



Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”**

Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

ANDRÉ BITTENCOURT MARTINS

**Concentração e atividade sérica da mieloperoxidase em
indivíduos Tabagistas**

ARARAQUARA-SP

2010

ANDRÉ BITTENCOURT MARTINS

**Concentração e atividade sérica da
mieloperoxidase em indivíduos Tabagistas**

Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual “Julio Mesquita Filho” campus de Araraquara como parte dos requisitos para o título de mestre em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia. Área de concentração: Hematologia.

Orientador: Prof. Dr. LUIZ MARCOS DA FONSECA
Co-orientador: Prof. Dr. VALDECIR XIMENES FARIAS

ARARAQUARA-SP

2010

Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual “Julio Mesquita Filho” campus de Araraquara como parte dos requisitos para o título de mestre em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia. Área de concentração: Hematologia.

Trabalho desenvolvido no laboratório de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Campus Araraquara.

Fomento: Bolsa Capes – Mestrado.

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e
Documentação

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNESP – Campus de Araraquara

M386c Martins, André Bittencourt
Concentração e atividade sérica da mieloperoxidase em indivíduos tabagistas. / André Bittencourt Martins. – Araraquara, 2010
79 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências em Biotecnologia aplicadas à Farmácia
Orientador: Luiz Marcos da Fonseca
Co-orientador: Valdecir Ximenes Farias

1. Mieloperoxidase. 2. Neutrófilos. 3. Fumantes. 4. CXIL8. I. Fonseca, Luiz Marcos da, orient. II. Farias, Valdecir Ximenes, co-orient. III. Título.

CAPES: 50700006

Agradecimentos

Mãe, obrigado por me tornar auto-suficiente na vida, dando todo suporte para que eu pudesse alcançar mais essa conquista, amo você.

Prof. Me. Daniel Perez meu grande irmão a quem eu sempre recorro quando os problemas aparecem muito obrigado pelo apoio durante este e todos os outros caminhos percorridos.

Débora Bittencourt Martins e Mônica Bittencourt Martins minhas amadas irmãs que merecem todo agradecimento por suportarem meu mau humor nos momentos de dificuldades, super beijo.

Murillo Lombello, Moretti Lombello, David Zink, Luiza Martins Zink, Tio Celso e Vó obrigado pela paciência e por não criticar minha longa ausência durante esse trabalho, senti falta de vocês.

Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca agradeço pela paciência por me orientar e lidar com minha teimosia

Prof. Dr. Marcelo Nalin agradeço sua ajuda pontual, sua amizade e suas importantes e indispensáveis críticas ao meu trabalho.

Prof. Dra Christiane Pienna Soares desde pequenos tubos até luminosas idéias, minha grande amiga e professora, fico muito feliz, por poder sempre contar com sua presença, muito obrigado.

Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti se todo aluno tivesse um pai em sua orientação para a vida acadêmica com certeza você seria o meu, obrigado por sua amizade e por seu apoio em todos os momentos de idéias escuras, sendo minha luz pelo árduo e sombrio caminho.

Marcos Aparecido Dangona meu amigo e técnico que me ajudou muito a realizar com qualidade cada passo de meu trabalho, obrigado.

Vânia Ortega Gutierrez e Vanessa de Frias Barbosa vocês foram muito importantes para minha estabilidade emocional pela grande amizade e por toda ajuda que me deram durante essa jornada, obrigado.

Renata Pires de Assis meu braço direito em todo trabalho obrigado por estar sempre ao meu lado me ajudando, amiga.

Giovana Reni Barbosa chegou ajudando e apoiando no período mais crítico, sempre foi minha grande amiga e agora é meu amor, beijos.

Lista de Abreviaturas:

3,3',5,5'TMB: Tetrametilbenzina
ApoA-1: Apolipoproteína A1
CAT: Enzima Catalase
Cl⁻: Ion cloreto
CldU: 5-Clorodesoxiuridina
CXIL-8: Interleucina-8
ERN: Espécies reativas do nitrogênio
ERO : Espécies reativas de oxigênio
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
H₂SO₄: Ácido Sulfúrico
HDL: Lipoproteína de alta densidade
HOCl: Ácido hipocloroso
IAM: Infarto Agudo do Miocárdio
LDL: Lipoproteína de baixa densidade
LPMN: Leucócitos polimorfonucleares
LTB-4: Lipo-oxigenase
MPO: Mieloperoxidase
MPO-I: MPO oxidada a composto I
MPO-II: MPO-I oxidada a composto II
NaCl: Cloreto de sódio
NH₂Cl: Monocloramina (Cloreto de amônia)
NH₄Cl: Cloreto de amônio
O₂^{•-} : Ânion superóxido
OH[•] : Radical hidroxil
ROO[•]: Radical peroxil
SCA: Síndrome Coronariana Aguda
SOD: Enzima superóxido dismutase
TNB: Tetra metil benzidina

Lista de Figuras:

Figura 1- Neutrófilos: Quimiotaxia, diapedese e fagocitose.

Figura 2: Ação da NADPH oxidase, Superóxido Dismutase (SOD) e mieloperoxidase (MPO) (BRENNAN *et. al.*, 2003).

Figura 3: Mecanismo de ação catalítica da mieloperoxidase no “burst” oxidativo (Podrez *et. al.*, 2000).

