ensaio de degranulação, quando as células foram tratadas com piridoericina, decorreu de um efeito deste metabólito sobre a liberação da β -hexosaminidase, ou seja, pela inibição da secreção mastocitária, ou se, na realidade, a piridovericina reduziu a atividade enzimática da β -hexosaminidase, o que também seria responsável por uma redução da intensidade de fluorescência. Neste sentido, ensaios baseados no tratamento do sobrenadante de lisados de células RBL-2H3, contendo a enzima β -hexosaminidase, com a piridovericina, podem esclarecer a natureza do efeito inibitório deste composto. Como mostra a **Figura 47**, apenas concentrações mais elevadas de piridovericina (50-100 μ M) levaram à uma pequena inibição da atividade da enzima β -hexosaminidase. Estes resultados fornecem fortes evidências do efeito regulador da piridovericina sobre as respostas de degranulação de células estimuladas por um antígeno.

Figura 47. A piridovericina não afeta, substancialmente, a atividade da enzima β -hexosaminidase. O sobrenadante de células RBL-2H3, previamente lisadas por sonicação, foi tratado com diferentes concentrações de piridovericina e incubada com solução de MUG, pH 4,4, por 1h, a 37 °C. A reação enzima-substrato foi parada em tampão pH 10. A quantificação da atividade enzimática foi baseada nas medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, o produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam os desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett, indicaram significância estatística de * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$, em relação ao controle.

Interessantemente, a lavagem de células RBL, previamente tratadas com diferentes concentrações de piridovericina, para posterior estímulo antigênico, anula completamente o efeito inibitório deste metabólito sobre a degranulação, como mostra a **Figura 48**. Estes resultados são consistentes com a possibilidade da piridovericina atuar como um inibidor competitivo da resposta de degranulação, uma vez que sua atividade pôde ser rapidamente revertida, após sua retirada.

Figura 48. O efeito inibitório da piridovericina sobre a degranulação de mastócitos, estimulada por antígeno, é reversível. Células RBL, pré-tratadas com diferentes concentrações de piridovericina, foram estimuladas com antígeno (Ag, DNP-BSA, 0,4 $\mu\text{g/mL}$), após remoção, ou não, da piridovericina por lavagem. Após incubação a 37 °C por 1h, células foram incubadas com MUG 1,2 mM por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam o desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análises pelo teste t de Student, indicaram significância estatística de * $P < 0,05$, *** $P < 0,01$ e **** $P < 0,0001$, quando comparadas as amostras com e sem etapa de remoção da piridovericina.

Os resultados até o momento indicam que a piridovericina é um potente e reversível inibidor da degranulação de mastócitos induzida por antígeno. A compreensão do(s) mecanismo(s) pelo qual a piridovericina modula a exocitose constituiu a próxima etapa de estudo do presente trabalho. Como mencionado anteriormente, a ativação de mastócitos, através do intercruzamento de receptores FcεRI com um antígeno, inicialmente ativa quinases essenciais da família Src, tais como Lyn. A proteína Lyn fosforila os resíduos de tirosina citosólicos nos ITAMs das subunidades β e γ do receptor FcεRI. As ITAMs fosforiladas recrutam Lyn e Syk, esta última outra proteinoquinase da família Src. A interação de Syk com o ITAM-γ fosforilado resulta em sua alteração conformacional e aumento de sua atividade enzimática. Estas proteinoquinas levam à promoção de um complexo sinalizador organizado pela proteína LAT, o qual medeia a propagação dos sinais de ativação através de eventos como a fosforilação da PLCγ e influxo de Ca²⁺ (FURUNO e NAKANISHI, 2005; ROSSI *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2008) (Vide esquema na **Figura 3**).

Com base no que foi exposto, as quinases da família Src são importantes reguladoras da degranulação e produção de citocinas alérgicas durante a ativação de mastócitos mediada por IgE (KIM *et al.*, 2009). Portanto, compostos que inibem a fosforilação, e consequente ativação destas proteínas, constituem inibidores com elevado potencial terapêutico para o tratamento de desordens alérgicas.

