UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Modulação da apoptose de neutrófilos humanos em cultura pela
galangina e 6,7-diidroxí-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina.

Camila Andresa Carvalho

Ribeirão Preto
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Modulação da apoptose de neutrófilos humanos em cultura pela
galangina e 6,7-diidroxí-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina.

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

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos

Orientada: Camila Andresa Carvalho

Orientadora: Prof^a Dr^a Yara Maria
Lucisano Valim

Ribeirão Preto
2015

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.

Carvalho, Camila Andresa

Modulação da apoptose de neutrófilos humanos em cultura pela galangina e 6,7-diidroxi-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina. Ribeirão Preto, 2015.

110 p.; 30 cm.

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

Orientadora: Lucisano-Valim, Yara Maria

1. Neutrófilo. 2. Cultura celular. 3. Apoptose. 4. 6,7-diidroxi-3-(3',4'-metilenodioxifenil)-cumarina. 5. Galangina. 6. Imunocomplexo.

Camila Andresa Carvalho

Modulação da apoptose de neutrófilos humanos, mantidos em cultura, pela galangina e 6, 7-diidroxi - 3 - (3', 4' - metilenodioxifenil) – cumarina.

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

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos

Orientadora: Prof^a Dr^a Yara Maria
Lucisano Valim

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Agradecimientos

À Deus, pela fé, força e sabedoria para superar todas as dificuldades encontradas.

Aos meus pais, Edson e Terezinha, por me mostrarem o melhor caminho a seguir e pelo apoio e compreensão ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À Diego Brugneroto pelo amor, companheirismo, apoio, confiança e motivação incondicional que sempre me impulsionam em direção às vitórias dos meus desafios.

Aos meus padrinhos Carmen e José Cristiano e às minhas irmãs Fernanda e Tatiana por todo apoio e incentivo na busca pelos meus sonhos e objetivos profissionais.

À Profa Dra. Yara Maria Lucisano Valim, pela orientação na realização deste trabalho e contribuição para o meu crescimento científico e intelectual.

Ao doutorando Micássio Fernandes de Andrade pela amizade sincera, atenção, ensinamentos, momentos de reflexão, discussão dos experimentos e elaboração desta dissertação.

À farmacêutica-bioquímica Ana Elisa C. S. Azzolini, pela amizade sincera, apoio no desenvolvimento dos experimentos e por estar sempre disposta a ajudar.

À doutoranda Andréa S. G. Figueiredo-Rinhel pela amizade sincera, momentos de reflexão e discussão dos experimentos.

Aos pós-doutorandos Dra. Adriana B. P. Paschoalato, Dra. Ana Paula Landi Librandi, Dra. Larissa F. Marchi, Dr. Everton O. L. dos Santos, Dra. Luciana Mariño Kabeya e aos mestrandos Lucineia Reuse Albiero e Lamartine Lemos de Melo pela amizade e apoio científico e intelectual.

À professora Dra. Eleni Mara Marzocchi Machado, por ser exemplo de profissional e por colocar à disposição o laboratório.

Aos professores do laboratório de Bioquímica da FCFRP-USP Dr. Augusto César Cropanese Spadaro, Dra. Carem Gledes Vargas Recchia, Dr. Carlos Curti, Dra. Carolina Patrícia Aires e Dra. Luciane Carla Alherici, por serem exemplos de profissionais e por colocarem à disposição o laboratório.

Aos funcionários do laboratório de Bioquímica da FCFRP-USP Alcides S. Pereira, pelo auxílio técnico na realização dos experimentos e convivência agradável. Nadir Mazzucato pela amizade, carinho, conversas e delicioso café. Luciana Ceribeli, pela amizade e convivência agradável.

Aos funcionários do laboratório de Bioquímica da FCFRP-USP Agnaldo B. da Silva, Ana Cristina M. Pollizelo, Denise C. Damasceno e Jeda Maria R. Prado, pela convivência agradável.

Aos funcionários da seção de Pós Graduação da FCFRP-USP, principalmente, Rosana Ferreira L.S. Florêncio e Eleni Angeli Passos, responsáveis pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela assistência durante o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

À todos aqueles que, embora não citados, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

Resumo

CARVALHO, C.A. **Modulação da apoptose de neutrófilos humanos em cultura pela galangina e 6,7-diidroxi-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina**. 2015. 84f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes na circulação sanguínea, sendo recrutados rapidamente para os locais de infecção e inflamação. Em condições fisiológicas, os neutrófilos circulantes possuem tempo de vida curto, de cerca de 6 a 8 horas, mas a sua sobrevivência pode aumentar em condições inflamatórias. O papel dos neutrófilos em diversas doenças foi negligenciado por muito tempo, em parte devido às dificuldades em seu estudo e manipulação, pois os mesmos são facilmente ativados e difíceis de serem mantidos em cultura. Nos últimos anos, o advento de novas técnicas e o aprimoramento de condições laboratoriais têm possibilitado uma investigação mais ampla da fisiopatologia dos neutrófilos e revelado a diversidade de funções e interações dessas células. Para dar continuidade aos estudos visando o entendimento de como as funções efetoras dos neutrófilos podem ser moduladas por produtos naturais e sintéticos, e a aplicação desse conhecimento no tratamento de patologias nas quais tais leucócitos participam, o presente trabalho estabeleceu, primeiramente, as condições experimentais para a cultura de neutrófilos humanos. As células mantiveram-se viáveis e em estado de repouso por até 24 horas, tanto em solução balanceada de Hank's quanto em meio RPMI. A funcionalidade dos neutrófilos foi avaliada através da sua capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio (ERO), medida por quimioluminescência dependente de luminol (QLlum). Diferentemente do meio RPMI, a solução balanceada de Hank's não interferiu no ensaio de QLlum, possibilitando a análise da funcionalidade das células. Durante o período de cultura celular de 24 horas, os neutrófilos mantiveram a sua capacidade de produzir ERO em quantidades suficientes para serem detectadas e permitirem a avaliação do efeito inibitório de substâncias antioxidantes. Em seguida, este trabalho avaliou o efeito de dois antioxidantes – a 3-fenilcumarina 6,7-diidroxi-3-(3',4'-metilenodioxifenil)-cumarina (C13) e o flavonol galangina – na produção de ERO pelos neutrófilos. Ambas as substâncias inibiram esta função efetora dos neutrófilos durante todo o período de cultura analisado, indicando que as mesmas não foram degradadas a ponto de perderem a sua atividade antioxidante. As condições de cultura padronizadas possibilitaram também a avaliação do efeito da galangina e da C13 na viabilidade celular. Na maior concentração analisada (20 μ M), ambas as substâncias não alteraram a porcentagem de células viáveis (aproximadamente 80%), mas modularam os estágios de sobrevivência dos neutrófilos, reduzindo a porcentagem de células em apoptose e aumentando a porcentagem de células em necrose, principalmente após 18 horas de cultura. Portanto, a solução balanceada de Hank's é adequada para manter neutrófilos humanos em cultura por até 24 horas, possibilitando a avaliação do efeito de substâncias antioxidantes na produção de ERO por estas células e na sua viabilidade.

Palavras-chave: neutrófilo, cultura celular, apoptose, 6,7-diidroxi-3-(3',4'-metilenodioxifenil)-cumarina, galangina, imunocomplexo.

Abstract

CARVALHO, C. A. **Modulation of apoptosis of cultured human neutrophils by galangin and 6,7-dihydroxy-3-[3',4'-methylenedioxyphenyl]-coumarin.** 2015. 84f Dissertation (Master) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Neutrophils are the most abundant leukocytes in blood, which are rapidly recruited to sites of infection and inflammation. Circulating neutrophils have a short lifetime of about 6 to 8 hours under physiological conditions, but their survival can be increased under inflammatory conditions. The role that neutrophils play in various diseases was long neglected, partially due to the difficulties to study and manipulate these cells, which are easy to activate and hard to maintain in culture. In recent years, the development of new techniques and improvement of laboratory conditions have broadened the investigation of neutrophil physiopathology and revealed the variety of functions and interactions of these cells. To continue the studies to understand how the effector functions of neutrophils can be modulated by natural and synthetic products, and to apply such knowledge to treat diseases in which these leukocytes participate, the first part of the present work established the experimental conditions to culture human neutrophils. Cells cultured in either Hank's balanced solution or RPMI medium remained viable and in the resting state for up to 24 hours. Neutrophil functionality was evaluated through its ability to produce reactive oxygen species (ROS), assessed by the luminol-enhanced chemiluminescence assay (CL-lum). In contrast to RPMI medium, Hank's balanced solution did not interfere in the CL-lum assay and thereby allowed analysis of neutrophil functionality. During the 24-hour cell culture period, neutrophils maintained their capacity to produce ROS in detectable amounts that were sufficient to assess the inhibitory effect of antioxidant compounds. Next, this work examined the effect of two antioxidants – the 3-phenylcoumarin 6,7-dihydroxy-3-[3',4'-methylenedioxyphenyl]-coumarin (C13) and the flavonol galangin – on ROS production by neutrophils. Both compounds suppressed this effector function of neutrophils during the whole culture period studied, indicating that they were not degraded to the point of losing their antioxidant activity. The standardized culture conditions also allowed assessing whether galangin and C13 affected cell viability. At the highest concentration tested (20 μ M), both compounds did not alter the cell viability percentage (around 80%) but modulated the neutrophil survival stages by reducing the percentage of apoptotic cells and increasing the percentage of necrotic cells, particularly after 18 hours of culture. Therefore, Hank's balanced solution is suitable to culture human neutrophils for up to 24 hours, and enables to assess the effect of antioxidant compounds on neutrophil ROS production and viability.

Key words: neutrophil, cell culture, 6,7-dihydroxy-3-[3',4'-methylenedioxyphenyl]-coumarin, galangin, immune complex.

Lísta de Figuras

Figura 1.1 Neutrófilos e suas características morfológicas	2
Figura 1.2. Representação esquemática do metabolismo oxidativo dos neutrófilos.....	7
Figura 1.3. Visão geral da via extrínseca e intrínseca de apoptose de neutrófilos e apoptose induzida por fagocitose	11
Figura 1.4. Estruturas químicas dos flavonóides e da galangina	12
Figura 1.5: Estruturas químicas dos derivados 3-fenilcumarínicos e da C13...	13
Figura 3.1. Estruturas químicas das substâncias a serem avaliadas	20
Figura 4.1. Determinação da atividade da enzima LDH de neutrófilos humanos mantidos em cultura na presença dos meios Hank's ou RPMI	31
Figura 4.2. Viabilidade de neutrófilos humanos mantidos em cultura na presença dos meios Hank's ou RPMI	33
Figura 4.3. Quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) de neutrófilos humanos mantidos em cultura na presença dos meios Hank's ou RPMI	35
Figura 4.4. Quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) de neutrófilos humanos mantidos em cultura e estimulados com PMA e imunocomplexos	37
Figura 4.5. Determinação da porcentagem de liberação da enzima LDH de neutrófilos humanos mantidos em cultura na presença do derivado 3-fenilcumarínico (C13) e da galangina.....	41
Figura 4.6. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico (C13) e da Galangina sobre a viabilidade de neutrófilos humanos mantidos em cultura	43
Figura 4.7. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico (C13) e da Galangina sobre a viabilidade de neutrófilos humanos mantidos em cultura	44
Figura 4.8. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico (C13) e da Galangina sobre a viabilidade de neutrófilos humanos mantidos em cultura	45
Figura 4.9. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico (C13) e da Galangina sobre a viabilidade de neutrófilos humanos mantidos em cultura	46
Figura 4.10. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico (C13) e da Galangina sobre a alteração do conteúdo de DNA de neutrófilos humanos mantidos em cultura.....	48

Figura 4.11. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico (C13) e da Galangina sobre a expressão do receptor CD62L de neutrófilos humanos mantidos em cultura.....	49
Figura 4.12. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico (C13) e da Galangina sobre a expressão do receptor CD16 de neutrófilos humanos mantidos em cultura	50
Figura 4.13. Perfis representativos de Quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) de neutrófilos humanos, mantidos em cultura na presença do derivado 3-fenilcumarínico (C13) e da galangina,e estimulados com PMA e imunocomplexos:.....	52
Figura 4.14. Área integrada da quimioluminescência (QLlum) de neutrófilos humanos, mantidos em cultura na presença do derivado 3-fenilcumarínico (C13) e da galangina,e estimulados com PMA e imunocomplexos:.....	53
Figura 4.15. Determinação da atividade da enzima LDH de neutrófilos humanos mantidos em culturana presença do derivado 3-fenilcumarínico (C13) e da galangina, e estimulados com PMA	54
Figura 4.16. Determinação da atividade da enzima LDH de neutrófilos humanos mantidos em culturana presença do derivado 3-fenilcumarínico (C13) e da galangina, e estimulados com Imunocomplexo (IC)	55

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Avaliação da viabilidade de neutrófilos humanos mantidos em cultura na presença dos meios Hank's ou RPMI.....	30
Tabela 2 – Avaliação do efeito citotóxico do Derivado 3-fenilcumarínico (C13) e da galangina sobre neutrófilos humanos mantidos em cultura.....	39

Lísta de Abreviaturas

ANOVA	análise de variância
APAF	fator ativador de protease de apoptose
APC	aloficocianina
Bax e Bak	proteínas pró-apoptóticas
BSA	albumina sérica bovina
CAT	catalase
C5, C3b, C3bi	fragmentos de ativação do sistema complemento
c.p.m.	contagem de fótons por minuto
CR	receptor de complemento
CR1, CR2, CR3 e CR4	receptores de complemento tipo 1, 2, 3 e 4
DEAE	dietilaminoetil
DMSO	dimetilsulfóxido
ERO	espécies reativas de oxigênio
Fc	fragmento cristalizável da molécula de anticorpo
Fc γ R	receptor para a porção Fc de IgG
Fc γ RIIa, Fc γ RIIIb	isoformas de receptores Fc γ
G-CSF	fator estimulador de colônia de granulócitos
GPO	glutathione peroxidase
GSH	glutathione reduzida
GSSH	glutathione oxidada
HBSS	solução salina balanceada de Hanks
HRP	<i>horseradish</i> peroxidase
IC	imunocomplexo (s)
IC IgG-OVA	imunocomplexo de ovalbumina e IgG anti-ovalbumina

IC ₅₀	concentração que inibe 50% da resposta biológica
IFN γ	interferon γ
IgG	imunoglobulina da classe G
LFA-1	antígeno 1 associado a função linfocitária
LDH	lactato desidrogenase
M.M.	massa molecular
MM9	metaloproteinase 9
MOMP	permeabilização da membrana mitocondrial externa
MPO	mieloperoxidase
m/v	massa/volume
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NF- κ B	fator nuclear de transcrição κ B
OVA	ovalbumina
PI	iodeto de propídio
PI3-K	fosfatidilinositol 3-kinase
PICD	Morte celular induzida por fagocitose
PSGL-1	ligante 1 da glicoproteína P-selectina
PMA	acetato de miristoilforbol
QL	quimioluminescência
QLluc	quimioluminescência dependente de lucigenina
QLlum	quimioluminescência dependente de luminol
R _F	fator de retardamento
SDS	dodecil sulfato de sódio
SLPI	inibidor de protease secretória de leucócitos

SOD	superóxido dismutase
TEMED	tetrametilenodiamino
TNF α	fator de necrose tumoral tipo α
TRAIL	ligante indutor de apoptose relacionado à TNF
v/v	volume/volume

Sumário

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Neutrófilos	1
1.2. Grânulos.....	3
1.3. Receptores Fcγ	4
1.4. Fagocitose.....	4
1.5. Metabolismo Oxidativo: produção das espécies reativas de oxigênio (ERO)	6
1.6. Doenças causadas por neutrófilos	8
1.7. Apoptose	9
1.8. Substâncias Fenólicas: flavonoides e derivados 3-fenilcumarínicos	11
1.8.1. Flavonóides e a galangina.....	11
1.8.2. Derivados 3-fenilcumarínicos: 6,7-diidroxi-3-[3',4'-metilenodioxifenil]- cumarina (C13)	13
2. OBJETIVOS.....	15
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	18
3.1. Principais reagentes e soluções.....	19
3.2. Principais equipamentos utilizados	19
3.3. Substâncias avaliadas.....	19
3.4. Preparação de imunoglobulinas de classe G (IgG)	20
3.4.1. Obtenção do soro imune rico em IgG anti-OVA	20
3.4.2. Purificação do soro imune rico em IgG anti-OVA.....	21
3.4.3. Caracterização da preparação de IgG total rica em IgG anti-OVA.....	21

3.4.4. Determinação do ponto de equivalência da reação antígeno-anticorpo.....	22
3.5. Sujeitos da pesquisa	23
3.5.1. Aspectos éticos	23
3.5.2. Obtenção dos neutrófilos.....	23
3.6. Padronização da cultura de neutrófilos humanos e avaliação da viabilidade celular na presença e ausência das substâncias estudadas	24
3.6.1. Cultura de neutrófilos	24
3.6.2. Viabilidade celular	24
3.6.2.1. Alteração de membrana por exclusão ao corante azul de tripan e determinação da atividade da lactato desidrogenase (LDH) - necrose	24
3.6.2.2. Análise do índice de apoptose e necrose, utilizando anexina V e iodeto de propídio (PI) em citometria de fluxo	25
3.6.2.3. Avaliação da expressão dos receptores FcγIIIb (CD16) e CD62L	26
3.6.2.4 Análise da alteração do conteúdo de DNA.....	26
3.6.2.5. Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) por neutrófilos humanos, mantidos em cultura, estimulados com imunocomplexos e estímulo solúvel.....	27
3.7. Análise de dados.....	27
4. RESULTADOS.....	28
Parte I: Padronização das condições de cultura de neutrófilos humanos	29
4.1. Padronização das condições de cultura de neutrófilos humanos.....	30
4.1.1. Avaliação da viabilidade celular, dos neutrófilos mantidos em cultura, através da análise da alteração de membrana por exclusão ao corante azul de tripan e determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH): comparação dos meios de cultura Hank´s-gel e RPMI	30
4.1.2. Análise do índice de apoptose e necrose, utilizando Anexina V e iodeto de propídio (PI) em citometria de fluxo: comparação dos meios de cultura Hank´s-gel e RPMI	32

4.1.3. Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) por neutrófilos humanos, mantidos em cultura, estimulados com imunocomplexos e estímulo solúvel (PMA): comparação dos meios de cultura Hank's-gel e RPMI	33
Parte II: Avaliação do flavonoide galangina e do derivado 3-fenilcumarínico 6, 7-diidroxi - 3 - (3', 4'- metilenodioxifenil) - cumarina (c13) na viabilidade celular e na produção de espécies reativas de oxigênio de neutrófilos humanos mantidos em cultura	38
4.2. Avaliação do flavonoide galangina e do derivado 3-fenilcumarínico 6, 7-diidroxi - 3 - (3', 4'- metilenodioxifenil) - cumarina (c13) na viabilidade celular e na produção de espécies reativas de oxigênio de neutrófilos humanos mantidos em cultura	38
4.2.1. Avaliação da viabilidade celular, através da análise da alteração de membrana por exclusão ao corante azul de tripan e determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH)	38
4.2.2. Análise do índice de apoptose e necrose, utilizando Anexina V e iodeto de propídio (PI) em citometria de fluxo	41
4.2.3. Análise da alteração do conteúdo de DNA, utilizando Iodeto de Propídio (PI) em citometria de fluxo	47
4.2.4. Análise da expressão do receptor CD62L de neutrófilos humanos mantidos em cultura, utilizando citometria de fluxo	48
4.2.5. Análise da expressão do Fc γ RIIIb (CD16) de neutrófilos humanos mantidos em cultura, utilizando citometria de fluxo	49
4.2.6. Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) por neutrófilos humanos estimulados com imunocomplexos e estímulo solúvel (PMA)	50
4.2.7. Determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) de neutrófilos humanos, mantidos em cultura, e estimulados com Imunocomplexo e estímulo solúvel (PMA)	53
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS.....	65

APÊNDICE..... 77

ANEXOS 82

1. Introdução

1.1. Neutrófilos

Os neutrófilos são células sanguíneas pertencentes à linhagem dos glóbulos brancos, que fazem parte do sistema imune inato e possuem um papel crucial na primeira linha de defesa contra a invasão de bactérias, fungos e protozoários (Hatanaka et al., 2006; Gungor et al., 2010; Nguyen-Jackson et al., 2010). Em condições normais, o tempo de vida dos neutrófilos na circulação é de cerca de 6 a 8 horas, mas durante processos inflamatórios, essas células podem receber estímulos que elevam o seu tempo de vida na circulação sanguínea (Cascão et al., 2010; Pruchniak et al., 2013; Wang; Arase, 2014).