Figura 4: Esquema de diluição seriada para curva padrão do Kit RayBio® Human CXIL8 ELISA

Figura 5: Polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos, após metodologia de separação por solução de gelatina a 2,5% em salina (cerca de 85% das células).

Figura 6: Padrão de albumina humana com equação da reta de regressão linear e fator a 650 nm e 750 nm.

Figura 7: Curva do padrão de MPO do Kit Innozyme Calbiochem, determinando o fator (F = 106,4).

Figura 8: Curva do padrão de CXIL8 do RayBiotech, determinando o fator 14,3

Figura 9: Mecanismo proposto para formação de produtos coloridos provenientes da oxidação do guaiacol (DOERGE *et.al.*, 1997).

Figura 10: Espectrofotometria Ultravioleta-visível da oxidação do guaiacol (DOERGE *et.al.*, 1997)

Figura 11: Esquema de formação da tarinacloramina pela MPO (HAMPTON *et. al.*, 1998).

Figura 12 : Média e erro padrão dos leucócitos. (p<0,001)

Figura 13: Média e erro padrão dos neutrófilos dos indivíduos tabagistas e não tabagistas.

Figura 14: Média e erro padrão dos monócitos dos indivíduos tabagistas e não tabagistas.

Figura 15: Média e erro padrão dos linfócitos dos indivíduos tabagistas e não tabagistas.

Figura 16: Média e erro padrão dos eosinófilos dos indivíduos tabagistas e não tabagistas.

Figura 17: Média e erro padrão dos basófilos dos indivíduos tabagistas e não tabagistas.

Figura 18: Média e erro padrão da concentração sérica de MPO (pg/μL) de indivíduos tabagistas e não tabagistas. (p=<0,001).

Figura 19: Média e erro padrão da concentração sérica de MPO (pg/μL) dividida por (neutrófilos + monócitos) de indivíduos tabagistas e não tabagistas. (p=<0,001).

Figura 20: Média e erro padrão da concentração sérica de CXIL8 (fg/μL) de indivíduos tabagistas e não tabagistas. (p = 0,00231).

Figura 21: Espectrofotometria Ultravioleta-visível da oxidação do guaiacol utilizando-se PBS-D A=0,262 e Sorensen A=0,594.

Figura 22: Espectrofotometria da oxidação do guaiacol com amostra fixa em $0,76 \cdot 10^5$ células (35,75 μg de proteína) por reação.

Figura 23: Espectrofotometria Ultravioleta-visível da oxidação do guaiacol, fixando-se o guaiacol e H₂O₂ e variando-se a amostra.

Figura 24: Média e erro padrão da absorbância por segundo por μg de proteína dos indivíduos tabagistas e não tabagistas. (p>0,05)

Figura 25: Espectrofotometria Ultravioleta-visível da oxidação do TMB pelo ácido hipocloroso, demonstrando menor formação de HOCl quanto maior a concentração de proteína por mL de amostra.

Figura 26: Média e desvio padrão da produção em mols de HOCl por grama de proteína por minuto de reação dos indivíduos tabagistas e não tabagistas. (p>0,05).

Figura 27 – Proposta de correlação entre tabagistas, neutrofilia, aumento do nível sérico de MPO e aumento de doenças coronárias entre indivíduos fumantes.

Lista de Tabelas:

Tabela 1- Volume de padrão e tampão utilizado para os padrões de MPO.

Tabela 2: Número de células e μg de proteínas correspondentes

Tabela 3- Valores hematimétricos relativos e absolutos dos leucócitos/ μL de sangue de indivíduos tabagistas. Determinação em contador automático Coulter- STKS.

Tabela 4- Valores hematimétricos relativos e absolutos dos leucócitos/ μL de sangue de indivíduos não tabagistas. Determinação em contador automático Coulter- STKS.

Tabela 5- Teste de formação de ácido hipocloroso da via clorinante, marcador específico da atividade da MPO em indivíduos tabagistas

Tabela 6- Teste de formação de ácido hipocloroso da via clorinante, marcador específico da atividade da MPO em indivíduos não tabagistas.

Tabela 7- Teste de absorvância por segundo por μg de proteína da via peroxidativa dos indivíduos tabagistas.

Tabela 8- Teste de absorvância por segundo por μg de proteína da via peroxidativa dos indivíduos não tabagistas.

Tabela 9- Teste de ELISA MPO dos indivíduos tabagistas.

Tabela 10- Teste ELISA MPO indivíduos não tabagistas.