A ativação de quinases Src é um evento proximal ao receptor FcεRI e que depende do intercruzamento deste último. Neste contexto, uma das abordagens mais simples para investigar se a inibição das proteinoquisases Src está envolvida no mecanismo de ação de um modulador da degranulação, estimulada por antígeno, é baseada na verificação do efeito inibitório do composto sobre a degranulação de células estimuladas por outras vias que independem do intercruzamento do receptor FcεRI. Como já discutido no **Capítulo 1**, a tapsigargina apresenta a capacidade única de inibir a reposição das reservas de Ca²⁺ do retículo endoplasmático, sensíveis ao InsP₃, através do bloqueio da bomba SERCA. A consequente mobilização de Ca²⁺ dos estoques intracelulares ativa canais CRAC para promover a SOCE (para revisão, ver **item 1.3** do capítulo de introdução). Foi demonstrado que o forte influxo de Ca²⁺ ativado pela tapsigargina faz deste fármaco um potente estímulo para a degranulação de mastócitos, de forma independente da ativação dos receptores FcεRI (MA e BEAVEN, 2009).

Desta forma, os estudos acerca do mecanismo de ação da piridovericina sobre a degranulação de mastócitos foram iniciados através da investigação do efeito deste metabólito sobre degranulação de células estimuladas por tapsigargina. Como demonstrado

na **Figura 49**, a degranulação mastocitária induzida por tapsigargina foi fortemente inibida pela piridovericina. Interessantemente, o valor de CI_{50} encontrado para atividade da piridovericina foi de $6,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$, bastante próximo àquele determinado para a inibição de mastócitos estimulados por antígeno.

Figura 49. Efeito inibitório da piridovericina sobre a degranulação de mastócitos induzida por tapsigargina. Células RBL foram tratadas com diferentes concentrações de piridovericina seguido de estímulo celular com tapsigargina (tap, 0,2 nM). Após incubação, a 37 °C, por 1h, células foram incubadas com MUG, 1,2 mM, por subsequentes 30 min e a degranulação foi quantificada através de medidas de fluorescência da metil-umbeliferona, produto da clivagem de MUG pela enzima β -hexosaminidase. Nesta curva representativa de três experimentos independentes, as barras de erro representam o desvio padrão para amostras em triplicata de um único experimento. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett, indicaram significância estatística de $*P < 0,05$ e $***P < 0,001$, em relação ao controle.

O efeito inibitório quase que equipotente da piridovericina sobre as respostas de degranulação induzidas por antígeno e tapsigargina indica que provavelmente o(s) alvo(s) molecular da piridovericina seja comum às duas vias de estímulo celular. Estes resultados, portanto, excluem ou tornam pouco provável que a inibição das enzimas envolvidas exclusivamente na cascata de sinalização intracelular iniciada via receptor FcεRI, como as proteinoquinas Src ou até mesmo o próprio receptor, esteja compreendida no mecanismo pelo qual a piridovericina modula a atividade de mastócitos.

Um dos primeiros eventos compartilhados por células que são ativadas por um antígeno ou tapsigargina é a elevação da concentração citoplasmática de Ca^{2+} e, portanto, foi investigado se a piridovericina poderia inibir este processo. Como mostra a **Figura 50**, a piridovericina inibiu substancialmente a resposta de Ca^{2+} induzida por antígeno.

Figura 50. A piridovericina inibe substancialmente a resposta de Ca^{2+} induzida por antígeno. Células RBL sensibilizadas com anti-DNP IgE e carregadas com o indicador de Ca^{2+} , Fluo-4, foram pré-incubadas com piridovericina por 20 minutos antes do estímulo antigênico (DNP-BSA, 0,4 µg/mL). Os níveis de Ca^{2+} foram determinados com base em medidas de fluorescência de Fluo-4.

A agregação de complexos FcεRI-IgE por um antígeno dispara diversas vias de sinalização, dentre as quais inclui-se a ativação da PLCγ. Esta enzima cliva PtdIns(4,5)P₂ e gera os segundos mensageiros DAG e InsP₃. A partir de então, ocorre um pequeno e transiente aumento da concentração de Ca²⁺ no citosol, devido ao efluxo de Ca²⁺ de reservas do retículo endoplasmático sensíveis a InsP₃ e um subsequente influxo sustentado de Ca²⁺ através da membrana plasmática, por meio dos canais CRAC (LAW *et al.*, 2011). O fato de que a piridovericina inibe as respostas de degranulação independentes da ativação de PLCγ e geração de InsP₃, *i.e.* através do estímulo das células com tapsigargina, indica que seu efeito sobre a mobilização de Ca²⁺, induzida por antígeno, provavelmente não decorre da inibição desta fosfolipase. Os resultados permitem ainda especular que a piridovericina poderia inibir a entrada de Ca²⁺ através dos canais CRAC, um evento considerado essencial para o funcionamento dos mastócitos.