Os neutrófilos são formados na medula óssea e são classificados como granulócitos, como os eosinófilos e basófilos, por possuírem grânulos capazes de eliminar patógenos. Sua maturação é um processo que requer fatores de crescimento como o fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), e envolve vários estágios de desenvolvimento que incluem pró-mielócitos, mielócitos e metamielócitos, até a completa maturação com a formação dos grânulos e a segmentação do núcleo (Bardoel et al, 2014) (Figura 1.1).

Figura 1.1. Neutrófilo e suas características morfológicas: núcleo segmentado e grânulos citoplasmáticos. Fonte: Laboratório de Bioquímica da FCFRP-USP.

Após a geração na medula óssea, os neutrófilos maduros migram através da parede dos vasos pela via paracelular (entre as células endoteliais) ou via transcelular (através das células endoteliais), para os locais de inflamação ou infecção em direção às maiores concentrações dos estímulos quimiotáticos exógenos (ex: produtos bacterianos) ou endógenos (ex: citocinas, C5, etc.) (Cicchetti et al, 2002; Mócsai, 2013; Mayadas et al., 2014). O recrutamento rápido de neutrófilos para os tecidos é de fundamental importância para o sistema imunológico inato (Kobayashi; DeLeo, 2012).

Durante a fase inicial de uma resposta inflamatória, o endotélio vascular expressa moléculas de adesão como P e E-selectinas que irão interagir com ligantes expressos constitutivamente nos neutrófilos – PSGL-1 (glicoproteína ligante de P-selectina – 1), levando

à ligação inicial dos neutrófilos ao endotélio (captura), seguido do rolamento ao longo do endotélio, firme adesão às células endoteliais, rastejamento ao longo do endotélio, e a transmigração de neutrófilos para o tecido em direção ao local da inflamação, ativando a maquinaria microbicida dos neutrófilos (Borregaard, 2010; Bardoel et al, 2014; Mayadas et al., 2014).

1.2. Grânulos

Para que os neutrófilos exerçam sua função imunológica são necessárias diversas proteínas pertencentes a três tipos de grânulos que são liberados no processo de degranulação (Pruchniak et al., 2013). À medida que vão se diferenciando na medula óssea, os granulócitos desenvolvem grânulos citoplasmáticos por um processo denominado granulopoiese (Borregaard, 2010). Os neutrófilos formam os grânulos de forma contínua durante seu processo de diferenciação que consiste em mieloblastos, promielócitos, fase na qual se originam os grânulos primários, mielócitos, que originam os grânulos secundários, metamielócitos – que formam os grânulos terciários e, finalmente, neutrófilos segmentados, que originam as vesículas secretórias e são capazes de deixar a medula óssea e entrar na corrente sanguínea (Bardoel et al, 2014; Wang; Arase, 2014).

A liberação desses grânulos e vesículas durante a resposta inflamatória ocorre de forma sucessiva e inversa à sua produção, sendo as vesículas secretórias as primeiras a serem liberadas, seguidas pelos grânulos terciários, secundários e primários, respectivamente (Pruchniak et al., 2013).

Os grânulos primários ou azurófilos contêm principalmente agentes antimicrobianos como defensinas, mieloperoxidase (MPO) – que é a responsável pela conversão do Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2), em ácido hipocloroso (HOCl), principalmente; elastase e catepsina G. Grânulos secundários ou específicos contêm principalmente fosfatase alcalina, lactoferrina, lisozima, o complexo enzimático da NADPH oxidase e collagenase. A lactoferrina sequestra ferro livre, o que inibe o crescimento bacteriano e aumenta a permeabilidade à lisozima, culminando na ruptura da parede celular bacteriana. Já os grânulos terciários são compostos principalmente de duas proteínas, catepsina e gelatinase (conhecidos também como metaloprotease nove (MMP9), enzimas capazes de degradar componentes da matriz extracelular, incluindo colágeno, fibronectina e proteoglicano, o que facilita o processo de diapedese e migração dos neutrófilos (Van der Veen et al., 2009; Mayadas et al., 2014). As vesículas secretórias são constituídas de receptores de membrana e outras proteínas funcionais, tais como receptores para lipopolissacarídeos (CD14), receptores de

complemento, imunocomplexos (FcγR), integrinas LFA-1 (CD11a/CD18) e Mac-1 (CD11b/CD18), promovendo o recrutamento de neutrófilos (Borregaard, 2010; Hajishengallis et al, 2014; Mayadas et al., 2014).

A degranulação é um processo de exocitose, no qual grânulos e vesículas fundem com o fagossoma ou com a membrana citoplasmática, liberando substâncias líticas, microbicidas e outras moléculas, desencadeando as principais funções efetoras dos neutrófilos na defesa do organismo, já que além de aumentar o número de receptores de membrana, acentuando a fagocitose, ativa as vias de sinalização intracelular, permitindo a produção de ERO e culminando com a eliminação dos agentes infecciosos (Uriarte et al., 2011; Pruchniak et al., 2013; Bardoel et al., 2014).

1.3. Receptores Fcγ

Os neutrófilos expressam receptores que estão envolvidos desde o reconhecimento de patógenos até a resolução da inflamação. Os receptores Fc são responsáveis pelo reconhecimento de patógenos mediado por imunocomplexos, sendo os mais importantes os receptores Fcγ, incluindo os receptores de ativação FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) - FcγRIIa, FcγRIIc, FcγRIII (CD16) - FcγRIIIa e FcγRIIIb, e o receptor inibidor FcγRIIb (Futosi et al., 2013; Pincetic et al., 2014).

Os neutrófilos são as únicas células que apresentam em sua membrana dois desses receptores de forma constitutiva, FcγRIIa e FcγRIIIb, porém, FcγRI é expresso quando estes são ativados por citocinas inflamatórias, como o interferon-γ (Van Der Poel et al., 2011). A ativação dos neutrófilos por imunocomplexos ocorre através da ligação deste com o FcγRIIIb, seguido pela ativação completa da célula através da ligação sinérgica com FcγRIIa, induzindo a fagocitose e a liberação do conteúdo lisossomal (Clark; Petty, 2010; Futosi et al. 2013).

1.4. Fagocitose

Os neutrófilos englobam e digerem os patógenos através de um processo denominado fagocitose (Kobayashi; DeLeo, 2012). Os neutrófilos, macrófagos e células dendríticas compõem um grupo de células denominado de fagócitos profissionais (Soehnlein et al., 2010). Os neutrófilos, assim como os macrófagos, podem internalizar tanto partículas opsonizadas, quanto não opsonizadas. No entanto, a opsonização facilita o processo de fagocitose. Dessa forma, quando partículas opsonizadas se ligam aos receptores para componentes solúveis do sistema complemento tipo 1 (CR1; CD35) e tipo 3 (CR3; CD11b/CD18; Mac-1), são internalizadas por um processo de invaginação, enquanto que a

ligação aos receptores para o fragmento cristalizável das imunoglobulinas [FcγRIIa (CD32) e FcγRIIIb (CD16)] inicia a emissão de pseudópodes, envolvendo a partícula a ser fagocitada. Porém, ambos os casos resultam na formação do fagossomo (Pruchniak et al., 2013).

Após sua ativação, os neutrófilos organizam em sua membrana os receptores dependentes de opsoninas, possibilitando o reconhecimento das partículas opsonizadas e o seu engolfamento (Borregaard, 2010; Cascão et al., 2010; Kobayashi; DeLeo, 2012). Esse processo possibilita a reorganização do citoesqueleto, de modo que a membrana da célula emite pseudópodes que facilitam a ingestão de partículas opsonizadas, a degranulação e a ativação do metabolismo oxidativo, sendo que essas funções efetoras atuam em conjunto na digestão do patógeno fagocitado (Luerman et al., 2010; Flannagan et al., 2012). Os patógenos ingeridos são engolfados por vacúolos ligados à membrana, os fagossomos, que se fundem com vesículas lisossomais contendo grânulos citoplasmáticos compostos de enzimas, formando o fagolisossoma, num processo denominado maturação fagossomal. No fagolisossoma ocorrerá a liberação dos grânulos, que contêm enzimas líticas, e ERO, destruindo os microrganismos ou partículas engolfadas (Nunes; Demaurex, 2010; Costa et al., 2010; Mayadas et al., 2014).

Os neutrófilos engolfam e destroem agentes patogênicos rapidamente, o que é uma vantagem em termos de defesa do hospedeiro. Porém, durante a fagocitose e a maturação fagossomal os grânulos podem fundir-se com o fagossoma antes de sua selagem completa, liberando substâncias líticas e produtos oxidativos fora dos neutrófilos, levando à liberação de conteúdos líticos e produtos oxidativos fora do neutrófilo e, conseqüentemente, lesando as demais células (Mayadas et al., 2014).

Moléculas que interagem com receptores de membrana dos neutrófilos ativam as vias de transdução de sinal que prolongam a sobrevivência das células, facilitam a adesão e a fagocitose, aumentam a liberação de citocinas, quimiocinas e Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e promovem a degranulação, contribuindo assim para a resposta imune inata. (Kobayashi; DeLeo, 2012).

Após a fagocitose, os neutrófilos ativados entram em apoptose e são fagocitados pelos macrófagos, um processo essencial para o término da resposta inflamatória. Além disso, os neutrófilos circulantes, que não são ativados, também sofrem apoptose (Bainton, 1999; Galley et al., 2008).

1.5. Metabolismo Oxidativo: produção das espécies reativas de oxigênio (ERO)

O metabolismo oxidativo de neutrófilos forma espécies oxidantes com atividade microbicida, sobretudo as espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), como o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila ($HO^{\bullet}$), o ácido hipocloroso ($HOCl$), cloraminas, óxido nítrico (NO), e peroxinitrito ($OONO^-$) (Fialkow, 2007). A ativação dos neutrófilos leva a um aumento brusco no consumo de oxigênio, um processo denominado “burst” oxidativo ou explosão respiratória (Pruchniak et al., 2013; Kobayashi; DeLeo, 2012; Mayadas et al., 2014).

Com a ativação dos neutrófilos, o complexo enzimático da NADPH oxidase transfere elétrons para o O_2 , reduzindo-o a radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que é a primeira espécie reativa de oxigênio formada e a fonte das demais ERO produzidas durante a fagocitose (Pruchniak et al., 2013). Assim, o superóxido produzido pode ser dismutado a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da enzima superóxido dismutase. O superóxido pode ainda reagir com o H_2O_2 , na presença de ferro, formando radical hidroxila ($HO^{\bullet}$). Por último, o H_2O_2 pode ser convertido pela enzima mieloperoxidase (MPO) liberada dos grânulos primários, na presença de íons cloreto, em ácido hipocloroso ($HOCl$) e outras espécies halogenadas que têm um poder microbicida muito maior do que as ERO produzidas anteriormente (Lambeth, 2004; Pugine et al., 2005; Mayadas et al., 2014).

Figura 1.3. Representação esquemática do metabolismo oxidativo dos neutrófilos. (1): O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é produzido pelo complexo enzimático da NADPH oxidase. (2): O $O_2^{\bullet-}$ é dismutado pela SOD, produzindo H_2O_2 . (3): H_2O_2 , por ação da enzima MPO proveniente dos grânulos citoplasmáticos, produz HOCl e outras espécies halogenadas. (4): Formação de outras espécies oxidantes, por meio de diversas reações químicas. (5): Compostos antioxidantes inativam as ERO que extravasam para o citosol e/ou para o meio extracelular. Fonte: KABEYA, (2006) [adaptado de KLEIN (1990), WEISS (1989) e HALLIWELL (1999)]. **Abreviaturas:** CAT: catalase; GPO: glutatona peroxidase; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada; MPO: mieloperoxidase; SLPI: inibidor de protease secretória de leucócitos; SOD: superóxido dismutase.

Apesar da produção e liberação das ERO serem processos controlados, sua liberação desordenada é uma das principais causas de diversas doenças inflamatórias, já que contém enzimas que degradam o tecido adjacente (Simões-Ambrosio et al., 2010; Kobayashi; DeLeo, 2012; Pruchniak et al, 2013).

A produção de ERO pode ser mensurada através de um processo conhecido como quimioluminescência, já que durante o burst oxidativo os neutrófilos emitem luz, utilizando-se sondas quimioluminescentes como o luminol e a lucigenina que aumentam a eficiência de detecção de fótons. O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é detectado pela lucigenina (QLuc) no meio extracelular, uma vez que este não permeia a membrana das células, enquanto que a produção total de ERO pode ser medida pelo luminol (QLum) já que este se difunde através da membrana das células (Simões-Ambrósio et al., 2010). Sendo assim, é possível investigar a ação de um composto antioxidante nas diversas etapas de produção das ERO (Lucisano-Valim et al., 2002).

1.6. Doenças relacionadas aos neutrófilos

Conforme descrito acima, os neutrófilos atuam na defesa do organismo principalmente por meio da fagocitose, degranulação e produção de espécies oxidantes. A ativação inapropriada e prolongada dessas células por fatores como citocinas, derivados bacterianos e imunocomplexos (IC) pode ocasionar danos teciduais relacionados a diversas doenças, como doenças autoimunes, aterosclerose e complicações diabéticas (Luerman et al., 2010; Segel et al., 2011). Um exemplo disso são as doenças no qual ocorre a deposição de imunocomplexos (IC).

Em patologias que envolvem a deposição de IC, como na artrite reumatoide e no lúpus eritematoso sistêmico, há recrutamento de um grande número de neutrófilos para os locais de deposição desses IC (Mayadas et al., 2009). Os neutrófilos são ativados via receptores Fcγ e CR, porém eles não conseguem fagocitá-los, uma vez que os IC estão aderidos ao tecido, ocorrendo a fagocitose frustrada. Com isso, são liberados os componentes tóxicos dos grânulos e espécies oxidantes, resultando em lesão tecidual (Kurien et al., 2006; Mayadas et al., 2014).

Os neutrófilos presentes na sinóvia de pacientes com Artrite Reumatóide precoce possuem sobrevida maior quando comparados com outros estágios da doença ou com indivíduos saudáveis (Andersson et al., 2008). Além disso, o aumento da sobrevida dessas células em pacientes com artrite reumatóide independe do estágio da patologia, dado que neutrófilos do sangue periférico de pacientes em diferentes estágios da doença possuem deficiências no processo apoptótico, favorecendo a sobrevivência dessas células no foco inflamatório (Weinmann et al., 2007).

Portanto a modulação da sobrevivência dos neutrófilos é um alvo terapêutico potencial para inúmeras doenças inflamatórias e autoimunes, como a artrite reumatoide e o lúpus eritematoso sistêmico (Rahman et al., 2006).

1.7. Apoptose

Os neutrófilos possuem um papel crucial na imunidade inata, sendo as primeiras células recrutadas para os locais de lesão e infecção. Entretanto, seus mecanismos de defesa que digerem e eliminam os patógenos são potencialmente nocivos para os tecidos adjacentes quando a resolução do processo inflamatório não ocorre de forma adequada (Rossi et al., 2006). Dessa forma, a resolução da inflamação através da apoptose dessas células, e fagocitose das mesmas pelos macrófagos, é imprescindível para evitar a liberação de componentes intracelulares tóxicos, favorecendo, assim, a restauração da homeostase do sistema (McCracken; Allen, 2014).

A apoptose é o mecanismo pelo qual a célula promove sua autodestruição de forma programada, através de processos intracelulares como a ativação de enzimas que degradam seu DNA e as proteínas citoplasmáticas (Kumar et al., 2005). A sobrevivência e apoptose de neutrófilos são altamente influenciadas pelo meio inflamatório. A presença de estímulos pró-apoptóticos, mediadores inflamatórios e condições ambientais influenciam na sobrevivência dos neutrófilos. A apoptose destes é controlada por uma complexa via de sinalização (Rossi et al., 2006; Kobayashi; DeLeo, 2009).

As caspases, conjunto de proteases intracelulares responsáveis pela indução e execução da apoptose são ativadas por vias sinalizadoras que levam a uma série de alterações morfológicas e bioquímicas nas células, como condensação da cromatina, ruptura do núcleo, contração do citoplasma, alterações na simetria sem perda da integridade da membrana plasmática, fragmentação de célula em corpos menores (corpos apoptóticos), bem como a clivagem do material genético e despolarização mitocondrial (Vermees, 2000; Kobayashi; DeLeo, 2009; Wang, 2014). A membrana das células apoptóticas sofre modificações, de modo a facilitar o processo de fagocitose por macrófagos, porém permanece intacta, e por isso não promove a ativação do processo inflamatório e eventual dano tecidual, como no caso da necrose (Kumar et al., 2005; Wang, 2014).