Tabela 11- Teste CXIL8 indivíduos não tabagistas e tabagistas

Índice

Lista de Abreviaturas	7
Lista de Figuras	8
Lista de Tabelas	9
Resumo	12
1.Introdução	14
1.1. Leucócitos Polimorfonucleares Neutrófilos.....	14
1.2 Resposta Inflamatória	15
1.3 Radicais livres.....	17
1.4.“Burst” oxidativo, ERO e o papel da MPO.....	18
2.Objetivos.....	24
3. Material e Método.....	25
3.1 Material.....	25
3.1.1 Equipamentos.....	25
3.1.2 Reagentes.....	25
3.1.2.1 Tampão Acetato.....	25
3.1.2.2 Tampão de Sorensen.....	25
3.1.2.3 Tampão PBS-D.....	26
3.1.2.4 PBS-Taurina	26
3.1.2.5 Solução de Gelatina	26
3.1.2.6 Kit InnoZyme Calbiochem.....	26
3.1.2.7 Kit RayBiotech de quantificação de CXIL-8.....	28
3.1.2.8 Determinação de proteína.....	30
3.1.2.9 Líquido de Lazarus (contagem de leucócitos).....	30
3.1.2.10 Cloreto de amônio (NH ₄ Cl) (solução hemolizante).....	30
3.1.2.11 Solução de Guaiacol 200 mM.....	30
3.1.2.12 Soluções estoque de enzima e substratos.....	30
3.1.2.12.1 Solução estoque de TMB.....	30
3.1.2.12.2 Solução estoque de H ₂ O ₂	31
3.1.2.12.3 Solução mãe de Guaiacol em Sorensen a 100mM.....	31
3.1.2.12.4 Solução de ácido hipocloroso.....	31
3.2 Método.....	32

3.2.1 Casuística.....	32
3.2.2 Separação de Neutrófilos.....	33
3.2.3 Dosagem de proteínas das células suspensas em Sorensen.....	33
3.2.4 Kit InnoZyme da Calbiochem para atividade da MPO.....	34
3.2.5 Kit Elisa de detecção da CXIL8 plasmática humana RayBiotech®.....	35
3.2.6 Atividade Peroxidativa com Guaiacol.....	38
3.2.7 Produção de HOCl pela MPO pelo teste de clorotaurina em TMB	39
3.2.8 Análise Estatística.....	40
4. Resultados.....	41
4.1 Comparação dos hemogramas de indivíduos fumantes e não fumantes	41
4.1.1 Leucócitos totais.....	41
4.1.2 Neutrófilos.....	42
4.1.3 Monócitos.....	43
4.1.4 Linfócitos.....	44
4.1.5 Eosinófilos.....	44
4.1.6 Basófilos.....	45
4.2 Atividade sérica da MPO	45
4.3 Atividade sérica da MPO por célula.....	45
4.4 Detecção CXIL8 sérica humana Kit Elisa RayBiotech.....	47
4.5 Resultados da Via Peroxidativa.....	48
4.6 Resultados da Via Clorinante.....	52
5 Discussão.....	54
6 Conclusões	58
7 Referências bibliográficas.....	59
8 Anexos.....	67

RESUMO

Níveis séricos elevados de mieloperoxidase (MPO) estão associados com disfunção endotelial e risco aumentado de acidente cardíaco-vascular. Há muito tempo se sabe que o hábito do tabagismo é um fator de risco para doenças cardiovasculares. Uma vez que o infarto do miocárdio está associado também com leucocitose neutrofílica, e fumantes apresentam neutrofilia, nós hipotetizamos que o nível sérico de MPO em fumantes também poderia estar elevado. O estudo incluiu quarenta adultos voluntários e saudáveis. O grupo controle foi composto por vinte indivíduos não tabagistas e o grupo de estudo por vinte indivíduos tabagistas. Hemograma, Interleucina 8 (CXIL8) sérica e MPO sérica foram determinados. Encontramos contagens de neutrófilos e monócitos aumentados ($p < 0,05$) e o nível sérico de interleucina-8 (CXIL8) foi cerca de quatro vezes maior em fumantes quando comparados a não fumantes ($p < 0,05$). O nível sérico de MPO foi também significativamente superior ($p < 0,05$) nos indivíduos fumantes. Este último resultado se correlaciona perfeitamente com a neutrofilia e o aumento da CXIL8 (potente quimio-atrator e ativador de neutrófilos), que caracterizam indivíduos fumantes. Propõe-se que esta alta concentração sérica de MPO possa estar diretamente envolvida com a alta prevalência de doenças coronarianas arteriais entre tabagistas.

Palavras chave: Mieloperoxidase, Neutrófilos, Fumantes, CXIL8.

Abstract

Elevated myeloperoxidase (MPO) serum levels are associated with endothelial dysfunction and cigarette smoking is a risk factor for cardiovascular diseases. Since myocardial infarction is associated with leucocytosis and smokers present increased levels of neutrophils, here we hypothesized that levels of serum MPO in smokers subjects could be also elevated. The study included forty adult healthy volunteers. The control group consisted of twenty non-smokers and the study group was twenty smoker subjects. The hemogram, interleukin-8 (CXIL8) and MPO serum levels were measured. We found that neutrophil and monocytes counts are increased ($p < 0,05$) and the serum level of interleukin-8 (CXIL8) was about 4-fold higher in smokers compared to non-smokers ($p < 0,05$). The level of MPO was also higher among the group of smokers ($p < 0,05$). This result correlated perfectly with the increased in neutrophil counts and CXIL-8 serum level (a potent neutrophil chemo-attractant and activator), which characterize smoking subjects. We propose that the high level of serum MPO could be directly involved in the higher prevalence of coronary artery diseases among smokers.

Keywords: Myeloperoxidase, Neutrophils, Smokers, *CXIL8*.