A mobilização de Ca²⁺ é central para dirigir a degranulação de vesículas contendo histamina e a síntese *de novo* de mediadores lipídicos (JIN *et al.*, 2011). De fato, foi demonstrado que mastócitos de camundongos deficientes nos componentes dos canais CRAC, as proteínas STIM1 ou Orai1, produzem fracos sinais de Ca²⁺ em resposta a um agonista. Estes mastócitos são caracterizados por um severo comprometimento da liberação de histamina, produção reduzida de leucotrienos e secreção diminuída de citocinas, além de grande inabilidade de montar uma resposta anafilática subcutânea funcional (BABA *et al.*, 2008; VIG *et al.*, 2008).

Além da liberação de mediadores inflamatórios dos grânulos citoplasmáticos, existe uma série de componentes nucleares que contribui significativamente para a ativação de mastócitos, após o intercruzamento dos receptores FcεRI. Moléculas sinalizadoras que translocam do citoplasma para o núcleo, após agregação dos receptores FcεRI, desempenham papéis importantes na indução da expressão de vários genes que codificam a síntese de citocinas, as quais incluem as interleucinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 e quimiocinas, como o fator de necrose tumoral α (TNF-α) (FURUNO e TAKANISHI, 2005). Tais citocinas e quimiocinas orquestram a fase tardia das reações alérgicas, as quais são caracterizadas pelo recrutamento e ativação de granulócitos e linfócitos para o sítio de exposição ao alérgeno (HUBER *et al.*, 2012).

Fatores de transcrição, tais como o fator nuclear de ativação de células T (NF-AT), ligam-se a promotores de genes para citocinas. A localização nuclear e a ativação de NF-AT são reguladas pelo calcinério, uma fosfatase dependente de Ca²⁺. Além disso, três das principais subfamílias das MAPKs, as quais são quinases reguladas por sinal extracelular

(ERKs), quinases c-Jun NH₂-terminal (JNKs) e p38, são ativadas através da fosforilação sequencial de proteinoquinas citosólicas, as quais conduzem sinais da membrana plasmática para o citosol e para alvos nucleares e, dessa forma, regulam fatores de transcrição nucleares. Foi demonstrado que diferenças nos níveis de Ca²⁺ citoplasmático podem afetar a fosforilação e importação nuclear de ERK2 (FURUNO e TAKANISHI, 2005).

A existência de evidências de que Ca²⁺ poderia modular a transcrição gênica de citocinas motivaram a investigação do efeito da piridovericina sobre a secreção de IL-4, com base no efeito inibitório deste metabólito sobre as respostas de Ca²⁺ induzidas por antígeno. Como mostra a **Figura 51**, a piridovericina inibiu significativamente a secreção mastocitária de IL-4 estimulada por antígeno. Estes resultados, novamente, são consistentes com os níveis reduzidos de Ca²⁺ intracelular, na presença deste inibidor. Vale ressaltar que os efeitos da piridovericina sobre a secreção estimulada de IL-4 não decorrem de morte celular, como exibe a **Figura 52**, visto que a viabilidade das células RBL-2H3, tratadas com piridovericina por um período de 4h, mantém-se inalterada, para todas as concentrações testadas deste metabólito.

Figura 51. A piridovericina inibe a secreção de IL-4. Células RBL sensibilizadas com anti-DNP IgE foram pré-tratadas com piridovericina e estimuladas com DNP-BSA (0,5 μg/mL). A quantificação de IL-4 secretada foi baseada em ensaios de ELISA. Análise de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett indicaram significância estatística de * $P < 0,05$ e **** $P < 0,0001$, em relação ao controle.