A ativação das caspases pode ocorrer por vias distintas. Na via intrínseca ou apoptose espontânea, via na qual neutrófilos senis sofrem apoptose, ocorre a permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP) mediada por dois membros das proteínas pró-apoptóticas da família de Bcl-2, Bax e Bak, que são inseridos na membrana mitocondrial

externa formando poros e alterando o potencial de membrana, o que libera citocromo C e outros fatores pró-apoptóticos para o citosol. O citocromo C liberado, junto com o fator ativador de protease de apoptose (APAF), forma o apoptossomo que recruta e ativa caspase-9 e, conseqüentemente, caspase-3. Já a via extrínseca (extracelular), que é ativada pela ligação de fatores externos como o fator de necrose tumoral (TNF- α), a ligação de Fas ao seu receptor específico e TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado a TNF) aos receptores de morte presentes na membrana plasmática, formando um complexo indutor de morte associado ao receptor, recrutando e ativando caspase-8 e caspase-3. Há, também, outro tipo de morte apoptótica, a morte celular induzida por fagocitose (PICD) que é ativada pela fagocitose de partículas e microrganismos e por ERO. (Kennedy; Deleo, 2008; Nikolettópoulou et al., 2013; McCracken; Allen, 2014).

Outras circunstâncias também podem induzir a apoptose como lesões no material genético por processos radioativos ou por compostos químicos, assim como por ativação de uma resposta de estresse (Abbas et al., 2008; Luan et al., 2015).

Neutrófilos apoptóticos expõem fosfatidilserina sobre a superfície da célula, o que leva ao reconhecimento específico e remoção por macrófagos nos tecidos, ou quando na circulação, no fígado, baço e medula óssea. Sendo assim, a fosfatidilserina é muito utilizada como marcador de células apoptóticas (Kobayashi; DeLeo, 2009; McCracken; Allen, 2014). Já os receptores Fc γ RIIIb estão presentes em grande número na superfície celular de neutrófilos – 100.000 – 200.000 moléculas por célula – e sua expressão diminui com a redução de sua capacidade funcional. Dessa forma, neutrófilos apoptóticos perdem a expressão de CD16, sendo, portanto utilizado como marcador de células apoptóticas (Moulding et al., 1999). Outro grupo de receptores são as selectinas, expressos constitutivamente nos neutrófilos e responsáveis pela adesão ao endotélio vascular. A L-selectina (CD62L) participa da adesão e rolamento dos neutrófilos no início da resposta inflamatória. Porém, após a ativação celular e a exposição a estímulos inflamatórios, estes receptores são clivados, diminuindo sua expressão (Boer et al., 2010; Futosi et al., 2013).

Defeitos nos mecanismos regulatórios da apoptose podem resultar no acúmulo de células indesejáveis para o bom funcionamento do organismo, gerando inúmeras anomalias como neoplasias, doenças neuromusculares e doenças autoimunes (Delhalle, 2003; Luan et al., 2015).

Figura 1.4. Visão geral da via extrínseca e intrínseca de apoptose de neutrófilos, e apoptose induzida por fagocitose. A via extrínseca é iniciada por ligação e agregação de receptores de morte da membrana plasmática que conduzem à ativação de caspase-8 e caspase-3. A via apoptótica intrínseca é iniciada quando a abundância relativa das proteínas pró-apoptóticas, membros da família Bcl-2 (Bax e Bak) excede a dos seus homólogos anti-apoptóticos (Mcl-1 e A1), permitindo que Bax e Bak oligomerizem e formem poros na membrana mitocondrial externa. A liberação de citocromo C no citosol é um sinal essencial para a ativação de caspase-9 e ativação da caspase-3. A via dependente de fagocitose é acionada pela fagocitose de partículas, subsequente ativação da NADPH-oxidase e produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). **Fonte:** McCracken & Allen, 2014.

A morte celular programada tem um papel importante na homeostase do sistema imunológico, balanceando a taxa de divisão e morte das células imunes, já que o acúmulo de células indesejáveis pode ocasionar diversas patologias como neoplasias, doenças neuromusculares e doenças autoimunes. É, também, o principal mecanismo de controle da intensidade da resposta inflamatória, limitando sua duração e a lesão tecidual provocada pelas próprias células do sistema imunológico causadas pela permanência prolongada de neutrófilos ativados no local de inflamação (Kin, 2004; Bardoel et al., 2014).

1.8. Substâncias Fenólicas: flavonoides e derivados 3-fenilcumarínicos

1.8.1. Flavonóides e a galangina

A biodiversidade das plantas possibilita a descoberta de novos compostos químicos com grande aplicabilidade no desenvolvimento de produtos de uso biológico e

farmacêutico como os metabólitos secundários ou compostos derivados de produtos naturais (Harvey, 2008; Li; Vederas, 2009; Carter, 2011).

Os flavonóides são compostos que possuem núcleo aromático com substituintes hidroxilados e/ou derivados funcionais presentes nas sementes, caules, raízes, cascas, e/ou flores de diversas plantas medicinais, sendo, portanto, um dos maiores grupos de produtos naturais conhecidos (Heller et al., 1986; Havsteen, 2002; Rahman et al., 2006; Lojek et al., 2014). São distribuídos em diversas bebidas e alimentos como cebola, couve, brócolis, maçã, uva, nozes, vinho tinto e chá, normalmente fazendo parte da dieta humana. Este grupo de substâncias é considerado como metabólito secundário promissor já que possui várias propriedades terapêuticas como imunomodulatória, antiinflamatória, antioxidante, antialérgica, hepatoprotetora, antitrombótica, antiviral e anticarcinogênica, além de inibir diversas enzimas incluindo hidrolases, óxido redutases, DNA sintetase, RNA polimerase, fosfatases, fosfoquinases e oxigenases (Middleton, 2000; Garcia-Lafuente et al., 2009; Lojek et al., 2014; Santos et al., 2014).

Alguns flavonoides suprimem a atividade de compostos sinalizadores como NF-kB, ERK, p38, MAPK em macrófagos e diminuem a produção de interleucinas, modulando a produção de citocinas pró-inflamatórias e algumas funções como a produção de ERO, a degranulação e a apoptose (Cho et al., 2003; Moreira et al., 2007; Ramos, 2007; Kim et al., 2013).

Os flavonóides possuem diversas subclasses que são encontradas na dieta como os flavonóis, flavonas, antocianinas, flavononas e isoflavonas (Crozier et al., 2009; Lojek et al., 2014;). A galangina é um flavonol encontrado na própolis, no mel e na *Alpinia officinarum* (família do gengibre) (Huh et al., 2013; Santos et al., 2014). A galangina possui diversas atividades biológicas como, por exemplo, antiinflamatória, antiviral, antimicrobiana, vasorrelaxante, antioxidante e anticâncer (Kim et al., 2013).

Figura 1.4: Estruturas químicas dos flavonóides e da galangina.

Santos e colaboradores (2014) avaliaram o efeito antioxidante da galangina no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos de indivíduos saudáveis e de pacientes com Artrite Reumatóide. Eles mostraram que a galangina inibe a produção de espécies reativas de oxigênio de ambas as células e esse efeito é desencadeado pela capacidade “scavenger” que a galangina exerce sobre o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso ($HOCl$), como também pela inibição da enzima mieloperoxidase.

1.8.2. Derivados 3-fenilcumarínicos: 6,7-diidroxi-3[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina (C13)

Os derivados 3-fenilcumarínicos, conhecidos também por aril-3-cumarinas ou 3-arilcumarinas, possuem o núcleo básico das cumarinas, porém, são classificados como uma subclasse de isoflavonóides (Zuanazzi; Montanha, 2004).

Esses compostos possuem diversas atividades biológicas como antioxidante (Roussakiet al., 2010), inibindo o metabolismo oxidativo de neutrófilos (Kabeya et al., 2007), antidepressiva (Sashidhara et al., 2011), anticoagulante (Tunali et al., 2011), antiagregante plaquetária (Tawata et al., 1990), antibacteriana (Nkengfack et al., 2000) e também como inibidora de algumas enzimas como a monoamina oxidase b (Matos et al., 2011) e a lipoxigenase (Roussaki et al., 2010).

Figura 1.5: Estruturas químicas dos derivados 3-fenilcumarínicos e da C13, respectivamente.

Andrade e colaboradores (2013) avaliaram o efeito antioxidante de uma série de derivados 3-fenilcumarínicos no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados com Imunocomplexos. Dentre o conjunto de substâncias, o derivado 3-fenilcumarínico 6,7-diidroxi-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina, denominado de C13, foi o mais efetivo em inibir a quimioluminescência. Essa substância possui duas características que estão relacionadas com o efeito antioxidante que exerce: um grupo substituinte orto-diidroxi no

esqueleto cumarínico e um grupo metilenodioxila no anel fenílico, tornando-a uma molécula eficiente na atividade scavenger de ácido hipocloroso (HOCl). Além disso, eles mostraram que a C13 possui atividade inibitória sobre a enzima Mieloperoxidase.

De modo geral, os relatos na literatura sobre as atividades biológicas da galangina e da C13 são escassos e relativamente recentes, o que reforça a necessidade de estudos adicionais para ampliar o conhecimento sobre os efeitos biológicos desta classe de substâncias, bem como para o entendimento dos seus possíveis mecanismos de ação, tendo em vista uma possível aplicação terapêutica.

2. Objetivos

Mediante a literatura apresentada e a linha de pesquisa do laboratório, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito modulatório do flavonoide galangina e do derivado 3-cumarínico 6, 7-diidroxi - 3 - (3', 4' - metilenodioxifenil) – cumarina (C13) na apoptose de neutrófilos humanos mantidos em cultura, com a finalidade de aplicar estas substâncias em modelo animal de doenças autoimunes que envolvem deposição de imunocomplexos.

Estratégias experimentais para atingir o objetivo:

- 1) Padronização das condições experimentais de cultura de neutrófilos humanos e avaliação a viabilidade dos mesmos, por meio:
 - a. da determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase;
 - b. da análise da viabilidade celular pelo ensaio de exclusão ao corante azul de Tripan;
 - c. da avaliação do metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados via receptores Fc γ , utilizando IC formados de OVA e IgG anti-OVA e também estímulo solúvel (PMA);
 - d. da avaliação da apoptose e necrose por citometria de fluxo, utilizando anexina V e iodeto de propídio como marcadores;
- 2) Avaliar o efeito do flavonoide galangina e do derivado 3-fenilcumarínico 6, 7-diidroxi - 3 - (3', 4' - metilenodioxifenil) - cumarina na produção de espécies reativas de oxigênio e na viabilidade celular de neutrófilos humanos mantidos em cultura, por meio:
 - a. da determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase;
 - b. da análise da viabilidade celular pelo ensaio de exclusão ao corante azul de Tripan;
 - c. da avaliação do metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados via receptores Fc γ , utilizando IC formados de OVA e IgG anti-OVA e também estímulo solúvel (PMA);
 - d. da avaliação da apoptose e necrose por citometria de fluxo, utilizando anexina V e iodeto de propídio como marcadores;
 - e. da expressão de receptores Fc γ IIIB (CD16) e CD62L;

- f. da análise da alteração do conteúdo de DNA (Hipodiploidia), por citometria de fluxo, utilizando iodeto de propídio como marcador.

3. Casuística e Métodos

3.1 Principais reagentes e soluções

- * Ácido fenilacético (Aldrich);
- * DMSO (Dimetilsulfóxido) – Merck;
- * Líquido de Turk (violeta de ginsiana 1% em solução de ácido acético 1%);
- * Luminol (5-amino-2,3-diidro-1,4-ftalazinodiona) - Sigma ChemicalCo., St. Louis, MO;
- * Salicilaldeído (Aldrich)
- * Solução de Alséver (tampão citrato com azida sódica pH 6,1);
- * Solução de gelatina (*Difco*) 2,5% em NaCl 0,15 mol/L;
- * Solução Salina Balanceada de Hank's pH 7,2 (PAUL, 1970);
- * RPMI 1640 (Aldrich);
- * Solução de NH₄Cl 0,83% pH 7,2;
- * Solução fisiológica (NaCl 0,15 mol/L);

3.2 Principais equipamentos utilizados

- * Centrífuga Refrigerada Eppendorf modelo 5810R;
- * Espectrofotômetro Hitachi – modelo U-2910;
- * Freezer -70°C - Forma Scientific;
- * Luminômetro de placa modelo LB 960 Centro, Berthold Technologies, BadWildbad, Alemanha;
- * Microscópio Óptico Olympus BX51;
- * Citômetro de Fluxo FACSCanto – Becton Dickinson, CA, EUA);
- * Leitor de microplacas de 96 poços (EIA Multi-well Reader II, Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, Estados Unidos da América);
- * Espectrofotômetro (VarianCary 50 Bio UV/VisibleSpectrophotometer, Sparta, Austrália);
- * Câmara de CO₂ (Forma Series II WaterJacket) ThermoScientific

3.3. Substâncias avaliadas:

O derivado 3-fenilcumarínico (Figura 3.1) foi sintetizado pelo laboratório de Química Farmacêutica da FCFRP-USP. Esse processo foi realizado através da reação de Perkin-Ogliadoro, onde derivados do ácido fenilacético (Aldrich) reagem com derivados do salicilaldeído (Aldrich), ambos apropriadamente substituídos, em meio contendo anidrido acético e acetato de potássio (Marchi et al., 2004; Kabeya et al., 2007; Matos et al., 2011). O derivado 3-fenilcumarínico foi purificado por recristalização, avaliado quanto à pureza por cromatografia em camada delgada e caracterizado pela determinação do ponto de fusão. O

composto mostrou um grau de pureza adequado (97-99%) para ser utilizado nos ensaios subsequentes. A estrutura química foi elucidada por meio de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono, bem como por espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *electrospray*. A galangina (Sigma) foi adquirida comercialmente (Figura 3.1).

Figura 3.1. Estruturas químicas das substâncias a serem avaliadas.

3.4. Preparação de imunoglobulinas de classe G (IgG):

3.4.1. Obtenção do soro imune rico em IgG anti-OVA

Para a obtenção dos anticorpos foram utilizadas coelhas da espécie Nova Zelândia, jovens e de aproximadamente 3 kg, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os procedimentos experimentais realizados nesses animais seguiram os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (protocolo de pesquisa nº 05.1.1050.53.9, anexo A).

As coelhas foram imunizadas com solução de antígeno (albumina de ovo de galinha – OVA, Sigma, St. Louis, Estados Unidos da América) preparada a 5 mg/mL em NaCl a 0,15 mol/L, e emulsionada em adjuvante completo de Freud (1:2). A emulsão foi administrada por via subcutânea no dorso do animal, sendo que cada animal recebeu quatro injeções de 0,5 mL, totalizando 10 mg de OVA por animal. Após 30 dias, os mesmos foram anestesiados com xilazina (5 mg/kg) e ketamina (35 mg/kg) para colheita do sangue por punção cardíaca, e imediatamente após o término do procedimento, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂.

O sangue ficou em repouso por 1 hora em temperatura ambiente (25°C) para retração e desprendimento do coágulo. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado (755g, 15 minutos, 4°C). O soro obtido foi mantido em banho-maria (30

minutos, 56°C), para inativação dos componentes do sistema complemento e, logo após, armazenado em freezer a -20°C.

3.4.2. Purificação do soro imune rico em IgG anti-OVA

A purificação das imunoglobulinas foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Fahey et al. (1964), modificada por Lucisano e Mantovani (1984). As proteínas globulinas do soro foram precipitadas pela adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturado, em quantidade suficiente para atingir 40% de saturação. A mistura ficou em repouso por 24 horas a 4°C e depois foi centrifugada (1800g, 15 minutos, 25°C). O precipitado foi lavado com solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 40% (m/v), centrifugado novamente (1800g, 15 minutos, 25°C), dissolvido em PBS pH 7,4 e dialisado contra solução tampão fosfato (0,02 mol/L; pH 7,4) a 4°C por 24 h.

Após essa etapa, empregou-se a técnica de cromatografia de troca iônica para purificar a IgG contida na amostra dialisada. Para isso, foi utilizada a resina dietilaminoetil (DEAE)-celulose como fase estacionária e solução tampão fosfato (0,02 mol/L; pH 7,4) como fase móvel. O efluente da coluna foi recolhido e as proteínas foram detectadas por meio da leitura da absorvância em 280 nm, em espectrofotômetro (modelo U2910, Hitachi Instruments, Tóquio, Japão). Quando o pico I, que contém a IgG total, foi eluído, adicionou-se solução tampão fosfato (0,02 mol/L; pH 7,4) suplementada com 1 mol/L de NaCl para eluir as demais proteínas presentes na amostra. As frações correspondentes ao primeiro grupo de proteínas eluídas foram reunidas e concentradas por filtração em membrana de celulose com limite de exclusão de 100 kDa. Por fim, as amostras foram fracionadas em tubos tipo *eppendorf* e armazenadas a -20°C até o uso.

3.4.3. Caracterização da preparação de IgG total rica em IgG anti-OVA

Para analisar se a preparação de IgG estava pura, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS) (Laemmli, 1970). Para isso, um gel de empilhamento a 4% e um gel de corrida a 10%, preparados em tampão Tris-HCl 0,5 mol/l pH 6,8 e Tris-HCl 1,5 mol/l pH 8,8, respectivamente, foi montado no suporte de eletroforese. Além dos géis, solução de acrilamida a 30% (m/v) e o catalisador tetrametilenodiamino (TEMED) a 10% (m/v), foram utilizados.

As amostras de IgG e os padrões de proteína de alta densidade foram diluídos (na proporção 1:10 e 1:2, respectivamente), em uma mistura constituída de tampão Tris 0,06

mol/L pH 6,8, SDS 4%, glicerol 20% e azul de bromofenol. A análise eletroforética foi realizada em temperatura ambiente (25°C) sob corrente elétrica contínua de 10 mA, utilizando-se o tampão Tris-glicina pH 8,3 como fase móvel. O tempo de análise foi determinado acompanhando-se a migração do corante azul de bromofenol.

Para calcular a massa molecular das amostras de IgG, foi construída uma curva de logaritmo da massa molecular ($\log M.M.$) em função do fator de retardamento (R_F) de cada proteína do padrão de massa molecular.

3.4.4. Determinação do ponto de equivalência da reação antígeno-anticorpo

No intuito de avaliar a habilidade da IgG em reagir com o antígeno, bem como as quantidades relativas de IgG e OVA necessárias para formação de imunocomplexo, foi realizada uma imunodifusão radial dupla de acordo com o método de Ouchterlony (1958). Para isso, uma camada de Agar fundido (preparado a 1,3% em PBS pH 7,4) foi depositada sobre uma lâmina de vidro e, após solidificação, foram perfurados poços aos quais foram adicionadas amostras de OVA (1 mg/ml) e de IgG, diluídas de forma seriada. Após 48 h em temperatura ambiente (25°C), o gel foi lavado, seco em estufa a 37°C e corado com Coomassie Brilliant Blue “G”. Após lavagem com solução descolorante (metanol: ácidoacético: água 10:15: 75), foi possível analisar, de modo qualitativo, a zona de equivalência da reação antígeno-anticorpo em questão.