1 INTRODUÇÃO

1.1. Leucócitos Polimorfonucleares Neutrófilos.

Os leucócitos polimorfonucleares (LPMN), principalmente os neutrófilos, que são dentre as células fagocíticas as mais abundantes na circulação, são também as primeiras células a serem ativadas na defesa pelo sistema imunológico inato contra infecções. Estas células devem migrar por quimiotaxia até o local da infecção, onde elas reconhecem, fagocitam e destroem microorganismos invasores pela liberação, no fagolisossomo, de enzimas hidrolíticas, proteolíticas e de espécies reativas de oxigênio (ERO), produzidas por um complexo enzimático de membrana denominado NADPH oxidase (BABIOR, 1984). As ERO são essenciais para a destruição dos microorganismos fagocitados. No processo bactericida os agentes etiológicos são englobados em vacúolos fagocíticos (fagossomos) e posteriormente os grânulos dos neutrófilos se fundem a essa estrutura dando origem ao fagolisossomo, os patógenos são então expostos a ataques das enzimas hidrolíticas e proteínas bactericidas, estocadas nos grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos. Estes apresentam quatro tipos de grânulos, que contêm diferentes enzimas e proteínas, destacando-se os grânulos azurófilos, os quais apresentam níveis elevados de mieloperoxidase (MPO). As peroxidases são enzimas que normalmente catalisam reações de oxidação envolvendo peróxido de hidrogênio, as quais são encontradas tanto em animais como em vegetais, a qual juntamente com a NADPH oxidase de membrana dos neutrófilos está envolvida na geração de ERO (ARNHOLD, 2004). O conteúdo destes grânulos pode ser também liberado no meio extracelular, após a ativação dos neutrófilos.

Durante a atividade microbicida, ocorre um processo dinâmico que requer energia. As alterações metabólicas associadas com a ação microbicida dos neutrófilos são referidas genericamente como “burst” oxidativo (BABIOR, 1984).

Quando o sistema imune inato (fagócitos) é ativado, defesas antioxidantes, enzimáticas e não-enzimáticas, atuam contra as toxicidades dessas espécies que nesse momento são geradas e são responsáveis pela manutenção da homeostase entre, a produção e a eliminação das ERO.

1.2 Resposta Inflamatória

A inflamação é uma resposta do organismo a diversos agentes lesivos, como, por exemplo, microorganismos, queimaduras, trauma físico ou células tumorais (DEJANA, CORADA; LAMPUGNANI, 1995). Os neutrófilos desempenham um papel central nesse processo respondendo rapidamente a estímulos quimiotácteis constituindo-se na principal população celular da resposta inflamatória (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1995). Após sua migração, os neutrófilos são ainda capazes de liberar vários mediadores que promovem a amplificação dessa resposta (HEIT *et. al.*, 2002). O recrutamento de neutrófilos para o local da inflamação envolve principalmente a ação da interleucina-8 (CXIL8). Uma seqüência de eventos (ativação, rolamento, adesão e transmigração), coordenada por moléculas de adesão expressas na superfície dos leucócitos e das células endoteliais, estão envolvidas na interação neutrófilo-endotélio (Figura 1.).

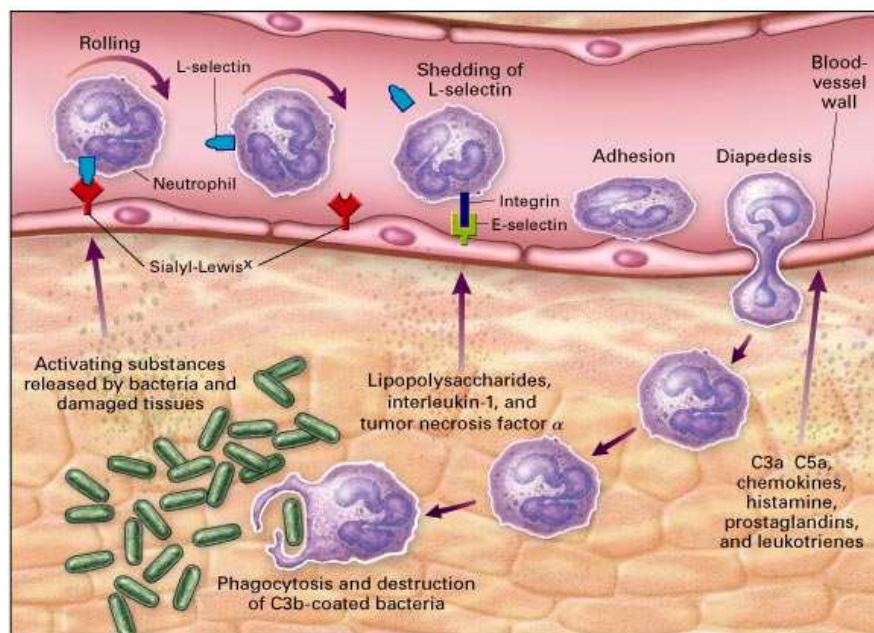


Figura 1- Neutrófilos: Quimiotaxia, diapedese e fagocitose.