Figura 52. A piridovericina não afeta a viabilidade de mastócitos RBL. Células RBL-2H3, incubadas com diferentes concentrações de piridovericina por 4h, tiveram sua viabilidade avaliada através de medidas de fluorescência da resofurina, resultante da redução da resazurina por células viáveis.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou o efeito da piridovericina, um metabólito secundário isolado do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*, sobre a atividade secretória de mastócitos. A piridovericina inibiu, com elevada e similar potência, a degranulação de células estimuladas por vias que dependem, ou não, da ativação dos receptores para IgE. Foi demonstrado que o provável mecanismo para a atividade inibitória da piridovericina é a regulação das respostas de Ca^{2+} de mastócitos estimulados. Foi observado também que a piridovericina inibiu a secreção estimulada de IL-4, possivelmente em função de sua capacidade de reduzir os níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos.

Visto que a ativação e, em particular, a degranulação dos mastócitos são criticamente dependentes do aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , compostos que inibem este processo apresentam potencial terapêutico para o tratamento de distúrbios alérgicos. Neste sentido, a piridovericina pode ser indicada como um candidato ou protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos com indicação anti-alérgica. Os resultados deste trabalho ainda argumentam a favor da contínua exploração de compostos naturais como uma fonte de novos agentes bioativos.

7. REFERÊNCIAS

BABA, Y., NISHIDA, K., FUJII, Y., HIRANO, T., HIKIDA, M., KUROSAKI, T. Essential function for the calcium sensor STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses. **Nature Immunology**, v.9, p.81-88, 2008.

CHANDRASHEKAR, V. M., HALAGALI, K. S., NIVADANI, R. B.M SHALAVADI, M. H.M BIRADAR, B. S., BIWAS, D., MUCHCHANDI, I. S. Anti-allergic activity of German chamomile (*Matricaria recutita* L.) in mast cell mediated allergy model. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, p.336-340, 2011.

CHENG, Y., SCHNEIDER, B., RIESE, U., SCHUBERT, B., LI, Z., HAMBURGER, M. (+)-N-Deoxymilitarinone A, a neuritogenic pyridone alkaloid from the insect pathogenic fungus *Paecilomyces farinosus*. **Journal of Natural Products**, v.69, p.436-438, 2006.

de SILVA, E. D., GEIERMANN, A. S., MITOVA, M. I., KUEGLER, P., BLUNT, J. W., COLE, A. L., MUNRO, M. H. Isolation of 2-pyridone alkaloids from a New Zealand marine-derived penicillium species. **Journal of Natural Products**, v.72, p.477-479, 2009.

FOX, E. M., HOWLETT, B. J. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. **Current Opinion in Microbiology**, v.11, p.481-487, 2008.

- FURUNO, T., NAKANISHI, M. Live cell imaging to study signaling molecules in allergic reactions. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.28, p.1551-1559, 2005.
- HOFFMEISTER, D., KELLER, N. P. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. **Natural Product Reports**, v.24, p.393-416, 2006.
- HUBER, R., STINTZING, F. C., BRIEMLE, D., BECKMANN, C., MEYER, U., GRÜNDEMANN, C. In vitro antiallergic effects of aqueous fermented preparations from citrus and cydonia fruits. **Planta Medica**, v.78, p.334-340, 2012.
- JIN, M., SON, K. H., CHANG, H. W. Luteolin-7-*O*-glucoside suppresses leukotriene C4 production and degranulation by inhibiting the phosphorylation of mitogen activated protein kinases and phospholipase C γ 1 in activated mouse bone marrow-derived mast cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.34, p.1032-1036, 2011.
- KELLER, N. P., TURNER, G., BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism-from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.937-947, 2005.
- KIM, J. W., LEE, J. H., HWUANG, B. Y., MUN, S. H., KO, N. Y., KIM, D. K., KIM, H. S., KIM, Y. M., CHOI, W. S., Morin inhibits Fyn kinase in mast cells and IgE-mediated type I hypersensitivity response in vivo. **Biochemical Pharmacology**, v.77, p.1506-1512, 2009.
- LAW, M., MORALES, J. L., MOTTRAM, L. F., IYER, A., PETERSON, B. R., AUGUST, A. Structural requirements for the inhibition of calcium mobilization and mast cell activation by the pyrazole derivative BTP2. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.43, p.1228-1239, 2011.
- LEE, E., CHOI, E. J., CHEONG, H., KIM, Y., RYU, S. Y., KIM, K. Anti-allergic actions of the leaves of *Castanea crenata* and isolation of an active compound responsible for the inhibition of mast cell degranulation. **Archives of Pharmacal Research**, v.22, p.320-323, 1999.
- LEE, J. H., KIM, J. W., KO, N. Y., MUN, S. H., KIM, D. K., KIM, J. D., WON, H. S., SHIN, H. S., KIM, H. S., HER, E., KIM, Y. M., CHOI, W. S. Mast cell-mediated allergic response is suppressed by *Sophorae Flos*: inhibition of Src-family kinase. **Experimental Biology and Medicine**, v.233, p.1271-1279, 2008.
- MISHRA, B. B., TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.46, p.4769-4807, 2011.
- MA, H., BEAVEN, M. A. Regulation of Ca²⁺ signaling with particular focus on mast cells. **Critical Reviews in Immunology**, v.29, p.155-186, 2009.
- MISIEK, M., HOFFMEISTER, D. Fungal genetics, genomics, and secondary metabolites in pharmaceutical sciences. **Planta Medica**, v.73, p.103-115, 2007.
- NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v.75, p.311-335, 2012.