A análise desta lâmina mostrou a provável proporção de antígeno e anticorpo do ponto de equivalência. A partir daí, foi construída a curva de precipitação para determinação quantitativa do ponto de equivalência. Para isso, alíquotas do anticorpo foram diluídas 1:2 em PBS e a solução do antígeno (OVA, 1 mg/mL) foi diluída em PBS nas seguintes proporções: s/d, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16. Em seguida, volumes iguais de antígeno e anticorpo foram misturados, e a reação foi incubada (1 hora, 37°C) e depois mantida em refrigeração (12 horas, 4°C) para formação dos IC.

As suspensões formadas foram centrifugadas (7200g, 15 minutos, 25°C), lavadas por duas vezes e suspensas em NaCl 0,15 mol/L. Em seguida, uma alíquota da suspensão foi dissolvida em NaOH 0,1 mol/L e diluída em NaCl 0,15 mol/L, para leitura de absorvância em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 280 nm.

3.5. Sujeitos da pesquisa

3.5.1. Aspectos éticos:

Foram recrutados 20 (vinte) voluntários para a pesquisa, nas dependências da FCFRP-USP, pelos pesquisadores responsáveis. Eles eram saudáveis, com faixa etária entre 18 e 40 anos de idade, de ambos os sexos e não estavam fazendo uso de medicamentos. Os voluntários foram conscientizados sobre os objetivos do trabalho e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Como estavam de acordo com as condições descritas neste documento, foi colhido cerca de 20 mL de sangue por punção venosa na região da fossa cubital por técnico capacitado, utilizando material estéril e descartável, isto é, devidamente limpo e livre de contaminação.

A realização desse procedimento seguiu as recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEP/FCFRP nº 300, anexo B).

3.5.2. Obtenção dos neutrófilos:

Os neutrófilos foram obtidos a partir de sangue de indivíduos saudáveis, colhido através de punção venosa com sistema a vácuo em tubo com heparina como anticoagulante.

O sangue colhido foi adicionado à tubos tipo *falcon* de 15 mL contendo reagente Histopaque®-1119 e Histopaque®-1077 e centrifugado (700g, 30 minutos, 22 °C). As camadas contendo o plasma e as células mononucleares foram descartadas e a parte contendo os granulócitos foi transferida para tubos de fundo redondo, diluído em NaCl 0,15 mol/L e centrifugado (974g, 10 minutos, 22 °C).

As hemácias remanescentes foram lisadas com NH₄Cl 0,83% (pH 7,2) por 5 minutos. As células foram centrifugadas (974g, 10 minutos, 22 °C), lavadas com NaCl 0,15 mol/L, e em seguida suspensas no meio de cultura apropriado.

A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer e a viabilidade foi analisada por meio da exclusão do corante azul de Tripan. A porcentagem média de pureza obtida foi de cerca de 96% e a viabilidade, de 98% para ambos os meios de suspensão.

3.6. Padronização da cultura de neutrófilos humanos e avaliação da viabilidade celular na presença e ausência das substâncias estudadas:

3.6.1. Cultura de neutrófilos:

Os neutrófilos foram mantidos em cultura de acordo com metodologia descrita por Kirchner et al, 2012, com modificações. Para o estabelecimento das condições experimentais foram testados dois meios de cultura celular: RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, o meio mais utilizado em cultura de células; e Solução Salina Balanceada de Hank's (HBSS da sigla em inglês), suplementado com 0,1% de gelatina. A viabilidade celular, expressão de receptores de membrana e a análise de uma função celular foram avaliadas para os dois meios de cultura celular a fim de compará-los. Essas análises foram realizadas conforme metodologias descritas nos itens seguintes. Para todos os experimentos realizados a cultura foi mantida a 37°C em câmara contendo 5% de CO₂ nos períodos de tempo específicos.

3.6.2. Viabilidade celular:

3.6.2.1. Alteração de membrana por exclusão ao corante azul de tripan e determinação da atividade da lactato desidrogenase (LDH) - necrose:

O ensaio de exclusão ao corante azul de tripan baseia-se na capacidade de uma célula, com a membrana intacta, excluir esse corante (Zhivotovsky; Orrenius, 2001). Já o ensaio da LDH baseia-se no fato de que esta enzima catalisa a conversão do piruvato a lactato, promovendo a oxidação do NADH. Dessa forma, é medido o decréscimo na absorvância em 340 nm em virtude da oxidação desse composto (Simões-Ambrosio et al., 2010; Labtest Diagnostica, Lagoa Santa, MG, Brasil).

Este ensaio foi realizado conforme descrito por Lucisano-Valim et al. (2002). Os neutrófilos (1×10^6 cel/mL), purificados a partir de sangue periférico humano foram tratados ou não com o derivado 3-fenilcumarínico (C13) (1 e 20 µmol/L), galangina (1 e 20 µmol/L), Triton X-100 (0,2%; v/v) controle positivo, e o solvente (DMSO; 0,1%; v/v) controle negativo. Para o estabelecimento das condições experimentais de cultura, as células não foram incubadas com nenhuma das substâncias acima mencionadas. Nesse caso, o que variou foi o meio de cultura no qual as células foram suspensas (RPMI ou Hank's). Em todas as situações, as células foram mantidas em cultura por (0 - 24 horas) a 37°C em câmara contendo 5% de CO₂. Decorrido esses períodos, as amostras foram centrifugadas (970g, 10 minutos, 4°C).

O sedimento foi suspenso em Hank's com gelatina 0,1% ou meio contendo RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal. Uma alíquota dessa suspensão foi misturada com igual volume do corante azul de Tripán (0,1% em NaCl 0,15 mol/L). A porcentagem de células viáveis foi avaliada a partir da contagem de 200 células, em microscópio óptico (modelo BX51, Olympus, Tóquio, Japão) (Freshney, 1994).

O sobrenadante foi analisado quanto à presença da enzima lactato desidrogenase (LDH) pelo emprego do kit LDH Liquiform (Labtest Diagnostica, Lagoa Santa, MG, Brasil). Ao reagente de trabalho, que é composto de piruvato, NADH e tampão, foi adicionada uma alíquota do sobrenadante, e a absorbância foi mensurada em 340 nm durante 3 minutos a 37°C, em espectrofotômetro (modelo U2910, Hitachi Instruments, Tóquio, Japão). A atividade enzimática da LDH foi calculada conforme instruções do fabricante do kit.

3.6.2.2. Análise do índice de apoptose e necrose, utilizando anexina V e iodeto de propídio (PI) em citometria de fluxo:

Este ensaio foi realizado de acordo com as recomendações descritas pelo fabricante do Kit Trevigen R & D. A apoptose foi avaliada pelo índice de fosfatidilserina exposto na membrana externa da célula através do uso do reagente Anexina-V conjugada com alofococianina (APC). Para distinguir células apoptóticas de células necróticas foi utilizado o Iodeto de Propídio (PI), que é uma molécula que se intercala em qualquer ácido nucleico, desde que a membrana celular esteja permeável (Zhivotovsky; Orrenius, 2001).

Os neutrófilos (1×10^6 cel/ml) foram tratados ou não com o derivado 3-fenilcumarínico C13 (1 e 20 μ mol/L), galangina (1 e 20 μ mol/L) ou DMSO 0,1% (controle solvente). Para o estabelecimento das condições experimentais de cultura, as células não foram incubadas com nenhuma das substâncias mencionadas acima. Nesse caso, o que variou foi o meio de cultura no qual as células foram suspensas (RPMI ou Hank's).

As células foram mantidas em cultura por períodos diferentes (6, 12 e 18h) a 37°C em câmara contendo 5% de CO₂. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas a 200g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e as células suspensas em 100 μ l do reagente de incubação, contendo 10 μ l do tampão de ligação, 0,5 μ l de Anexina V-APC, 5 μ l de Iodeto de Propídio (PI) e 84,5 μ l de água mili-Q. Após essa etapa as amostras foram incubadas no escuro por 15 minutos, em temperatura ambiente, e em seguida foi adicionado o tampão de ligação e feita imediatamente à aquisição das amostras em

citometria de fluxo (FACSCanto - software DIVA - Becton Dickinson, CA, EUA). A análise foi realizada com base em 10.000 eventos.

3.6.2.3. Avaliação da expressão dos receptores FcγIIIb (CD16) e CD62L:

Os neutrófilos em apoptose perdem a expressão do receptor FcγIIIb na membrana celular. Sendo assim, a análise da expressão desse receptor é um indicativo do estágio de vida que essas células se encontram (Moulding et al. 1999). Já a expressão do receptor CD62L está relacionada com o grau de ativação em que os neutrófilos se encontram, ocorrendo redução na expressão à medida que a célula aumenta o seu estado de ativação (Futosi et al., 2013).

Os neutrófilos purificados (1×10^6 cel/ml), tratados ou não com o derivado 3-fenilcumarínico C13 (1 e $20 \mu\text{mol/L}$), galangina (2 e $20 \mu\text{mol/L}$), ou DMSO 0,1% (controle solvente). As células foram mantidas em cultura por diferentes períodos (0, 6, 12 e 24h) a 37°C em câmara contendo 5% de CO_2 . Após o período de incubação, foram adicionados anticorpos específicos para FcγRIIIb-FITC (BD) e CD62L-PE (BD). As amostras foram incubadas por 20 minutos a 4°C ao abrigo da luz e centrifugadas a 480g por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 500 μl de PBS gelado contendo 0,3% de Albumina Sérica Bovina (BSA), ao precipitado. As amostras foram centrifugadas (480g, 10 minutos, 4°C) e foi adicionado ao precipitado 200 μl de PBS com 2% de paraformaldeído. Após essa etapa as amostras foram armazenadas a 4°C , ao abrigo da luz, até o momento da leitura em citometria de fluxo (FACSCanto - software DIVA - Becton Dickinson, CA, EUA). A análise foi realizada com base em 10.000 eventos.

3.6.2.4 Análise da alteração do conteúdo de DNA

Sendo uma das características morfológicas de neutrófilos apoptóticos a fragmentação do DNA, fluorocromos específicos são utilizados para a avaliação quantitativa de núcleos apoptóticos. Com isso, a análise da alteração do conteúdo de DNA foi realizada conforme metodologia descrita por Nicolletti et al., 1991.

Os neutrófilos purificados (1×10^6 cel/ml), foram tratados ou não com o derivado 3-fenilcumarínico C13 (1 e $20 \mu\text{mol/L}$), galangina (1 e $20 \mu\text{mol/L}$), Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2 - 1mM - controle positivo) ou DMSO 0,1% (controle negativo). As células foram mantidas em cultura por diferentes períodos (6, 12 e 18h) a 37°C em câmara contendo 5% de CO_2 . Após o período de incubação, as células foram centrifugadas a 200g por 10

minutos a 25°C, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200 µl de tampão Citrato, conteúdo Triton 0,1% e PI 50µg/ml. Após essa etapa as amostras foram incubadas no escuro overnight a 4°C. A aquisição das amostras foi realizada em citometria de fluxo (FACSCanto - software DIVA - Becton Dickinson, CA, EUA) e a análise foi realizada com base em 10.000 eventos.

3.6.2.5. Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) por neutrófilos humanos, mantidos em cultura, estimulados com imunocomplexos e estímulo solúvel:

Este ensaio foi efetuado de acordo com Lucisano-valim et al., 2002 e Paula et al., 2009. O metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos ativados por Imunocomplexos (IC) e PMA foi avaliado através da medida da produção total de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) por quimioluminescência dependente de luminol (QLlum).

Os neutrófilos purificados (1×10^6 cel/ml) foram tratados ou não com o derivado 3-fenilcumarínico C13 (1 e 20µmol/L), galangina (1 e 20µmol/L), ou DMSO 0,1% (controle negativo). Para o estabelecimento das condições experimentais de cultura, as células não foram incubadas com nenhuma das substâncias acima mencionadas. Nesse caso, o que variou foi o meio de cultura no qual as células foram suspensas (RPMI ou Hank's).

Após os períodos de incubação (0 - 24 horas), com os respectivos tratamentos, as células foram transferidas para placa de 96 poços e foram adicionados a sonda quimioluminescente luminol (100 mmol/L) e os diferentes estímulos: IC (IgG-OVA - 60µg/mL) e PMA (10^{-7} mol/L). Imediatamente foi medida a QL durante 15 minutos a 37°C em Luminômetro de microplacas (modelo LB 960 Centro, Berthold Technologies, BadWildbad, Alemanha). A partir dos perfis cinéticos de QL foram calculados os valores de área integrada.

3.7. Análise de dados

Os dados obtidos foram processados e analisados estatisticamente através do programa GraphPadPrism 5.00. Foram utilizadas a análise de variância (ANOVA) e o método de Tukey para determinar as diferenças existentes entre os grupos experimentais, sendo estas consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4. Resultados

PARTÉ I:

*PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTURA DE
NEUTRÓFILOS HUMANOS.*

4.1. PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTURA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS

4.1.1. Avaliação da viabilidade celular, dos neutrófilos mantidos em cultura, através da análise da alteração de membrana por exclusão ao corante azul de tripan e determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH): comparação dos meios de cultura Hank's-gel e RPMI.

As células foram incubadas, (5% de CO₂, 37 °C) por 0, 6 e 24 horas, em meio contendo RPMI 1640 (RPMI) suplementado com 10% de soro bovino fetal, ou Hanks suplementado com 0,1% de gelatina (Hanks-gel), para estabelecermos as condições mais adequadas para a cultura de neutrófilos em nosso laboratório. Não houve diferença de viabilidade celular entre os meios testados, sugerindo que ambos podem ser utilizados como meios apropriados para a cultura dos neutrófilos (Tabela 1).

De acordo com a literatura, o RPMI é o meio mais utilizado para tal fim, apresentando as condições necessárias para uma boa viabilidade celular. No entanto, optou-se por utilizar o meio Hanks-gel, por manter a mesma viabilidade celular alcançada com o RPMI, mas principalmente por não interferir, de acordo com a literatura, nas mensurações subsequentes a serem realizadas nesse trabalho, isto é, ensaio de quimiluminescência dependente de luminol.

Tabela 1: Avaliação da viabilidade de neutrófilos humanos mantidos em cultura na presença dos meios Hank's ou RPMI.^(a)

Amostras ^(b)	Células Viáveis 0h (%)	Células Viáveis 6h (%)	Células Viáveis 24h (%)
Triton X-100^(b)	---	---	---
Hanks-gel	97,2 ± 2,5 ^a	97,4 ± 1,9 ^a	89,2 ± 1,0 ^b
RPMI	99,0 ± 0,1 ^a	98,8 ± 0,4 ^a	88,7 ± 1,0 ^b

(a) Resultados expressos como média ± desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. (b) Triton X-100 0,2% (controle positivo); Hanks-gelatina 0,1%; RPMI 1640 10% de soro bovino fetal. Esses dados foram determinados pelo ensaio de exclusão ao Azul de Tripan, com base na contagem de 200 células. **Análise estatística:** p<0,05; ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

A fim de confirmar os dados de viabilidade celular encontrados no experimento anterior, foi realizado o ensaio de atividade da enzima lactato desidrogenase de

neutrófilos nas mesmas condições de cultura. Como observado na figura 4.1a, nas condições testadas os dois meios não mostraram diferença quando comparados em razão do tempo. Além disso, percebeu-se um perfil semelhante de viabilidade quando comparado o mesmo meio em diferentes tempos (figura 4.1b), evidenciando que tanto o RPMI, quanto o Hanks-gel apresentam boas condições de cultura de neutrófilos por um período de até 24h, tempo máximo analisado nesse trabalho.

A)

B)

Figura 4.1. Determinação da atividade da enzima LDH de neutrófilos humanos mantidos em cultura na presença dos meios Hanks ou RPMI: Neutrófilos (1×10^6 ml) foram mantidos em cultura com Hanks, suplementado com 0,1% de gelatina ou RPMI, suplementado com 10% de soro bovino fetal, nos tempos de 0, 6 e 24 horas. **A)** Comparação da atividade da LDH nos tempos de 0, 6 e 24h. **B)** Análise comparativa do perfil de viabilidade celular em função do tempo para cada meio. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. Triton X-100 0,2% (controle positivo). **Análise estatística:** $p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

4.1.2. Análise do índice de apoptose e necrose, utilizando Anexina V e iodeto de propídio (PI) em citometria de fluxo: comparação dos meios de cultura Hank's-gel e RPMI.

De acordo com os dados anteriores, a viabilidade dos neutrófilos mantidos em cultura, não sofreu alteração quando comparados os meios RPMI e Hanks-gel. Dessa forma, a fim de confirmar os nossos dados, foi realizado esse ensaio de análise de apoptose e necrose, utilizando Anexina-V e Iodeto de Propídeo (PI), respectivamente. Conforme apresentado na figura 4.2, as porcentagens de células viáveis, apoptóticas, apoptóticas tardias e necróticas não foram significativamente alteradas, quando comparado os meios RPMI e Hanks-gel no tempo de 6 horas de cultura. Isso corrobora com os achados anteriores, confirmado que ambos os meios são capazes de manter os neutrófilos viáveis para estudos.

A)

Hanks-gel (6 horas)

RPMI (6 horas)

B)

Figura 4.2. Viabilidade de neutrófilos humanos mantidos em cultura na presença dos meios Hank's ou RPMI: Neutrófilos (1×10^6 ml) suspensos em Hanks, suplementado com 0,1% de gelatina, ou RPMI, suplementado com 10% de soro bovino fetal, foram mantidos em cultura (5% de CO_2 , 37 °C) por 6 horas e analisados em Citômetro de fluxo. **A:** Gates Representativas de citometria de fluxo com marcação para Anexina-V (eixo x) X PI (eixo y). **B:** Porcentagem de células viáveis (sem marcação), apoptóticas (marcadas para Anexina), apoptose tardia (marcadas para Anexina e PI), e necróticas (marcadas para PI). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. **Análise estatística:** $p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

4.1.3. Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) por neutrófilos humanos, mantidos em cultura, estimulados com imunocomplexos e estímulo solúvel (PMA): comparação dos meios de cultura Hank's-gel e RPMI.

De acordo com os dados de viabilidade apresentadas anteriormente, foram estabelecidas as condições de cultura de neutrófilos em nosso laboratório, sendo que ambos os meios RPMI e Hanks-gel são pertinentes para tal finalidade. Dessa forma, para

aprimorar os dados, resolveu-se analisar uma função básica dos neutrófilos, a produção das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), pelo uso da quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) em Luminômetro de placa. Vale salientar que o intuito de manter os neutrófilos em cultura foi justamente possibilitar o estudo das funções dessas células por um período maior de tempo.