O início do rolamento dos neutrófilos é mediado pela ligação reversível das glicoproteínas Selectinas encontradas tanto no neutrófilo como no endotélio (SPERTINI *et. al.*, 1991; KADONO *et. al.*, 2002). Posteriormente ocorre a expressão de outras glicoproteínas na superfície dos leucócitos, denominadas de Integrinas, que reconhecem moléculas de adesão

endoteliais (da família das imunoglobulinas). Nesse segundo passo, ocorre a ligação de alta afinidade dos leucócitos ao endotélio. A Mac-1 é reconhecida como a Integrina mais relevante na maioria dos modelos de resposta inflamatória com participação de neutrófilos, com sítios de ligação específicos nas células endoteliais (WAGNER; ROTH, 1999). Na junção das células endoteliais, ocorre o processo de diapedese do neutrófilo, que, para chegar ao local de injúria tecidual, se move em direção ao gradiente quimiotático gerado nesse local (DITTMAR *et. al.*, 2000).

A migração celular é um evento chave na resposta inflamatória de qualquer etiologia. Os neutrófilos circulantes migram em resposta aos mediadores quimiotácteis liberados no sítio de lesão, como os componentes do sistema complemento (C5a), os produtos derivados da via das lipo-oxigenases (LTB4) e as quimiocinas (COUSSENS; WERB, 2002). Grande parte destes agentes quimiotáticos, *CXIL-8*, fMLP, LTB4 e C5a, ligam-se aos neutrófilos por receptores transmembrana específicos. Estes receptores ativam as proteínas G triméricas, nos neutrófilos, iniciando, deste modo, a sinalização que permitirá a essas células migrarem para os sítios inflamatórios. As quimiocinas, subdivididas em quatro famílias (CXC, CC, C e CX3C), de acordo com a seqüência de resíduos de cisteína, podem controlar a evolução natural da resposta inflamatória, recrutando células efectoras específicas. Desta forma, a contínua produção de citocinas no sítio inflamatório torna-se importante para o desenvolvimento de uma doença crônica, incluindo neoplasias (WAHL; KLEINMAN, 1998). A *CXIL8* foi originalmente identificada como um pequeno peptídeo (8KDa) produzido por monócitos, que promovia a quimiotaxia e ativação de neutrófilos. É considerada uma citocina com atividades proinflamatórias por induzir à quimiotaxia, o metabolismo oxidativo dos neutrófilos (*burst*) e à migração de neutrófilos do compartimento vascular para o local da inflamação. Todavia em pacientes com AIDS, as drogas antiretrovirais aumentam a quimiotaxia de neutrófilos e monócitos e reduzem a incidência de infecções (MASTROIANNI *et. al.*, 1999). Além de microorganismos, a remoção de células em apoptose também ocorre por fagocitose (FRANK, WHITE; EZEKOWITZ, 1999). A *CXIL-8* pode também estimular a liberação de ânion superóxido, enzimas lisossômicas e ativar a expressão de integrinas que facilitam a diapedese. A *CXIL-8* também possui algum efeito quimiotático sobre os linfócitos T (GESSER *et. al.*, 1995; Gainet *et. al.*, 1998).

1.3 Radicais livres

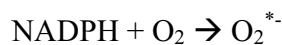
Os radicais livres são definidos como qualquer espécie química capaz de existir de forma independente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados. Por isso, são muito reativos e atacam biomoléculas, como lipídeos, proteínas e DNA. Dentre os radicais livres, podemos destacar dois grupos: as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN). As ERO mais importantes são o ânion superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e o oxigênio singlete. O óxido nítrico e o peroxinitrito constituem as principais ERN (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Os radicais livres são gerados em processos de oxidação biológica. A redução do oxigênio à água forma radicais livres intermediários, e o ânion superóxido é o primeiro radical livre formado nesse processo. Na cadeia respiratória mitocondrial, 5% do oxigênio utilizado não é completamente reduzido à água, e ocorre a formação de ânion superóxido. Essa ERO é muito reativa e é removida rapidamente pela enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), formando peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio forma o radical hidroxila e não existe nenhuma enzima que o remova. Por isso, as enzimas que decompõem o peróxido de hidrogênio, como a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPX), são tão de extrema importância para os seres vivos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; CADENAS e DAVIES, 2000). Os radicais livres são gerados em muitos processos fisiológicos e exercem funções importantes no organismo. Eles participam da atividade bactericida, de processos de sinalização celular e estão envolvidos na síntese e regulação de algumas proteínas, em condições fisiológicas (WARD e PETERS, 1995; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Podem provocar reações em cadeia e causar, como já ressaltamos, dano a um grande número de moléculas podendo atacar proteínas, principalmente nos resíduos de cisteína, estas proteínas podem sofrer alterações na sua conformação e perda na sua função. O DNA também pode ser alvo de ataque de radicais livres (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

1.4. *Burst* oxidativo e Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). Papel da mieloperoxidase (MPO)

Uma série de eventos metabólicos ocorre quando os fagócitos (neutrófilos, monócitos e eosinófilos) são ativados, iniciando-se um processo de respiração não mitocondrial que resulta na produção inicial de radical ânion superóxido que leva à produção de outras ERO suficiente para ultrapassar a capacidade antioxidante local, favorecendo o que chamamos de *burst* oxidativo (CADENAS, E.; DAVIES, K.J., 2000; BONDY, S.C.; LE BEL, C. P., 1993; MATHY HARTERT *et. al.*, 1998).