POSNER, R. G., LEE, B., CONRAD, D. H., HOLOWKA, D., BAIRD, B., GOLDSTEIN, B. Aggregation of IgE-receptor complexes on rat basophilic leukemia cells does not change the intrinsic activity but can alter the kinetics of the ligand-IgE interaction. **Biochemistry**, v.31, p.5350-5356, 1992.

REHNER, S. A., MINNIS, A. M., SUNG, G., LUANGSA-ARD, J. J., DEVOTTO, L., HUMBER, R. A. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycologia**, v.103, p.1055-1073, 2011.

ROSSI, A. B., HERLAAR, E., BRASELMANN, S., HUYNH, S., TAYLOR, V., FRANCES, R., ISSAKANI, S. D., ARGADE, A., SINGH, R., PAYAN, D. G., MASUDA, E. S. Identification of the Syk kinase inhibitor R112 by a human mast cell screen. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.118, p.749-755, 2006.

SCHNEIDER, P., MISIEK, M., HOFFMEISTER, D. In vivo and in vitro production options for fungal secondary metabolites. **Molecular Pharmaceutics**, v.5, p.234-242, 2008.

SHAH, P. A., PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.61, p.413-423, 2003.

SUBRAMANIAN, K.; HOLOWKA, D.; BAIRD, B.; GOLDSTEIN, B. The Fc segment of IgE influences the kinetics of dissociation of a symmetrical bivalent ligand from cyclic dimeric complexes. **Biochemistry**, v.35, p.5518-5527, 1996.

TAKAHASHI, S., UCHIDA, K., KAKINUMA, N., HASHIMOTO, R., YANAGISAWA, T., NAKAGAWA, A. The structures of pyridovericin and pyridomacrolidin, new metabolites from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **The Journal of Antibiotics**, v.51, p.1051-1054, 1998a.

TAKAHASHI, S., KAKINUMA, N., UCHIDA, K., HASHIMOTO, R., YANAGISAWA, T., NAKAGAWA, A. Pyridovericin and pyridomacrolidin: novel metabolites from entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*. **The Journal of Antibiotics**, v.51, p.596-597, 1998b.

TANIFUJI, S., AIZU-YOKOTA, E., FUNAKOSHI-TAGO, M., SONODA, Y., INOUE, H., KASAHARA, T. Licochalcones suppress degranulation by decreasing the intracellular Ca^{2+} level and tyrosine phosphorylation of ERK in RBL-2H3 cells. **International Immunopharmacology**, v.10, p.769-776, 2010.

VIG, M., DEHAVEN, W. I., BIRD, G. S., BILLINGSLEY, J. M., WNAG, H., RAO, P. E. Defective mast cell effector functions in mice lacking the CRACM1 pore subunit of store operated calcium release-activated calcium channels. **Nature Immunology**, v.9, p.89-96, 2008.

WEETALL, M., HOLOWKA, D., BAIRD, B. Heterologous desensitization of the high affinity receptor for IgE (Fc epsilon R1) on RBL cells. **The Journal of Immunology**, v.150, p.4072-4083, 1993.