Conforme apresentado na literatura, o meio RPMI interfere na mensuração da quimioluminescência dependente de luminol. Os dados obtidos nesse trabalho corroboram com a literatura científica (figura 4.3). As células mantidas em cultura com o meio RPMI apresentam menor perfil de liberação de fótons, quando estimuladas com PMA ou IC, em relação àquelas que são incubadas pelo mesmo período com Hanks suplementado com gelatina. Assim, o RPMI, apesar de ser o meio mais utilizado para cultivar os neutrófilos, não é adequado para uso quando se quer avaliar a quimioluminescência, tendo em vista que interfere na mensuração da produção de ERO pelos neutrófilos.

Figura 4.3. Quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) de neutrófilos humanos mantidos em cultura na presença dos meios Hank's ou RPMI: Neutrófilos (1×10^6 ml) mantidos em cultura, com Hank's, suplementado com 0,1% de gelatina ou RPMI, suplementado com 10% de soro bovino fetal, por 6 horas foram estimulados com PMA (10^{-7} mol/L) ou IC: IgG-OVA ($60 \mu\text{g/mL}$), medindo-se imediatamente a QL (15 min, 37°C) em Luminômetro. **A)** Perfis representativos de QLlum referente a um experimento em duplicata, registrados em contagem de fótons por minuto (c.p.m.) em função do tempo (segundos). **B)** Área integrada de QLlum de neutrófilos humanos mantidos em cultura. Em **B** os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. **Análise estatística:** $p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey. **Abreviaturas:** QLlum: quimioluminescência dependente de luminol.

Após verificar que o RPMI interfere na mensuração de ERO produzidas pelos neutrófilos, e como se pretendia avaliar essa função celular tanto nesse trabalho como em trabalhos posteriores, estabeleceu-se como meio adequado para a cultura de neutrófilos, que atende todas as condições ideais, o meio Hanks suplementado com 01% de gelatina. Vale salientar que esse meio apresenta a mesma viabilidade celular, de acordo com os dados anteriores, que a viabilidade apresentada pelo RPMI, no período de até 24 horas.

Assim sendo, analisou-se a quimioluminescência de neutrófilos humanos, mantidos em cultura com Hanks-gel, em diferentes tempos, a fim de analisar se os neutrófilos são capazes de realizar essa função quando cultivados por um período de até 24 horas. De acordo com a figura 4.4, que mostra os perfis cinéticos representativos e a Área integrada de QLlum, à medida que o tempo de cultura aumenta, a produção de ERO decresce. No entanto, no tempo de 6 horas a produção ainda é metade do tempo de 0h quando as células são estimuladas com PMA, principalmente. Além disso, no tempo de 24 horas de cultura ainda há produção de ERO, mostrando que até esse tempo os neutrófilos continuam aptos para exercer sua função de produzir ERO quando estimulados. Dessa forma, é possível analisar o efeito modulatório de compostos fenólicos no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos mantidos em cultura na presença do meio de cultura Hanks suplementado com 0,1% de gelatina.

Figura 4.4. Quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) de neutrófilos humanos mantidos em cultura e estimulados com PMA e imunocomplexos: Neutrófilos (1×10^6 ml) mantidos em cultura com Hanks-gelatina nos tempos de 0, 6 e 24 horas foram estimulados com PMA (10^{-7} mol/L) ou IC: IgG-OVA ($60 \mu\text{g/mL}$), medindo-se imediatamente a QL (15 min, 37°C) em Luminômetro. **A)** Perfis representativos de QLlum referente a um experimento em duplicata, registrados em contagem de fótons por minuto (c.p.m.) em função do tempo (segundos). **B)** Área integrada de QLlum de neutrófilos humanos mantidos em cultura. **C)** Análise comparativa dos estímulos nos respectivos tempos. Em **B** e **C** os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. **Análise estatística:** $p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey. **Abreviaturas:** QLlum: quimioluminescência dependente de luminol.

PARTÉ II:

*Avaliação do flavonoide galangina e do derivado 3-fenílcumarínico
6,7-diídroxi - 3 - (3', 4'- metílenodíoxifeníl) - cumarina (c13) na
viabilidade celular e na produção de espécies reativas de oxigênio de
neutrófilos humanos mantidos em cultura.*

4.2. AVALIAÇÃO DO FLAVONOIDE GALANGINA E DO DERIVADO 3-CUMARÍNICO 6, 7-DIIDROXI - 3 - (3', 4'- METILENODIOXIFENIL) - CUMARINA (C13) NA VIABILIDADE CELULAR E NA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS MANTIDOS EM CULTURA:

4.2.1. Avaliação da viabilidade celular, através da análise da alteração de membrana por exclusão ao corante azul de tripan e determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH):

Após estabelecer o meio Hanks suplementado com 0,1% de gelatina como adequado para a cultura de neutrófilos, realizou-se os mesmos procedimentos experimentais anteriores no intuito de avaliar a viabilidade dessas células frente à incubação com os dois compostos fenólicos bastante estudados pelo grupo de pesquisa, o 6, 7-diidroxi - 3 - (3', 4'- metilenodioxifenil) - cumarina (C13) e a galangina, na concentração de 20 μ M, sendo essa concentração estabelecida em trabalhos anteriores. Cerca de 95% das células tratadas com as amostras ou solvente (DMSO 0,1%), nos tempos de 0, 6 18 e 24 horas, respectivamente, apresentaram-se viáveis no ensaio de exclusão ao corante azul de Tripan. Dessa forma, nas condições estudadas as substâncias não interferem na viabilidade de neutrófilos humanos mantidos em cultura por um período de até 24 horas, sendo assim nessa concentração elas não possuem efeito tóxico sobre as células (Tabela 2). Esses dados confirmam experimentos da literatura científica que afirmam que esses compostos só apresentam Citotoxicidade celular em concentrações acima de 200 μ M.

Tabela 2: Avaliação do efeito citotóxico do Derivado 3-fenilcumarínico (C13) e da galangina sobre neutrófilos humanos mantidos em cultura. ^(a)

Amostras ^(b)	Células Viáveis 0h (%)	Células Viáveis 6h (%)	Células Viáveis 18h (%)	Células Viáveis 24h (%)
Triton X-100	---	---	---	---
DMSO	95,32 $\pm$ 1,64	92,8 $\pm$ 4,35	92,99 $\pm$ 2,36	90,89 $\pm$ 3,08
C13	96,08 $\pm$ 2,03	92,61 $\pm$ 4,65	91,35 $\pm$ 2,87	91,06 $\pm$ 1,55
Galangina	94,39 $\pm$ 3,69	91,13 $\pm$ 4,98	87,06 $\pm$ 2,74	86,21 $\pm$ 1,88

(a) Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. (b) Triton X-100 0,2% (controle positivo); Hanks-gelatina 0,1% (controle negativo); DMSO (controle solvente); C13 e galangina (20 μ mol/L). Esse experimento foi determinado pelo ensaio de exclusão ao Azul de Tripan, com base na contagem de 200 células. **Análise estatística:** $p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Para corroborar com os dados anteriores, foi realizado o ensaio de atividade da enzima LDH liberada de neutrófilos humanos mantidos em cultura e calculada a porcentagem de LDH liberada tendo como controle positivo a lise total da célula com o uso do Triton X-100 0,2%. Nesse ensaio, não houve diferença na atividade da LDH liberada em relação ao controle solvente (DMSO 0,1%), para as células tratadas com a C13 ou a galangina, nos tempos avaliados (figura 4.5a), mostrando que, na concentração avaliada (20 μ M), as substâncias não interferem nos processos de morte e sobrevivência das células mantidas em cultura por um período de até 24 horas de cultura. No tempo de 24 horas de cultura houve um aumento significativo na porcentagem de LDH liberada, mas esse aumento foi semelhante para todos os tratamentos (figura 4.5b), mostrando que a célula por si só está em processo de morte avançado nesse tempo de cultura de 24 horas e que os compostos fenólicos analisados não interferem nesse processo.

A)

B)

Figura 4.5. Determinação da porcentagem de liberação da enzima LDH de neutrófilos humanos mantidos em cultura na presença do derivado 3-fenilcumarínico (C13) e da galangina: Neutrófilos (1×10^6 ml) foram mantidos em cultura (5% de CO_2 , 37 °C) na presença do DMSO 0,1% (controle solvente), do derivado 3-fenilcumarínico (C13 - 20 $\mu\text{mol/L}$) e da Galangina (20 $\mu\text{mol/L}$) nos tempos de 0, 6 e 24 horas. **A)** Comparação da porcentagem de liberação da LDH nos tempos de 0, 6 e 24h para todos os tratamentos. **B)** Análise comparativa do perfil de viabilidade celular em função do tempo para cada meio. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. A porcentagem é calculada em relação ao controle positivo (100% de lise celular) onde as células foram lisadas com Triton X-100 0,2%); DMSO (controle solvente). **Análise estatística:** $p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

4.2.2. Análise do índice de apoptose e necrose, utilizando Anexina V e iodeto de propídio (PI) em citometria de fluxo:

A fim de corroborar com os dados do item anterior, foi analisado se a C13 e a galangina, nas concentrações de IC_{50} , isto é, a concentração que inibe 50% da produção

de Espécies Reativas de Oxigênio, na maior concentração testada (20 μ M), interferem no processo de apoptose ou provocam necrose de neutrófilos humanos mantidos em cultura por um período de até 18 horas. Esses experimentos foram realizados utilizando-se citometria de Fluxo, por meio do uso de Anexina-V e Iodeto de Propídeo.

De maneira geral, os resultados apresentados na figura 4.6 mostram que os neutrófilos, mantidos em cultura, sofrem alterações na viabilidade celular à medida que o tempo de cultura aumenta. Isso é esperado já que essas células possuem uma meia vida curta e não são capazes de se proliferarem. Dessa forma, comparando o tempo de cultura de 6 horas com os períodos seguintes de 12 e 18 horas, é possível observar uma perda significativa de viabilidade celular com um aumento acentuado de células em apoptose, apoptose tardia (ver DMSO - controle solvente - das figuras 4.7 e 4.8 e 4.9). Esses dados são importantes por mostrar que as condições de cultura de neutrófilos foram de fato estabelecidas. Além disso, analisando-se o tempo de 6 horas pode-se perceber que nesse período inicial de cultura celular o número de células em apoptose é muito pequeno, justificando, a necessidade de prolongar a cultura de neutrófilos por um período maior do que 6 horas para ser possível analisar o efeito de alguma substância nesse processo.

Depois de estabelecida as condições de cultura, foram analisado o efeito modulatório dos compostos fenólicos sobre a viabilidade de neutrófilos humanos. Conforme descrito nas figuras 4.6, 4.7 e 4.8, a C13 e a galangina, na maior concentração testada (20 μ M), modulam os estágios de sobrevivência dos neutrófilos, mantidos em cultura por até 18 horas, quando comparadas com o DMSO 0,1% (controle de solvente) para os tempos de 12 e 18 horas, respectivamente.

No período de cultura celular de 12 horas foi possível observar que houve uma diferença significativa no número de células em apoptose e em necrose quando as mesmas foram cultivadas com a maior concentração da Galangina (20 μ M), tendo uma redução no número de células em apoptose em relação ao controle DMSO 0,1% para esse tempo e um aumento no número de células em necrose. Com relação à C13, houve aumento no número de células em necrose quando tratadas com a maior concentração, mas não houve redução no número de células em apoptose (figura 4.8).

No tempo de 18 horas, foi visto que na maior concentração (20 μ M), o perfil de atuação dos dois compostos foi semelhante, sendo que as células cultivadas com as duas amostras apresentaram menor porcentagem de apoptose do que o controle (DMSO 0,1%) e aumentaram a porcentagem de células em necrose (figura 4.9).

Para o tempo de 6 horas não houve nenhuma diferença nos estágios de sobrevivência da célula para ambos os tratamentos (figura 4.7).

Figura 4.6. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico (C13) e da Galangina sobre a viabilidade de neutrófilos humanos mantidos em cultura: Neutrófilos (1×10^6 ml) tratados com DMSO 0,1% (controle solvente), Derivado 3-fenilcumarínico (1 e $20 \mu\text{mol/L}$) ou Galangina (2 e $20 \mu\text{mol/L}$) foram mantidos em cultura (5% de CO_2 , 37°C) por 6, 12 e 18 horas e a cada tempo específico foram analisados em Citômetro de fluxo. Porcentagem de células viáveis (sem marcação), apoptóticas (marcadas para Anexina), apoptose tardia (marcadas para Anexina e PI) e necróticas (marcadas para PI). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. **Análise estatística:** * $p < 0,05$ vs. DMSO (controle negativo) - diferença na porcentagem de células em necrose (ANOVA seguido do teste de Dunnett); ** $p < 0,05$ vs. DMSO (controle negativo) - diferença na porcentagem de células em apoptose (ANOVA seguido do teste de Dunnett). **Abreviaturas:** PI: Iodeto de Propídeo.

Figura 4.7. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico (C13) e da Galangina sobre a viabilidade de neutrófilos humanos mantidos em cultura: Neutrófilos (1×10^6 ml) tratados com DMSO 0,1% (controle solvente), Derivado 3-fenilcumarínico (1 e $20 \mu\text{mol/L}$) ou Galangina (2 e $20 \mu\text{mol/L}$) foram mantidos em cultura (5% de CO_2 , 37°C) por 6 horas e foram analisados em Citômetro de fluxo. Porcentagem de células viáveis (sem marcação), apoptóticas (marcadas para Anexina), apoptose tardia (marcadas para Anexina e PI) e necróticas (marcadas para PI). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. **Análise estatística:** * $p < 0,05$ vs. DMSO (controle negativo) - diferença na porcentagem de células em necrose (ANOVA seguido do teste de Dunnett); ** $p < 0,05$ vs. DMSO (controle negativo) - diferença na porcentagem de células em apoptose (ANOVA seguido do teste de Dunnett). **Abreviaturas:** PI: Iodeto de Propídeo.

Figura 4.8. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico (C13) e da Galangina sobre a viabilidade de neutrófilos humanos mantidos em cultura: Neutrófilos (1×10^6 ml) tratados com DMSO 0,1% (controle solvente), Derivado 3-fenilcumarínico (1 e $20 \mu\text{mol/L}$) ou Galangina (2 e $20 \mu\text{mol/L}$) foram mantidos em cultura (5% de CO_2 , 37°C) por 12h e foram analisados em Citômetro de fluxo. Porcentagem de células viáveis (sem marcação), apoptóticas (marcadas para Anexina), apoptose tardia (marcadas para Anexina e PI) e necróticas (marcadas para PI). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. **Análise estatística:** * $p < 0,05$ vs. DMSO (controle negativo) - diferença na porcentagem de células em necrose (ANOVA seguido do teste de Dunnett); ** $p < 0,05$ vs. DMSO (controle negativo) - diferença na porcentagem de células em apoptose (ANOVA seguido do teste de Dunnett). **Abreviaturas:** PI: Iodeto de Propídeo.

Figura 4.9. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico (C13) e da Galangina sobre a viabilidade de neutrófilos humanos mantidos em cultura: Neutrófilos (1×10^6 ml) tratados com DMSO 0,1% (controle solvente), Derivado 3-fenilcumarínico (1 e $20 \mu\text{mol/L}$) ou Galangina (2 e $20 \mu\text{mol/L}$) foram mantidos em cultura (5% de CO_2 , 37°C) por 18 horas e foram analisados em Citômetro de fluxo. Porcentagem de células viáveis (sem marcação), apoptóticas (marcadas para Anexina), apoptose tardia (marcadas para Anexina e PI) e necróticas (marcadas para PI). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. **Análise estatística:** * $p < 0,05$ vs. DMSO (controle negativo) - diferença na porcentagem de células em necrose (ANOVA seguido do teste de Dunnett); ** $p < 0,05$ vs. DMSO (controle negativo) - diferença na porcentagem de células em apoptose (ANOVA seguido do teste de Dunnett). **Abreviaturas: PI:** Iodeto de Propídeo.

4.2.3. Análise da alteração do conteúdo de DNA, utilizando Iodeto de Propídio (PI) em citometria de fluxo:

A fim de corroborar com os dados de apoptose do item anterior, foi analisado se a C13 e a galangina, nas concentrações de IC50, isto é, a concentração que inibe 50% da produção de Espécies Reativas de Oxigênio, em maior concentração testada (20 μ M), interferem no conteúdo de DNA, por meio da análise de células hipodiplóides. Esses experimentos foram realizados utilizando-se citometria de Fluxo, por meio do uso de Iodeto de Propídio. Para tanto, as células foram mantidas em cultura pelos períodos de 6, 12 e 18 horas e como controle positivo do experimento foi utilizado o Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) 1 Molar.

Conforme observado na figura 4.10, a porcentagem de células hipodiplóides variou de acordo com o tempo de cultura, sendo que inicialmente essa porcentagem mostrou-se baixa, corroborando com os dados de apoptose apresentados no item anterior para o tempo de 6 horas. À medida que o tempo de cultura aumentou, houve um aumento significativo na porcentagem de células hipodiplóides, sendo que esse aumento foi bem mais significativo para o controle positivo (H_2O_2), e menor para os tratamentos. Para o tempo de 12 horas de cultura não houve diferença na porcentagem de células hipodiplóides entre as amostras e o controle negativo (DMSO 0,1%). Já para o tempo de 18 horas, houve um aumento significativo no número de células hipodiplóides quando as mesmas foram incubadas com a maior concentração de galangina.

Figura 4.10. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico (C13) e da Galangina sobre a alteração do conteúdo de DNA de neutrófilos humanos mantidos em cultura: Neutrófilos (1×10^6 ml) tratados com H₂O₂ 1% (controle positivo), DMSO 0,1% (controle solvente), Derivado 3-fenilcumarínico (1 e 20 μ mol/L) ou galangina (2 e 20 μ mol/L) foram mantidos em cultura (5% de CO₂, 37 °C) por 6, 12, 18 e 24 horas e a cada tempo específico foram analisados em Citômetro de fluxo. Dados representam a porcentagem de células hipodiplóides. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. **Análise estatística:** $p < 0,05$ ANOVA seguido do teste de Tukey.

4.2.4. Análise da expressão do receptor CD62L de neutrófilos humanos mantidos em cultura, utilizando citometria de fluxo:

À medida que os neutrófilos são ativados eles deixam de expressar em suas membranas a molécula de adesão celular denominada de CD62L. Assim, foi analisada a expressão dessa molécula pelos neutrófilos mantidos em cultura pelos períodos de tempo de 0, 6 12 e 24 horas a fim de verificar se as condições de cultura celular estariam possibilitando a ativação das células. De acordo com os dados apresentados na figura 4.11, o meio de cultura e as condições de manipulação e montagem da cultura estão desprovidos de agentes físicos, químicos ou biológicos capazes de levar a ativação dos neutrófilos, pois a expressão do CD62L se manteve constante durante todos os períodos analisados, não havendo diferença entre os tempos, nem, contudo entre os tratamentos.