Durante o *burst* oxidativo ocorre aumento do consumo de oxigênio e da produção de ERO, uma vez que esses eventos dependem da atividade de uma oxidase de membrana que catalisa a redução monovalente do oxigênio a radical ânion superóxido, usando como doador NADPH (BABIOR, 1999).

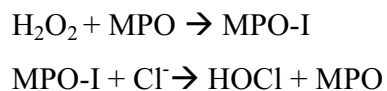
A formação do radical ânion superóxido é o primeiro passo para a ação microbicida de neutrófilos ativados



Depois por dismutação espontânea ou por ação catalítica, via superóxido dismutase (SOD) do radical ânion superóxido o peróxido de hidrogênio é gerado.



Este último é o co-substrato da mieloperoxidase neutrofilica (MPO), que catalisa a oxidação de ânion cloreto ao potente germicida, ácido hipocloroso (WINTERBOURN, C.C.; VISSERS, M.C.M *et. al.*, 2000; KLEBANOFF, S.J., 1999),



Todos os passos da formação de HOCl estão representados a seguir na Figura 2.

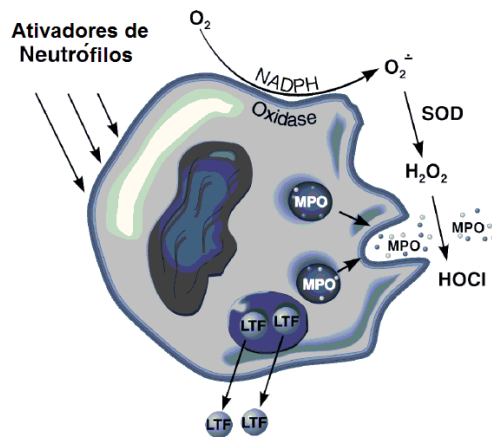
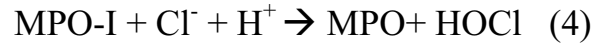


Figura 2: Ação da NADPH oxidase, Superóxido Dismutase (SOD) e mieloperoxidase (MPO) (BRENNAN *et. al.*,2003).

O peróxido de hidrogênio possui atividade bactericida somente em altas concentrações e sua remoção da célula ocorre principalmente por ação de enzimas antioxidantes, como catalase e glutatona peroxidase (FERREIRA, A.L.; MATSUBARA, L.S., 1997). Se por um lado, essas reações são vitais para a sobrevivência humana colaborando decisivamente na destruição de patógenos fagocitados, por outro, quando produzidas em excesso, têm sido relacionadas com o aparecimento de processos degenerativos das inflamações crônicas e as diversas patologias como a aterosclerose, envelhecimento, infarto, asma, mal de Alzheimer, diabetes, etc. (DOMAGALA-KULAWIK,2008; VELLOSA; BARBOSA; OLIVEIRA, 2007; KHALIL, 2005; GOUGEROT-PODICALO; ELBIM; CHOLLET-MARTIN, 1996; MOCATA; PILBROW *et. al.*, 2007; LEWANDOWSKI, 2006; MELANSON; GREEN, 2006; CADENAS; DAVIES, 2000; BONDY; LE BEL, 1993; GOLDBLUM; WU *et. al.*, 1985). Nesse contexto, destaca-se a MPO uma hemoproteína presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos, sendo secretada no meio extracelular e fagolisossomal e envolvida no sistema enzimático microbicida dessas células (ZUURBIER *et. al.*, 1992), além de exercer uma grande variedade de funções extracelulares (TOBLER e KOEFFLER, 1991; MATHESSON *et. al.*, 1981; HARRISON & SCHULTZ, 1976, PODREZ *et. al.*, 2000). Esta enzima está presente em quantidade considerável nos neutrófilos (5% do peso seco dessas células). Seu mecanismo da ação envolve a reação de sua forma férrica com H_2O_2 , levando a formação da MPO-I através da transferência de dois elétrons (ABU-SOUD e HAZEM, 2000). A MPO I pode oxidar íons Cl^- formando, como já vimos, o ácido hipocloroso

(HOCl) sendo a única peroxidase conhecida, com essa propriedade. Esse ácido, por sua vez, também oxida outras biomoléculas, como taurina formando cloraminas. A MPO também pode oxidar vários substratos orgânicos através de transferências sucessivas de um elétron envolvendo os intermediários MPO I e MPO II, comportamento cinético clássico das peroxidases. (HAMPTON *et. al.*, 1998). O mecanismo das reações catalisadas pela MPO no neutrófilo está esquematizado na Figura 3. A MPO nativa é oxidada ao intermediário conhecido como composto I (MPO-I). Este intermediário é um poderoso agente oxidante e encontra-se dois níveis de oxidação acima da forma nativa (MPO). Ele pode oxidar o ânion cloreto e retornar à forma nativa (reações 1 e 4), conhecido como mecanismo clorinante; ou oxidar inúmeras substâncias através da transferência de um elétron por intermédio da formação do composto II (MPO-II) (reações 2 e 3), mecanismo peroxidativo:



Onde SH é um substrato peroxidado pela MPO

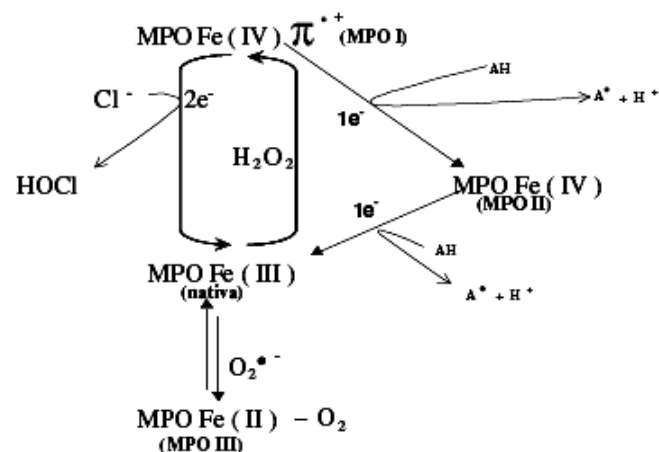


Figura 3: Mecanismo de ação catalítica da mieloperoxidase no “burst” oxidativo (Podrez *et. al.*, 2000).

O papel da MPO como uma promotora de danos tissulares por meio da produção de ácido hipocloroso está bem documentado. Este poderoso oxidante reage com duplas ligações de lipídios ocasionando uma peroxidação lipídica, o que leva ao aumento da permeabilidade de membranas

celulares. (SGARBI, M.W.M; SILVA, B.A. *et. al.*,2006; HALLIWELL, B. ; GUTTERIDGE, J.M.C.,1993). Recentemente verificou-se, com grande repercussão na comunidade científica mundial, o fato de que o nível sérico da MPO mostrou ser o melhor biomarcador preditivo de acidentes cardiovasculares, inclusive quando o nível de troponina sérica está dentro do valor normal (LEWANDOWSKI, E.C.,2006; MELANSON, S.E.F.; GREEN S.M.,2006; ASKARI, A.T; BRENNAN, M.L *et. al.*,2003). Estes achados reforçam a importância dessa enzima na gênese de processos inflamatórios crônicos. Talvez um dos melhores exemplos disso seja o envolvimento desse oxidante na aterogênese. De fato, é largamente conhecida e aceita a hipótese da modificação oxidativa da lipoproteína de baixa densidade (LDL) na origem e progressão do processo aterosclerótico. A MPO é uma enzima chave neste processo, onde através da geração de ácido hipocloroso pode iniciar processos oxidativos como a geração da 3-clorotirosina, que tem sido reportada como uma “impressão digital” do envolvimento da MPO em processos patológicos. A presença deste aminoácido oxidado já foi detectada em LDL isolada em lesões ateroscleróticas em humanos. (SHAO, B.; ODA, M.N. *et. al.*.2006).

Os efeitos deletérios da MPO se estendem à lipoproteína de alta densidade (HDL), que tem um papel fundamental na proteção contra a formação da aterosclerose, pela remoção do excesso de colesterol das células das artérias. Foi demonstrado que HDL promove o efluxo de colesterol, fosfolipídio e outras moléculas lipofílicas do interior para a superfície das células através de um transportador ativo na membrana. Na superfície, estes lipídios interagem com a apolipoproteína A1 (apoA-1) que constitui até 70 % do conteúdo protéico da HDL levando a solubilização e gerando partículas de HDL, que se dissociam das células. Um trabalho recente mostrou elevados níveis de 3-clorotirosina em HDL extraído de tecido aterosclerótico. Além disso, a ApoA-1 oxidada (pela MPO) tornou-se menos capaz de promover o efluxo de colesterol em culturas de células. Deste modo, estes dados apontam para a possibilidade da MPO promover aterogênese, não só mediante a oxidação da LDL, mas também dificultando a remoção de colesterol nas paredes das artérias por meio da inativação da ApoA-1 (ORAM, J.F.; BERGT, C. *et. al.*,2004). Extracelularmente o HOCl é citotóxico e parece ser um dos fatores principais na destruição de tecidos em condições inflamatória crônica, tais como artrite reumatóide e enfisema pulmonar (MATHESON *et. al.*, 1981). Dessa forma, a MPO é uma enzima intensamente expressa durante a ativação neutrofílica, com múltiplas ações aterogênicas e relacionada com a

desestabilização da placa aterosclerótica sendo preditora de eventos adversos em indivíduos saudáveis, coronariopatas ou em investigação de dor torácica (BALDUS *et. al.*, 2003).