Figura 4.11. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico (C13) e da Galangina sobre a expressão do receptor CD62L de neutrófilos humanos mantidos em cultura: Neutrófilos (1×10^6 ml) tratados com DMSO (0,1%; solvente), Derivado 3-fenilcumarínico (1 e $20 \mu\text{mol/L}$) ou Galangina (2 e $20 \mu\text{mol/L}$) foram mantidos em cultura (5% de CO_2 , 37°C) por 0, 6, 12 e 24 horas e a cada tempo específico foram analisados em Citômetro de fluxo. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. **Análise estatística:** $p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

4.2.5. Análise da expressão do FcγRIIIb (CD16) de neutrófilos humanos mantidos em cultura, utilizando citometria de fluxo:

Os neutrófilos expressam, de forma constitutiva em sua membrana, dois receptores para a porção cristalizável das imunoglobulinas o FcγRIIa e o FcγRIIIb, sendo que a expressão desse último é particular do neutrófilo e à medida que a célula entra em apoptose, a expressão desse receptor é diminuída. Dessa forma, foi analisada a expressão do CD16 em neutrófilos humanos mantidos em cultura pelos períodos de 0, 6, 12 e 24 horas. De acordo com a figura 4.12, a expressão do CD16 decresce significativamente com o aumento no tempo de cultura dos neutrófilos, sendo que essa redução já é acentuada no tempo de 6 horas, em relação ao tempo de 0 hora e mantém-se estável nos tempos seguintes, não havendo diferença na expressão desse receptor entre os tempos subsequentes.

Figura 4.12. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico (C13) e da Galangina sobre a expressão do receptor CD16 de neutrófilos humanos mantidos em cultura: Neutrófilos (1×10^6 ml) tratados com DMSO (0,1%; solvente), Derivado 3-fenilcumarínico (1 e $20 \mu\text{mol/L}$) ou Galangina (2 e $20 \mu\text{mol/L}$) foram mantidos em cultura (5% de CO_2 , 37°C) por 0, 6, 12 e 24 horas e a cada tempo específico foram analisados em Citômetro de fluxo. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. **Análise estatística:** $p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

4.2.6. Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) por neutrófilos humanos estimulados com imunocomplexos e estímulo solúvel (PMA):

A produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) foi mensurada por meio da QLlum, nas mesmas condições de cultura dos ensaios anteriores, onde a célula foi suspensa em Hanks suplementado com 0,1% de gelatina. As células foram tratadas com a C13 (1 e $20 \mu\text{M}$) e a galangina (2 e $20 \mu\text{M}$). Com os dados de QLlum, obtidos quando os neutrófilos foram estimulados com Imunocomplexo (IC) e o PMA, foram confeccionados os perfis de QLlum os quais exibem a relação entre a quantidade de fótons emitidos por minuto (c.p.m.) e o tempo de realização do ensaio (figura 4.13). Para cada curva de QLlum foi determinado o valor de área integrada (área sob a curva) (figura 4.14).

A quantidade de QLlum produzida pelas células diminuiu com o aumento do tempo de cultura, sendo que houve uma redução de quase 50% na produção de QLlum se comparado cada tempo com o período anterior. Isso foi mais acentuado para as células estimuladas com IC. No entanto, até o período de 24 horas de cultura é possível mensurar a produção de QLlum pelos neutrófilos estimulados, tanto com um estímulo dependente

de receptor na membrana da célula como também com estímulo solúvel. Esses dados são importantes porque possibilita a avaliação de compostos fenólicos no metabolismo oxidativo de neutrófilos por um período de tempo maior do que o de costume.

A incubação das células em cultura com a C13 e a galangina possibilitou observar que ambas as substâncias mantiveram sua capacidade antioxidante ao longo do tempo de cultura. Isso mostra que as mesmas não sofreram degradação ao longo do tempo, nem, contudo sofreram modificações estruturais que comprometam a sua função antioxidante (figura 4.14).

Figura 4.13. Perfis representativos de Quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) de neutrófilos humanos, mantidos em cultura na presença do derivado 3-fenilcumarínico (C13) e da galangina, e estimulados com PMA e imunocomplexos: Neutrófilos (1×10^6 ml) mantidos em cultura (5% de CO₂, 37 °C) nos tempos de 0, 6 e 24 horas na presença do DMSO 0,1% (controle solvente), do derivado 3-fenilcumarínico (C13 – 1 e 20 μ mol/L) e da galangina (2 e 20 μ mol/L), foram estimulados com **A)** PMA (10^{-7} mol/L) e **B)** IC: IgG-OVA (60 μ g/mL), medindo-se imediatamente a QL (15 min, 37°C) em Luminômetro. Os dados são referentes a um experimento em duplicata registrado em contagem de fótons por minuto (c.p.m.) em função do tempo (segundos). **Abreviaturas:** QLlum: quimioluminescência dependente de luminol.

A)

B)

Figura 4.14. Área integrada da quimioluminescência (QLlum) de neutrófilos humanos, mantidos em cultura na presença do derivado 3-fenilcumarínico (C13) e da galangina, e estimulados com PMA e imunocomplexos: Neutrófilos (1×10^6 ml) mantidos em cultura (5% de CO_2 , 37°C) nos tempos de 0, 6 e 24 horas na presença do DMSO 0,1% (controle solvente), do derivado 3-fenilcumarínico (C13 – 1 e $20 \mu\text{mol/L}$) e da galangina (2 e $20 \mu\text{mol/L}$), foram estimulados com **A)** PMA (10^{-7}mol/L) e **B)** IC: IgG-OVA ($60 \mu\text{g/mL}$), medindo-se imediatamente a QL (15 min, 37°C) em Luminômetro. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. **Análise estatística:** ($p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey). **Abreviaturas:** **QLlum:** quimioluminescência dependente de luminol.

4.2.7. Determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) de neutrófilos humanos, mantidos em cultura, e estimulados com Imunocomplexo e estímulo solúvel (PMA):

A fim de verificar o efeito das substâncias testadas sobre a viabilidade de neutrófilos estimulados, foi realizado o experimento de determinação da atividade da enzima LDH de neutrófilos estimulados com PMA. Observou-se um aumento na atividade da LDH das células estimuladas à medida que o tempo de cultura progrediu, conforme pode ser visto na figura 4.15b independente do tratamento. Quando as células foram tratadas com a galangina, houve um aumento da atividade da LDH quando comparado ao controle solvente (DMSO) para cada tempo 6 e 24 horas, respectivamente (figura 4.15a), mostrando que o tratamento com a galangina acentua o

processo de morte desencadeado pela estimulação das células com o PMA. Já a C13 não apresentou tal efeito.

Figura 4.15. Determinação da atividade da enzima LDH de neutrófilos humanos mantidos em cultura na presença do derivado 3-fenilcumarínico (C13) e da galangina, e estimulados com PMA: Neutrófilos (1×10^6 ml) foram mantidos em cultura (5% de CO_2 , 37°C) na presença do DMSO 0,1% (controle solvente), do derivado 3-fenilcumarínico (C13 - $20 \mu\text{M}$) e da galangina ($20 \mu\text{M}$) e foram estimulados com PMA (10^{-7} mol/L) nos tempos de 0, 6 e 24 horas. **A)** Comparação da atividade da LDH nos tempos de 0, 6 e 24h para todos os tratamentos. **B)** Análise comparativa do perfil de viabilidade celular em função do tempo para cada meio. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. Triton X-100 0,2% (controle positivo); DMSO (controle solvente). **Análise estatística:** $p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Quando as células foram estimuladas com (IC: IgG-OVA) apresentaram o mesmo perfil de atividade da LDH do que quando estimuladas com o PMA. Por outro lado, não houve diferença em relação ao DMSO, para o tratamento com a galangina como pode ser visto na figura 4.16. Dessa forma, a sobrevivência das células que foram estimuladas com IC não é alterada pela galangina o que pode ser também um efeito da down regulação dos receptores para a imunoglobulina ($\text{Fc}\gamma\text{R}$) na membrana dos neutrófilos mantidos em cultura.

A)

Figura 4.16. Determinação da atividade da enzima LDH de neutrófilos humanos mantidos em cultura na presença do derivado 3-fenilcumarínico (C13) e da galangina, e estimulados com Imunocomplexo (IC): Neutrófilos (1×10^6 ml) foram mantidos em cultura (5% de CO_2 , 37°C) na presença do DMSO 0,1% (controle solvente), do derivado 3-fenilcumarínico (C13 - $20 \mu\text{M}$) e da galangina ($20 \mu\text{M}$) e foram estimulados com IC: IgG-OVA ($60 \mu\text{g/mL}$), nos tempos de 0, 6 e 24 horas. **A)** Comparação da atividade da LDH nos tempos de 0, 6 e 24h para todos os tratamentos. **B)** Análise comparativa do perfil de viabilidade celular em função do tempo para cada meio. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. Triton X-100 0,2% (controle positivo); DMSO (controle solvente). **Análise estatística:** $p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

5. Discussão

Os leucócitos polimorfonucleares (PMN) são as células mais abundantes no sangue e são recrutados rapidamente para os locais de infecção e inflamação, matando e digerindo os patógenos. Em condições normais os neutrófilos são células que possuem um tempo de vida curto na circulação, cerca de 6 a 8 horas (Cascão et al., 2010; Pruchniak et al., 2013; Wang; Arase, 2014). O papel dessas células ficou por muito tempo negligenciado, tendo em vista que essas células são ativadas facilmente e além do mais a manutenção de cultura das mesmas é dificultada pelo fato delas não se proliferarem. Nos últimos anos, com o desenvolvimento de novas técnicas e aprimoramento de condições laboratoriais, que proporcionaram a manutenção dos neutrófilos em cultura, muito conhecimento sobre os mesmos têm sido acrescentado, mostrando o potencial arcabouço de novas funções e interações que essas células podem desempenhar (Mantovani et al., 2011). Assim sendo, o estabelecimento das condições de cultura de neutrófilos humanos foi uma etapa importante para o grupo de pesquisa, pois possibilita a continuidade dos estudos para entender como essas células interagem com as demais células do sistema imunológico e o papel da mesma em diversas patologias.

De acordo com a literatura, o meio de cultura para neutrófilos humanos mais utilizado é o RPMI 1640 um meio de cultura completo, rico em carboidratos, aminoácidos, vitaminas e sais inorgânicos que possibilitam a manutenção das células em cultura por disponibilizar todos os nutrientes necessários para a sobrevivência da mesma. No entanto, muitos desses componentes possuem atividade antioxidante, neutralizando radicais livres produzidos durante a manutenção da célula em cultura.

Como uma das funções clássicas do neutrófilo é a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e a mensuração dessas espécies é objetivo de estudo de muitos grupos de pesquisa, é importante notar que o RPMI 1640 pode interferir nessa mensuração, tendo em vista que possui substâncias capazes de neutralizar essas ERO (Ginsburg et al., 1993) e sequestrar alguns metais (Chaichi et al., 2014). Dessa forma, nosso grupo de pesquisa, tem utilizado por muitos anos, a solução salina balanceada de Hank's (HBSS, da sigla em inglês), a fim de evitar tais problemas. Porém até o presente momento, nenhum estudo comparativo de viabilidade celular entre os dois meios de cultura tinha sido realizado e, sobretudo não há dados na literatura científica sobre a sobrevivência de neutrófilos mantidos em cultura com o Hank's.

Estudos comparativos entre esses dois meios foram realizados. De acordo com os resultados obtidos não houve diferença significativa de viabilidade celular para ambos os meios testados, por meio dos ensaios de exclusão ao corante Azul de Tripan e Atividade da

Enzima Lactato Desidrogenase (LDH) (ver tabela 1 e figura 4.1), como também nas porcentagens de células viáveis, apoptóticas, apoptóticas tardias e necróticas quando analisadas por meio de Anexina-V e Iodeto de Propídio (PI) por meio do uso de Citometria de Fluxo (ver figura 4.2), demonstrando que ambos os meios podem ser utilizados para cultura celular de neutrófilos. Já ao analisar a produção de ERO, os resultados mostram que o RPMI reduziu cerca de 50% a mensuração da quimioluminescência dependente de luminol, quando comparado com o Hank's. Assim sendo, o meio Hank's apresentou boa viabilidade, não interferiu nos processos de morte, nem na mensuração de ERO, sendo, portanto, o meio escolhido para ser utilizado nos demais experimentos. Além disso, as condições de cultura estavam livres de agentes físicos, químicos ou biológicos capazes de induzir a ativação celular, tendo em vista que na análise da expressão de receptores CD62L (ver figura 4.11) observou-se que, durante todo o período avaliado, não houve alteração na sua expressão. Este resultado demonstra que não houve ativação celular, já que após sua ativação estes receptores são clivados, diminuindo sua expressão (Boer et al. 2010; Futosi et al., 2013).

Com o meio de cultura estabelecido, analisamos a produção de ERO de neutrófilos mantidos em cultura com Hank's no período de até 24 horas. Com isso, foi possível observar que há uma diminuição na QLum tanto para células estimuladas com PMA quanto com IC (figura 4.14), mas mesmo reduzindo a produção de ERO, ainda é possível continuar analisando a mensuração das mesmas, nas condições e no tempo máximo de cultura analisado. Foi possível observar ainda que houve uma maior redução do metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados com IC a partir do tempo de 6 horas. Para as células estimuladas com PMA essa redução foi mais branda. Isso pode ser decorrente do fato de que os IC necessitam de receptores na membrana dos neutrófilos para poder ativá-los, enquanto que o PMA é um estímulo solúvel. Pode-se fazer essa inferência pela análise da expressão dos receptores FcγRIIIb (CD16) (ver figura 12) que mostrou uma diminuição significativa no número de receptores a partir de 6 horas de cultura.

Desde a década de 1990, o nosso grupo de pesquisa vem investigando o efeito antioxidante de extratos e compostos puros, de origem vegetal ou sintética, como flavonóides e cumarinas, no metabolismo oxidativo de neutrófilos, visando à descoberta de novas substâncias com capacidade antioxidante e o entendimento dos seus mecanismos de ação e a análise da relação estrutura-atividade. De modo geral, tem sido observado que essas substâncias são capazes de modular o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos e de coelhos estimulados por receptores Fcγ ou por Fcγ+CR em conjunto (Lucisano-Valim et al., 2002; Kanashiro et al., 2004; Simões et al., 2004; Kanashiro et al., 2006; Kabeya et al., 2007;

Moreira et al., 2007; Kabeya et al., 2008; Paula et al., 2009; Figueiredo 2010; Simões-Ambrosio et al., 2010; Andrade et al., 2013, Santos et al., 2014). A partir dos resultados obtidos, foi possível selecionar algumas substâncias, consideradas promissoras como moduladores do metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados. Em paralelo, investigamos alterações bioquímicas e funcionais de neutrófilos de pacientes com doenças auto-imunes (Marzocchi-Machado et al, 2002 e 2005; Russo–Carbolante et al, 2005; Paoliello-Paschoalato et al, 2014), visando a seleção de novos alvos terapêuticos para um tratamento mais adequado dessas patologias, incluindo a artrite reumatóide.

Atingido o objetivo inicial do nosso trabalho de pesquisa, isto é, a padronização das condições experimentais para a manutenção da cultura de neutrófilos por nosso grupo de pesquisa, analisou-se o efeito de dois compostos fenólicos, [Derivado 3-fenilcumarínico (C13) e Galangina], na modulação da viabilidade de neutrófilos humanos mantidos em cultura. Conforme mencionado no parágrafo anterior, essas duas substâncias foram amplamente estudadas em nosso grupo de pesquisa, sendo descritos efeitos antiinflamatório e antioxidantes importantes das mesmas sobre os neutrófilos (Andrade et al., 2013; Santos et al., 2014).

Analisando o índice de apoptose e necrose de neutrófilos mantidos em cultura foi possível observar que no tempo de 6 horas, todas as amostras avaliadas apresentaram uma viabilidade de cerca de 95%. A partir do tempo de 12 horas as células mantidas em cultura com a C13 e a galangina, na maior concentração empregada (20 μ M), apresentaram uma porcentagem maior de células necróticas em relação às células tratadas somente com o DMSO 0,1% (controle solvente) (ver figuras 4.7, 4.8 e 4.9) e no caso da galangina, apresentou uma porcentagem de células em apoptose menor, quando comparadas às células cultivadas somente com o DMSO. O mesmo fato é observado no tempo de 18 horas com ambas as substâncias, na maior concentração analisada. Para as concentrações das substâncias no valor do IC₅₀, o estágio de vida das células se mostrou semelhante ao controle (DMSO 0,1%). O comportamento semelhante das duas substâncias, na maior concentração (20 μ M), provavelmente ocorreu em decorrência da alta concentração utilizada, uma vez que essa concentração é capaz de inibir praticamente 100% da produção de QLlum. Assim a ausência total de ERO, provocada pelo excesso de antioxidante, poderia estar favorecendo uma modulação no estágio de sobrevivência celular, alterando de uma condição que promove a apoptose espontânea para a uma condição que favorece a necrose. Essa ideia é confirmada por estudos que mostram que em neutrófilos senis, há um aumento na produção de ERO, de forma constitutiva, que induz a liberação de catepsina D dos grânulos azurófilos, ativando a

caspase-8, ou à diminuição da produção de glutatona, que atua como inibidor de caspase-8 e caspase-3, resultando no aumento da atividade da caspase e ativação da apoptose espontânea (Geering; Simon, 2011).

Dentre as alterações morfológicas sofridas por neutrófilos em apoptose há a clivagem do material genético. As caspases ativam DNases que clivam o DNA em pequenos fragmentos (Hipodiploidia), tornando possível a marcação desses fragmentos com fluorocromos e sua quantificação por citometria de fluxo (Riccardi; Nicoletti, 2006). Nesse contexto, nossos resultados mostraram que com o aumento do tempo de cultura dos neutrófilos há um aumento na porcentagem de hipodiploidia, para as células tratadas ou não com as substâncias avaliadas, condizendo com o processo de envelhecimento natural da célula (ver figura 4.10). Estes resultados confirmam os obtidos na avaliação da apoptose. No entanto, quando as células foram incubadas com a galangina (20 μ M) por 18 horas, houve um aumento significativo de células hipodiplóides. Esse dado parece incoerente com os dados de apoptose, mas isso pode ser ocasionado pelo fato de que a metodologia utilizada para avaliar a hipodiploidia, não diferencia células em apoptose e apoptose tardia.

Conforme mencionado anteriormente, é possível mensurar, por meio de QLLum, a produção de ERO de neutrófilos mantidos em cultura por até 24 horas, sem comprometer a qualidade das análises e mantendo uma faixa de leitura que possibilita a avaliação de compostos antioxidantes nesse processo. Assim, analisou-se nesse trabalho o efeito modulatório de dois compostos fenólicos [Derivado 3-fenilcumarínico (C13) e Galangina], no metabolismo oxidativo de neutrófilos mantidos em cultura e estimulados com IC e PMA. Essas substâncias foram descritas pelo nosso grupo de pesquisa como potentes moduladores do metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos, apresentando um valor de IC₅₀ de aproximadamente 1 e 2 μ M, respectivamente (Kabeya et al., 2007; Andrade et al., 2013; Santos et al., 2014).

As substâncias apresentaram perfis semelhantes de modulação da produção das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), inibindo a QLLum pelo período de até 24 horas de cultura (ver figura 14). Isso mostra que as mesmas não sofreram modificações estruturais, nem tampouco, foram degradadas ao longo do tempo de cultura. A inibição da quimioluminescência de neutrófilos estimulados pode ser mediada pela morte celular, sequestro das ERO e inibição de enzimas envolvidas na produção das ERO (Van Dyke et al., 1986).

A C13 e a galangina apresentam pouca ação inibitória sobre a atividade da NADPH oxidase, não inibindo significativamente a produção de ânion superóxido (O_2^-). No entanto,

O_2^- produzido é dismutado a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que serve de substrato para a enzima mieloperoxidase (MPO). A MPO, por sua vez, produz o ácido hipocloroso (HOCl). As duas substâncias são excelentes sequestradores do H_2O_2 e HOCl. Além disso, estas substâncias inibem a enzima MPO, diminuindo a produção de HOCl. Portanto, o efeito inibitório do metabolismo oxidativo dos neutrófilos mantidos em cultura é decorrente da somatória da atividade “scavenger” do H_2O_2 e do HOCl e da inibição da atividade da enzima MPO e não em virtude da morte celular (Andrade et al, 2013; Santos et al, 2014). Esse fato também pode ser evidenciado pelos ensaios de Citotoxicidade de neutrófilos mantidos em cultura com a C13 e galangina, estimulados ou não com PMA ou IC, mostrando que a atividade inibitória do metabolismo oxidativo não está relacionada com a toxicidade das substâncias ou com os estímulos utilizados, visto que não houve alteração significativa na viabilidade das mesmas, tanto para o ensaio de exclusão ao corante azul de tripan quanto para a atividade da enzima LDH, ocorrendo o processo de morte natural da célula (ver tabela 2 e figura 4.5).

Os resultados desse trabalho mostraram que é possível a manutenção de neutrófilos em cultura, utilizando solução balanceada de Hank's, por um período de até 24 horas (tempo máximo de análise), pois de acordo com as análises da viabilidade celular, esse meio apresentou condições de sobrevivência celular semelhante ao RPMI. Durante esse período foi possível avaliar o efeito de dois compostos antioxidantes (C13 e galangina) sobre o metabolismo oxidativo dessas células, pois as mesmas mantiveram a sua capacidade de produzir ERO, quando estimuladas tanto com PMA quanto com IC, numa faixa que foi possível avaliar a produção e o efeito inibitório desses compostos. A C13 e a Galangina inibiram o metabolismo oxidativo dos neutrófilos e esse efeito foi mantido durante todo o período de cultura analisado. Além disso, as condições de padronização da cultura de neutrófilos possibilitaram a avaliação dessas mesmas substâncias sobre a modulação da viabilidade celular. As mesmas não alteraram a porcentagem de células viáveis, mas de certa forma modularam os estágios de sobrevivência dos neutrófilos, pois na maior concentração analisada reduziram a porcentagem de células em apoptose e aumentaram o número de células em necrose.

6. Conclusão

Os resultados desse trabalho mostram que em relação à cultura de neutrófilos é possível mantê-los utilizando solução balanceada de Hank's, viáveis por até 24 horas, de acordo com as análises de viabilidade celular realizada por meio da Exclusão ao Corante Azul de Tripan; Atividade da Enzima Lactato Desidrogenase (LDH) liberada de neutrófilos; e Apoptose e Necrose, utilizando Anexina-V e Iodeto de Propídeo. Estes dados foram semelhantes aos encontrados quando se utilizou RPMI 1640 como meio. Além disso, as condições de cultura com o Hank's estão livres de agentes químicos, físicos ou biológicos que possam ativar as células, pois a expressão da molécula CD62L, um marcador de ativação celular, se manteve estável durante todo o período de cultura avaliado.

O meio Hank's, diferentemente do meio RPMI 1640, não interfere na mensuração das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), já que o mesmo não possui componentes antioxidantes em sua composição. Dessa forma, a produção de quimioluminescência dependente de luminol (QLlum), quando as células são estimuladas com Imunocomplexo (IC) e PMA, pode ser mensurada durante todo o período de cultura celular avaliado. Nestas condições, as células mantiveram a sua capacidade de produzir ERO numa faixa que foi possível avaliar a produção e além do mais avaliar o efeito inibitório de substâncias antioxidantes nesse processo.

Neste trabalho, o efeito de dois compostos antioxidantes [O Derivado 3-fenilcumarínico (C13) e a galangina] foi avaliado sobre o metabolismo oxidativo dessas células. A C13 e a Galangina inibiram o metabolismo oxidativo dos neutrófilos e esse efeito foi mantido durante todo o período de cultura analisado (24 horas). Isso mostra que as substâncias não foram degradadas e não sofreram nenhuma modificação estrutural que favorecesse a perda da função antioxidante.

As condições de padronização da cultura de neutrófilos com Hank's possibilitou ainda a avaliação dessas mesmas substâncias sobre a modulação da viabilidade celular. Elas não alteraram a porcentagem de células viáveis, que ficou entorno de 80%, mas de certa forma modularam os estágios de sobrevivência dos neutrófilos, pois na maior concentração analisada (20 μ M) reduziram a porcentagem de células em apoptose e aumentaram o número de células em necrose, principalmente no tempo de 18 horas de cultura.

Em suma, o conjunto de dados obtidos nesta investigação mostra que o Hank's pode ser utilizado, como meio, para manter neutrófilos em cultura por até 24 horas e que nessas condições é possível avaliar o efeito de compostos antioxidantes no metabolismo oxidativo dessas células, como também avaliar se essas substâncias modulam a viabilidade celular.

Referências

Abbas, A. K.; Lichtman, A. H. *Imunologia Celular e Molecular*. 6ed, Rio de Janeiro: Elsevier editora, 2008.

Andersson, A. K.; LI, C.; Arennan, F. M. Recent developments in the immunobiology of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2008.

Andrade, M. F.; Kabeya, L. M.; Azzolini, A. E. C. S.; Santos, E. O. L.; Figueiredo-Rinhel, A. S. G.; Paris, M. R. P.; Emery, F. S.; Pupo, M. T.; Lucisano-Valim, Y. M. 3-Phenylcoumarin derivatives selectively modulate different steps of reactive oxygen species production by immune complex-stimulated human neutrophils. *International Immunopharmacology*. 2013; 15(2):387-94.

Astill, C.; Birch, M. R.; Dacombe, C.; Humphrey, P. G.; Martin, P. T. Factor affecting the caffeine and polyphenol content of black and green tea infusions. *J. Agric. Food Chem. Washington*. 2001;49:5340-5347.

Bainton, D. F. Distinct granule populations in human neutrophils and lysosomal organelles identified by immuno-electron microscopy. *Journal of Immunological Methods*. 1999; 232:153-168.

Bardoel, B. W.; Kenny, E. F.; Sollberger, G.; Zychlinsky, A. The Balancing Act of Neutrophils. *Cell Host & Microbe*. 2014; 15(5):526-36.

Barrington, R.; Williamson, G.; Bennett, R. N.; Barry, D. D.; Brodbelt, J. S.; Kroon, P. A. Absorption, conjugation and efflux of the flavonoids, kaempferol and galangin, using the intestinal CaCo-2/Tc7 cell model. *Journal of functional foods*. 2009; 1:74-87.

Boer, K.; Vogelsang, H.; Deufel, T.; Pfister, W.; Kiehntopf, M. CD62L on neutrophil granulocytes, a useful, complementary marker for the prediction of ventriculitis in blood-containing CSF. *Clin Biochem*. 2010;43(16-17):1351-5.

Borregaard, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity*. 2010; 33(5):657-670.

Carter, G. T. Natural products and Pharma 2011: Strategic changes spur new opportunities. *Natural Products Reports*. 2011; 28:1783-1789.

Cascão, R.; Rosário, H. S.; Souto-Carneiro, M. M.; Fonseca, J. E. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmunity Reviews*. 2010; 9(8):531-5.

Chaichi, M. J.; Ehsani, M.; Khajvand, T.; Golchoubian, H.; Rezaee, E. Determination of cysteine and glutathione based on the inhibition of the dinuclear Cu(II)-catalyzed luminol-H₂O₂ chemiluminescence reaction. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2014; 122:405–410.

Cho, S. Y.; Park S. J.; Kwon, M. J.; Jeong, T. S.; Bok, S. H.; Choi, W. Y.; Jeong, W. I.; Ryu, S. Y.; Do, S. H.; Lee, C. S.; Song, J. C.; Jeong, K. S. Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF-κB pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. *Molecular and Cellular Biochemistry*, The Hague. 2003; 243:153-160.

Cicchetti, G.; Allen, P.G.; Glogauer, M. Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly. *Crit Ver Oral Biol Méd*. 2002; 13:220.

Clark, A. J.; Petty, H. R. A cell permeant peptide containing the cytoplasmic tail sequence of Fc receptor type IIA reduces calcium signaling and phagolysosome formation in neutrophils. *Cellular Immunology*. 2010; 261(2):153-158.

Costa, C.; Germena, G.; Hirsch, E. Dissection of the interplay between class I PI3Ks and Rac signaling in phagocytic functions. *The Scientific World Journal*. 2010; 10:1826–1839.

Crozier, A.; Jaganath, I. B.; Clifford, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep*. 2009; 26:1001-1043.

Delhalle, S.; Duvoix, A.; Schnekenburger, M.; Morceau, F.; Dicato, M.; Diederich, M. An introduction to the molecular mechanisms of apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 1-8.

Deree, J.; Rohan, M. D; Lall, M. D; Melbostad, H. B. S; Michael Grant, B. S, Hoyt, D. M. D; Coimbra, R, M. D. Neutrophil Degranulation and the Effects of Phosphodiesterase Inhibition. *Journal of Surgical Research*. 2006; 133:22–28.

Elghetany, M. T. Surface Antigen Changes during Normal Neutrophilic Development: A Critical Review Blood Cells, Molecules, and Diseases. 2002; 28(2): 260–274.

Fahey, J. L.; Wunderlich, J.; Mishell, R. The immunoglobulins of mice. I - Four major classes of immunoglobulins: 7S2, ES1, 1A, 2A and 18S1M - globulins. *Journal of Experimental Medicine*. 1964; 120:223.

Fialkow, L; Wang, Y; Downey, G. P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radical Biology & Medicine*. 2007; 42:153–164.

Figueiredo, A. S. G. Efeito da sazonalidade no perfil químico e na atividade antioxidante de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) e ação modulatória desta planta sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2010.

Flannagan RS, Jaumouille V, Grinstein S. The Cell Biology of Phagocytosis. In: Abbas AK, Galli SJ, Howley PM, editors. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, Vol 7. *Annual Review of Pathology-Mechanisms of Disease*. 7. Palo Alto: Annual Reviews; 2012. p. 61-98.

Forte, W. C. N; Almeida, R. M. Bizuti, G. S. C; Forte, D. N; Bruno, S; Filho, F. S. R; Lima, C. A. C. Fagocitose por neutrófilos no lúpus eritematoso sistêmico. *Assoc Med Bras*. 2003; 49(1): 35-9.

Freshney, R. I. Measurement of viability and cytotoxicity. In: *Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Techniques*. 3 ed. New York: John Wiley e Sons, cap. 19. 1994; 287-307.

Futosi, K.; Fodor, S.; Mócsai, A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol*. 2013; 17(3):638-50.

Galley, H. F.; El Sakka, N. E.; Webster, N. R.; Lowes, D. A.; Cuthbertson, B. H. Activated protein C inhibits chemotaxis and interleukin-6 by human neutrophil without affecting other neutrophils functions. *British Journal of Anaesthesia*. 2008; 100(6):815–19.

Garcya-Lafuente, A.; Guillaumon, E.; Villares, A.; Rostagno, M. A.; Martynez, J.A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm. Res. Basel*. 2009; 58:537-552.

Geering, B.; Simon, H-U. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death and Differentiation*. 2011; 18:1457–1469.

Ginsburg, I.; Misgav, R.; Gibbs, D. F.; Varani, J.; Kohen, R. Chemiluminescence in Activated Human Neutrophils: Role of Buffers and Scavengers. *Inflammation*. 1993; 17(3):227-43.

Gungor, N; Pennings, J. L. A.; Knaapen, A. M; Chiu, R. K; Peluso, M; Godschalk, R. W. L; Schooten, F. J. V. Transcriptional profiling of the acute pulmonary inflammatory response induced by LPS: role of neutrophils. *Respir Res*. 2010; 11(1): 24.

Hajishengallis, G.; Chavakis, T.; Hajishengallis, E.; Lambris, J. D. Neutrophil homeostasis and inflammation: novel paradigms from studying periodontitis. *J Leukoc Biol.* 2014; 98.

Harvey, A. L. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today.* 2008; 13(19/20):894-901.

Hatanaka, E.; Levada-Pires, A.C.; Pithon-Curi, T.C.; Curi, R. Siltematic study on ROS production induced by oleic, linoleic and gamma-linoleic acids in human and rat neutrofiles. *Free Radical Biology & Medicine.* 2006; 41:1124–1132.

Hattori, H; Subramanian, K; Sakai, J; Jia, Y; Li, Y; Porter, T. F; Loison, F; Sarraj, B. Kasorn, A; Jo, H; Blanchard, C; Zirkle, D; Mcdonald D; Pai, S. Y; Serhan C. N; Luo, H. R. Small-molecule screen identifies reactive oxygen species as key regulators of neutrophil chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(8):3546-51.

Havsteen, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut.* 2002; 96:67-202.

Heller W.; Forkmann, G. Biosintesis in the flavonoids. *Advance in research since 1986* (harbone J. B. ed) p.499-535. Chapman and Hall LTd, London.

Hodge, G. L.; Flower, R.; Han, P. Optimal storage conditions for preserving granulocyte viability as monitored by annexin V binding in whole blood. *Journal of Immunological Methods.* 1999; 255:27-38.

Huh, J. E.; Jung, I.T.; Choi, J.; Baek, Y. H.; Lee, J. D.; Park, D. S.; Choi, D. Y. The natural flavonoid galangin inhibits osteoclastic bone destruction and osteoclastogenesis by suppressing NF- κ B in collagen-induced arthritis and bone marrow-derived macrophages. *Eur J Pharmacol.* 2013;698(1-3):57-66.

Jackson, J. K.; Higo,T.; Hunter, W. L.;Burt, H. M. The antioxidants curcumin and quercetin inhibit inflammatory processes associated with arthritis. *Inflamm. Res. Basel.* 2006; 55:168-175.

Jog, N. R.; Caricchio, R. The role of necrotic cell death in the pathogenesis of immune mediated nephropathies. *Clinical Immunology.* 2014; 153:243–253.

Kabeya, L. M. Estudo do efeito modulatório de derivados de 3-fenilcumarina nas funções de neutrófilos estimulados por imunocomplexos e análise da relação estrutura atividade. 2006. 192f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração:

Fármacos e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2006.

Kabeya, L.M.; Marchi, A. A.; Kanashiro, A.; Lopes, N.P.; Da Silva, C.H.T.P.; Pupo, M.T.; Lucisano-Valim, Y.M. Inhibition of horseradish peroxidase catalytic activity by new 3-phenylcoumarin derivatives: synthesis and structure-activity relationships. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2007; 15(3):1516-1524.

Kabeya, L. M.; Silva, C. H. T. P. Da; Kanashiro, A.; Campos, J. M.; Azzolini, A. E. C. S.; Polizello, A. C. M.; Pupo, M. T.; Lucisano-Valim, Y. M. Inhibition of immune complex-mediated neutrophil oxidative metabolism: A pharmacophore model for 3-phenylcoumarin derivatives using GRIND-based 3D-QSAR and 2D-QSAR procedures. *European Journal of Medical Chemistry*. 2008; 43:996-1007.

Kanashiro, A. et al. Inhibitory activity of flavonoids from *Lychnophora* sp. on generation of reactive oxygen species by neutrophils upon stimulation by immune complexes. *Phytother Res*. 2004; 18(1):61-5.

Kanashiro, A. et al. Sesquiterpene lactones from *Lychnophora pohii*: neutrophil chemiluminescence inhibition and free radical scavenger activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2006; 58(6):853-858.

Kennedy, Ad.; Deleo, F.R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol. Res. Basel*. 2009; 43:25-61.

Kim, H-H.; Bae, Y.; Kim, S-H. Galangin attenuates mast cell-mediated allergic inflammation. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 57:209–216.

Kin, S.; Elkon, K.B. Ma, X. Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells. *Immunity*. 2004; 21:643-653.

Kirchner, T.; Moller, S.; Klinger, M.; Solbach, W.; Laskay, T.; Solbach, W. The impact of various reactive oxygen species on the formation of neutrophil extracellular traps. *Mediators Inflamm*. 2012; 2012:849136.

Kobayashi, S. D.; DeLeo, F. R. Towards a comprehensive understanding of the role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2009 ; 1(3):309–333.

Kumar, V.; Abbas, A.K.; Fausto, N.; Robins, S.L.; Cotran, V. Bases patológicas das doenças. 7^a.ed, Rio de Janeiro: Elsevier editora, 2005.

Kurien, B. T.; Hensley, K.; Bachmann, M.; Scofield, R. H. Oxidatively modified autoantigens in autoimmune diseases. *Free Radical Biology & Medicine*. 2006; 41:549 – 556.

Lambeth, J. D. Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*. 2004; 4:181-189.

Leist, M. And Jäätelä, M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; 2:589-98.

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science*. 2009; 325:161-165.

Liu, J.; Li, X.; Yue, Y.; Li, J.; He, T.; He, Y. The inhibitory effect of quercetin on IL-6.Production by LPS-Stimulated Neutrophils.*Cellular& Molecular Immunology*. 2005; 2(6):455-460.

Lojek, A.; Denev, P.; Ciz, M.; Vasicek, O.; Kratchanova, M. The effects of biologically active substances in medicinal plants on the metabolic activity of neutrophils. *Phytochem Rev*. 2014; 13:499–510.

Lorenz, H-M, Herrmann, M., Winkler, T. Gaipf, U. Role of apoptosis in autoimmunity. *Apoptosis*. 2000; 5(5):443-49.

Lotito, S.B.; Frei, B. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: contrasting in vitro and in vivo effects. *Free Radic. Biol. Med*. 2004; 36:201-211.

Luan, Y. Y.; Yao, Y. M.; Xiao, X. Z.; Sheng, Z. Y. Insights into the apoptotic death of immune cells in sepsis. *J Interferon Cytokine Res*. 2015;35(1):17-22.

Luan, Y. Y.; Yao, Y. M.; Xiao, X. Z.; Sheng, Z. Y. Insights into the apoptotic death of immune cells in sepsis. *J Interferon Cytokine Res*. 2015; 35(1):17-22.

Lucisano-Valim, Y. M.; Kabeya, L. M.; Kanashiro, A; Russo-Carbolante, E. M. S.; Polizello, A. C. M.; Azzolini, A. E. C. S.; Silva, S. C.; Lopes, J. L. C.; Oliveira, C. A.; Mantovani, B. A simple method to study the activity of natural compounds on the chemiluminescence of neutrophils upon stimulation by immune complexes. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2002; 47:53– 58.

Lucisano, Y. M.; Mantovani, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by complexes of IgM and IgG. *Journal of Immunology*. 1984; 132:2015-2020.

Luerman, G. C.; Uriarte, S. M.; Rane, M. J.; Mcleish, K. R. Application of proteomics to neutrophil biology. *Journal of Proteomics*. 2010; 73:552–561.

Mantovani, A.; Cassatella, M. A.; Costantini, C.; Jaillon, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2011; 11:519-531, 2011.

Marchi, A. A.;Castilho, M.S.; Nascimento, P.G.; Archanjo, F.C.; Del Ponte, G.; Oliva, G.; Pupo, M.T. New 3-piperonylcoumarins as inhibitors of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) from *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg. Med. Chem.* 2004; 12(18):4823-33.

Marzocchi-Machado, C. M.; Alves, C. M.; Azzolini, A. E.; Polizello, A.C.; Carvalho, I. F.; Lucisano-Valim, Y. M. Fcγ and complement receptors: expression, role and co-operation in mediating the oxidative burst and degranulation of neutrophils of Brazilian systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. 2002; 11(4):240-8.

Marzocchi-Machado, C. M.; Alves, C. M.; Azzolini, A. E.; Polizello, A. C.; Carvalho, I. F.; Lucisano-Valim, Y. M. CR1 on erythrocytes of Brazilian systemic lupus erythematosus patients: the influence of disease activity on expression and ability of this receptor to bind immune complexes opsonized with complement from normal human serum. *J Autoimmun.* 2005; 25(4):289-97.

Matos, M. J.; Teran, C.; Perez-Castillo, Y.; Uriarte, E.; Santana, L.; Vina, D. Synthesis and study of a series of 3-aryl coumarins as potent and selective monoamine oxidase B inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2011; 54:7127–7137.

Mayadas, T. N; Tsokos, G. C; Tsuboi, N. Mechanisms of Immune Complex-Mediated Neutrophil Recruitment and Tissue Injury. *Journal of American Heart Association*. 2009; 120(20):2012-2024.

Mayadas, T. N.; Cullere, X.; Lowell, C. A. The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2014; 9:181–218.

McCracken J. M., Allen L. A. Regulation of human neutrophil apoptosis and lifespan in health and disease. *J Cell Death*. 2014;7:15-23.

Meyer-Hoffert, U.; Wingerts Zahn, J.; Wiedow, O. Human leukocyte elastase induces keratinocyte proliferation by epidermal growth factor receptor activation. *Journal of Investigative Dermatology*. 2005; 123:338-345.

Middleton, E. Jr.; Handas Wami, C.; Theohaides, C. T. The effect of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*. 2000; 52(4):673-751.

Mócsai, A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J. Exp. Med.* 2013; 210(7):1283-1299.

Moreira, M. R.; Kanashiro, A.; Kabeia, L. M.; Polizello, A. C. M.; Azzolini, A.E.C.S.; Curti, C.; Oliveira, C.A.; Do-Amaral, A. T.; Valim, Y. M. L. Neutrophil effector functions triggered by Fc-gamma and/or complement receptor are dependent on b-ring hydroxylation patten and physicochemical properties of flavonoids. *Life Sciences*. 2007; 81:317-326.

Moulding D. A.; Hart, C. A.; Edwards, S. W. Regulation of neutrophil FcgammaRIIIb (CD16) surface expression following delayed apoptosis in response to GM-CSF and sodium butyrate. *J Leukoc Biol.* 1999; 65(6):875-82.

Nguyen-Jackson, H; Panopoulos, A. D; Zhang, H; Li, H, S; Watowich, S. S. STAT3 controls the neutrophil migratory response to CXCR2 ligands by direct activation of G-CSF-induced CXCR2 expression and via modulation of CXCR2 signal transduction. *Blood*. 2010; 115(16): 3354–3363.

Nikoletopoulou, V.; Markaki, M.; Palikaras, K.; Tavernarakis, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica e Biophysica Acta*. 2013; 1833:3448–3459.

Nicoletti, I.; Migliorati, G.; Pagliacci, M.C.; Grignani, F.; Riccardi, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*. 1991; 139: 271-279.

Nkengfack, A.E.; Waffo, A.K.; Azebaze, G.A.; Fomum, Z.T.; Meyer, M.; Bodo, B.; Van Heerden, F.R. Indicanine A, a new 3-phenylcoumarin from root bark of *Erythrina indica*. *Nat Prod*. 2000; 63(6):855-6.

Nunes, P.; Demaurex, N. The role of calcium signaling in phagocytosis. *Journal of Leukocyte Biology*. 2010; 88:57-68.

Ouchterlony, O. Diffusion-in-gel methods for immunological assays. *Progress in Allergy*. Basel. 1958; 15:1-78.

Paoliello-Paschoalato, A. B.; Azzolini, A. E.; Cruz, M. F.; Marchi, L. F.; Kabeya, L. M.; Donadi, E. A.; Lucisano-Valim, Y. M. Isolation of healthy individuals' and rheumatoid arthritis patients' peripheral blood neutrophils by the gelatin and Ficoll-Hypaque methods: comparative efficiency and impact on the neutrophil oxidative metabolism and Fc γ receptor expression. *J Immunol Methods*. 2014; 412:70-7.

Paula, F. S.; Kabeya, L. M.; Kanashiro, A.; Figueiredo, A. S.; Azzolini, A. E.; Uyemura, S. A.; Lucisano-Valim, Y. M. Modulation of human neutrophil oxidative metabolism and degranulation by extract of *Tamarindus indica* L. fruit pulp. *Food and Chemical Toxicology*. 2009; 47(1):163-70.

Pincetic, A.; Bournazos, S.; DiLillo, D. J.; Maamary, J.; Wang, T. T.; Dahan, R.; Fiebiger, B. M.; Ravetch, J. V. Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*. 2014; 15(8):707-16.

Pruchniak, M. P.; Arazna, M.; Demkow, U. Life of neutrophil: From stem cell to neutrophil extracellular trap. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 2013; 187:68– 73.

Pugine, S. M. P.; Faria, M. F.; Maia, A. A. M.; Valle, C. R.; Boschini, C.; Poleti, M.; Silva, D. M. R. M.; Melo, M. P. Effect of *cysticercus cellulosae* fractions on the respiratory burst of pig neutrophils. *Rev. Inst. Med. Trop*. 2005; 47(2):91-94.

Quinn, M.T.; Gauss, K.A. Structure and regulation of the neutrophils respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *Journal of Leukocyte Biology*. 2004; 76:760-781.

Rahman, I.; Biswas, S.K.; Kirkam, P. A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical Pharmacology*. 2006; 72:1439-1452.

Ramos, S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J. Nut. Biochem*. 2007; 18:427-442.

Riccardi, C.; Nicoletti, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols*. 2006; 1(3):1458-61.

Rossi, A. G.; Sawatzky, D. A.; Walker, A.; Ward, C.; Sheldrake, T. A.; Riley, N. A.; Caldicott, A.; Martinez-Losa, M.; Walker, T. R.; Duffin, R.; Gray, M.; Crescenzi, E.; Martin, M. C.; Brady, H. J.; Savill, J. S.; Dransfield, I.; Haslett, C. Cyclin-dependent

kinase inhibitors enhance the resolution of inflammation by promoting inflammatory cell apoptosis. *Nat Med.* 2006; 12(9):1056-64.

Roussaki, M; Kontogiorgis, C. A.; Hadjipavlou-Litina, D.; Hamilakis, S.; Detsi, A. A novel synthesis of 3-aryl coumarins and evaluation of their antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2010; 20(13):3889-92.

Russo-Carbolante, E. M.; Polizzelo, A.C.; Azzolini, A. E.; Maciel, L. M.; Lucisano-Valim, Y. M. Neutrophils from Brazilian patients with Graves' disease: some biochemical and functional aspects. *Cell Biochem Funct.* 2005; 23(5):297-306.

Santos, E. O. L.; Kabeya, L.M.; Figueiredo-Rinhel, A. S. G.; Marchi, L. F.; Andrade, M. F.; Piatesi, F.; Paoliello-Paschoalato, A. B.; Azzolini, A. E. C. S.; Lucisano-Valim, Y. M. Flavonols modulate the effector functions of healthy individuals' immune complex-stimulated neutrophils: A therapeutic perspective for rheumatoid arthritis. *International Immunopharmacology.* 2014; 21:102–111.

Sashidhara, K. V.; Kumar, A.; Chatterjee, M.; Rao, K. B.; Singh, S.; Verma, A. K.; Palit, G. Discovery and synthesis of novel 3-phenylcoumarin derivatives as antidepressant agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2011; 21:1937–1941.

Segel, G. B.; Halterman, M. W.; Lichtman, M. A. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *Journal of Leukocyte Biology.* 2011; 89:359-372.

Selloum, L.; Djelili, H.; Sebihi, L.; Arnhold, J. Scavenger effects of flavonoids on HOCl-induced luminol chemiluminescence. *Luminescence.* 2004; 19:199-204.

Sengelov, H.; Borregaard, N. Free flow electrophoresis in subcellular fractionation of human neutrophils. *Journal of Immunological Methods.* 1999; 232:145–152.

Simoes-Ambrosio L. M. C., Gregorio L. E., Sousa J. P. B., Figueiredo-Rinhel A. S. G., Azzolini A., Bastos J. K., et al. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. *Fitoterapia.* 2010; 81(8):1102-8.

Simoes L. M. C., Gregorio L. E., Da Silva A. A., de Souza M. L., Azzolini A., Bastos J. K., et al. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. *Journal of Ethnopharmacology.* 2004; 94(1):59-65.

Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10(6):427-39.

Suri, S.; Taylor, M.A.; Verity, A.; Tribolo, S.; Needs, P.W.; Kroon, P.A.; Hughes, D.A.; Wilson, V.G. A comparative study of the effects of quercetin and its glucuronide and sulfate metabolites on human neutrophil function in vitro. *Biochemical Pharmacology*. 2008; 76:645–653.

Tawata, M.; Yoda, Y.; Aida, K.; Shindo, H.; Sasaki, H.; Chin, M.; Onaya, T. Anti-platelet action of GU-7, a 3 -arylcoumarin derivative, purified from *Glycyrrhizae Radix*. *Planta Med*. 1990; 56:259-263.

Tunali, T.; Yarat, A.; Bulut, M.; Emekli, N. 6,7-Dihydroxy-3-phenylcoumarin inhibits thromboplastin induced disseminated intravascular coagulation. *British Journal of Haematology*. 2011; 126:226–230.

Uriarte, S. M.; Rane, M. J.; Luerman, G. C.; Barati, M. T.; Ward, R. A. Nauseef, W. M.; Mcleish, K. R. Granule exocytosis contributes to priming and activation of the human neutrophil respiratory burst. *The Journal of Immunology*. 2011; 187:391-400.

Van Den Berg, J.M. Divergent effects of tumor necrosis factor α on apoptosis of human neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*. 2001; 69:467-73.

Van Der Veen, B. S.; Winther, M. P. J.; Heeringa, P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxidants & redox signaling*. 2009; 11(11):2899-2937.

Van Dyke, K.; Van Scott, M. R.; Castranova, V. Measurement of phagocytosis and cell-mediated cytotoxicity by chemiluminescence. *Methods Enzymol*. 1986; 132:498-507.

Vermes, I.; Haanen, C.; Reutelingsperger, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods*. 2000; 21(243):167-90.

Vinson, J.A.; Su, X; Zubic, L.; Bose, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J. Agric. Food Chem*. 2001; 49:5315-5321.

Vivier, E.; Daeron, M. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunology Today*. 1997; 18(6):286-291.

Wang, J.; Arase, H. Regulation of immune responses by neutrophils. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 2014; 1319:66–81.

Wang, K. Molecular mechanisms of liver injury: Apoptosis or necrosis. *Exp Toxicol Pathol*. 2014; 66(8):351-6.

Weinmann, P.; Moura, R.; Caetano-Lopes Jr, Pereira Pa, Canhao H, Queiroz Mv. Delayed neutrophil apoptosis in very early rheumatoid arthritis patients is abrogated by methotrexate therapy. *Clin Exp Rheumatol*. 2007; 25(6):885-7.

Zhivotovsky B, Orrenius S. Current concepts in cell death. *Curr Protoc Cell Biol*. 2001; Chapter 18:Unit 18.1

Zuanazzi, J. A. S.; Montanha, J. A. Flavonoides. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. *Farmagnosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004. Cap. 23, p. 578-614.

Apêndices

1. Preparação e purificação de imunoglobulina da classe G

1.1. Cromatografia de troca iônica

Após coleta do soro imune, inativação e precipitação com sulfato de amônio, essa suspensão ficou por 12 horas a 4°C. Após esse período, foi centrifugado a 1800 x g por 15 minutos. O precipitado foi dissolvido em solução de sulfato de amônio a 40% (p/v) e mais uma vez submetido a centrifugação nas mesmas condições da centrifugação anterior. A fração precipitada foi solubilizada em PBS pH 7.4 e dialisada três vezes, contra esta mesma solução, durante 24 horas a 4°C, posteriormente dialisada contra tampão fosfato 0.02 mol/L pH 7.5 o mesmo tampão usado cromatografia.

A fração de anti-soro contendo IgG anti-OVA foi purificada por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE (dietilaminoetil-celulose), previamente equilibrada com tampão de eluição (fosfato 0,02 Mol/L pH 7.5)

A eluição da proteína foi acompanhada por leitura espectrofotométrica a 280nm (figura 1). As frações (20-100) que corresponde a IgG foram reunidas, e em seguida estas amostras foram concentradas através de um sistema de ultrafiltração (UltrafiltrationCell, Model 8400 Amicon, Amicon Corpo Danvers, Mass. USA).

Após a concentração, a amostra foi aliquoteada em tubos eppendorf com volume de 1ml e armazenada em freezer a -20°C para posterior caracterização.

Figura 1: Perfil cromatográfico da purificação de anticorpo da classe G anti-OVA em resina DEAE – celulose.

1.2. Caracterização das imunoglobulinas- Eletroforese em gel de poliacrilamida

Esta metodologia foi utilizada para caracterizar a presença de IgG previamente preparadas.

As amostras contendo imunoglobulinas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida e comparadas com padrões de diferentes pesos moleculares (Tabela 1), onde foi identificado que a massa molecular equivalente a moléculas de IgG é de aproximadamente 175 KDa (figura 2). Os valores das massas foram calculados pela curva [logaritmo de massa molecular (log MM) x fator de retenção de amostra no gel de eletroforese (Rf)]. (figura 3)

Tabela 1- Padrões de massa molecular (MM)

BIO-RAD Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range Catalog 161-0318, Control 98562			
Protein	Calibrated MW (daltons) on Tris-HCl gel	Calibrated MW (daltons) on Bis-Tris gel	Calibrated MW (daltons) on Tris-Acetate gel
Myosin	208,964	196,761	196,200
β-galactosidase	119,849	102,378	109,078
Bovine serum albumin	99,109	57,974	72,314
Ovalbumin	52,799	40,966	44,945
Carbonic anhydrase	37,513	26,940	31,713
Soybean trypsin inhibitor	28,855	20,699	
Lysozyme	19,374	15,259	
Aprotinin	6,894	6,493	

CL1610318 Rev B
 Bio-Rad Laboratories • 2000 Alfred Nobel Drive • Hercules, CA 94547

Figura 3: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS. Padrões de massa molecular Bio-Rad. O gel de empilhamento foi preparado com uma mistura a 4% de poliacrilamida e o gel de corrida a 10%. A corrida foi realizada em tampão Tris – glicina pH 8,3, com corrente de 10mA. 1: Pico 1 da cromatografia DEAE celulose (15ug de proteína); 2 e 4 padrões de peso molecular; 3. Pico 1 da cromatografia DEAE celulose (10ug de proteína).

Figura 4: Curva logarítmica para determinação da Massa Molecular (MM) das amostras.

1.3. Determinação do ponto de equivalência dos imunocomplexos formados com as imunoglobulinas G

Após identificação das amostras foi feito uma curva de precipitação de imunocomplexos, para determinação o ponto de equivalência formada. Para isso foi fixada a concentração de anticorpo e foram realizadas várias diluições do antígeno. Sendo que o ponto de equivalência deste anticorpo foi AC: 1:2; Ag:1:4, o qual foi utilizados em todos os experimento (figura 4).

Figura 5: Curva de precipitação para determinação do ponto de equivalência.

Anexos

Anexo A - Aprovação do Protocolo de Pesquisa pelo CEP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP nº. 018/2013
 kms

Ribeirão Preto, 6 de maio de 2013.

À Senhora
Prof^a. Dr^a. Yara Maria Lucisano Valim
 Departamento de Física e Química
 FCFRP/USP

Prezada Senhora,

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou, em sua 115ª reunião ordinária realizada em 05.02.2013, o projeto de pesquisa intitulado *"ESTUDO DA MODULAÇÃO DA APOPTOSE E DA NECROSE DE NEUTRÓFILOS HUMANOS MANTIDOS EM CULTURA PELA GALANGINA E 6,7-DIACETOXI-3-(3,4-METILENODIOXIFENIL) CUMARINA"*, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 300**.

Informamos que, conforme Carta Circular 003/2011 da CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso e também o pesquisador responsável deverão rubricar todas as páginas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE, apondo sua assinatura na última página do referido Termo. Ainda, de acordo com a Resolução 196/96, item IV.2, letra d, "o TCLE deverá ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador".

Em atendimento à Resolução 196/96, lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe.

Atenciosamente,

Cleni M. Marzocchi Machado

PROF^a. DR^a. CLENI M. MARZOCCHI MACHADO
 Vice-Coordenadora do CEP/FCFRP

Anexo B - Aprovação do Protocolo de Pesquisa pelo CEUA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 05.1.1050.53.9), intitulado: "Estudo do Mecanismo de Ação de Cumarinas sobre Funções Efetoras de Neutrófilos Estimulados por Imunocomplexos", de autoria de **Yara Maria Lucisano Valim**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP, foi aprovado em reunião da CEUA de 08.11.05

Ribeirão Preto, 8 de novembro de 2005

 Presidente da CEUA
 Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos

 Secretária da CEUA
 Maria Angélica Depiro