Existem inúmeras condições no organismo, patológicas ou não, onde podemos observar o aumento de neutrófilos circulantes. Dentre as causas não patológicas, destaca-se o tabagismo (BAIN, B. J., 2007, REPINE, J.E.; BAST, A. *et. al.*, 1997), A contagem de neutrófilos de tabagistas está aumentada na proporção direta da exposição ao tabaco. Indivíduos que fumam dois maços por dia possuem uma contagem média, duas vezes superior aos valores médios normais (ZOLOKAR; RICHARD e CLAUDE, 1981). A neutrofilia é, também, um importante indicador da gravidade de várias doenças, destacando-se entre elas o aumento de incidência de patologias cardiovasculares em fumantes, podendo ocorrer também em não fumantes, no entanto, sem se saber, até o momento, exatamente qual o mecanismo desta relação de causa e efeito (DOMAGALA-KULAWIK, J., 2008). A alta contagem leucocitária é, também, um conhecido fator de risco de doenças circulatórias na população de meia idade e em jovens (NIETO, 1992; LOWE, 1985; FRIEDMAN, 1974). Um estudo com 586 fumantes, demonstrou aumento significativo da média dos leucócitos em relação à não fumantes, inclusive em fumantes passivos. (BOVIL:BILD *et. al.* 2006). Esta associação leva a algumas teorias sobre a relação dos leucócitos e a aterosclerose: o aumento dos leucócitos pode aumentar fatores pró-inflamatórios do processo arteriosclerótico e/ou os leucócitos podem exercer papel ativo na evolução da doença vascular. Por outro lado, um estudo populacional de indivíduos cardiopatas usando como limite valores de 350 ng/mL da MPO no soro de 547 pacientes não tratados, 171 (31,3%) tiveram níveis maiores ou iguais a 350 ng/mL da MPO e 376 pacientes níveis menores que 350 ng/mL. As combinações entre morte e infarto não fatal foram significativamente menores nos pacientes com MPO sérica menor que 350 ng/mL. Depois de 72 horas, 14% dos pacientes com alta MPO sérica sofreram infarto não fatal ou faleceram, comparado com 5,1% dos pacientes com MPO sérica mais baixa ($p < 0,001$) (BALDUS, 2003). É crescente a evidência que as injúrias às células cardíacas observadas na síndrome coronariana aguda (SCA) não está relacionada apenas à ativação de plaquetas, mas também ao recrutamento e ativação de neutrófilos com conseqüente liberação de MPO no meio (BUFFON, 2002). A MPO pode oxidar lipoproteína de baixa densidade (LDL), propagando a recaptção pelos macrófagos, destas LDL oxidadas, perpetuando assim a formação de células “espumosas” (PODREZ, 2000). Além do mais a MPO mostrou-se capaz de ativar metaloproteinases e promover a desestabilização e ruptura da superfície da placa ateroscleróticas

(FU, 2001). A MPO também catalisa o consumo de óxido nítrico derivado no endotélio, reduzindo sua biodisponibilidade e prejudicando suas funções vasodilatadoras e anti-inflamatórias (Abu-Soud, 2000). Os neutrófilos demonstraram capacidade de liberar MPO na circulação coronariana, produzindo níveis séricos elevados em pacientes com angina instável e infarto agudo do miocárdio (IAM) (BALDUS, 2003). A nicotina (uma amina terciária, principal constituinte do tabaco) também está, reconhecidamente, relacionada como fator de risco para aterosclerose acelerada e morte súbita. Ela é causadora de oxidação de desoxinucleosídeos da adenina, guanina e citosina, **dependente** de HOCl, sendo capaz de aumentar cerca de nove vezes a mais a quantidade de 5-clorouracila que seriam geradas por macrófagos ativados (MASUDA; SUZUKI; FRIESEN *et. al.*, 2001; PRUTZ, 2001; PRUTZ, 1998). Esta 5-clorouracila é captada por células e tecidos de mamíferos e é transformada ao seu correspondente desoxinucleosídeo (5-clorodesoxiuridina (ClDU)) pela timidina fosforilase (GOTTO; BELKHODE; TOUSTER, 1969; PAL; CUMMING; WALTON *et. al.*, 1981) podendo induzir a senescência celular, uma vez que a ClDU muda a expressão de proteínas da matriz nuclear (MICHISHITA; MATSUMURA; KURAHASHI; *et. al.* 2002a, MICHISHITA; MATSUMURA; SUZUKI; *et. al.*, 2002b). O tabagismo, mesmo sendo categoricamente indicado como fator de risco cardiovascular pelas pesquisas epidemiológicas e observacionais, ainda não teve seu mecanismo de ação completamente esclarecido. Ainda se discute os mecanismos celulares e moleculares da influência do fumo sobre o sistema imunológico, os quais não estão completamente esclarecidos.

Uma questão que se apresenta é que, estariam essas condições patológicas observadas em tabagistas, relacionadas com um aumento da MPO neutrofílica exógena e/ou endógena e não somente devido ao aumento do número de neutrófilos circulantes nestes indivíduos? Seria, portanto, de considerável interesse clínico-laboratorial, a avaliação da atividade peroxidásica da MPO nos neutrófilos de tabagistas, determinando-se suas duas atividades: clorinante e peroxidativa, bem como a sua quantificação sérica, comparando-se os dados obtidos com um grupo não tabagista, dados esses ainda não reportados na literatura.

2. OBJETIVOS

2.1. Avaliar as diferenças quantitativas na série branca (leucograma) entre tabagistas e não tabagistas.

2.2. O tabagismo é capaz de provocar neutrofilia. Avaliar se esse aumento seria acompanhado do aumento sérico de MPO ou não.

2.3. Pelas mesmas razões, avaliar se ocorre aumento de Interleucina-8 sérica entre os indivíduos tabagistas, visto ser esta interleucina secretada pelos neutrófilos.

2.4. Verificar se o tabagismo é capaz de alterar a atividade peroxidativa e/ou clorinante da MPO intracelular de neutrófilos de indivíduos tabagistas.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 MATERIAL

3.1.1 Equipamentos

- Centrífuga Excelsa Baby II modelo 206-R (Fanem)
- pHmetro modelo B-374 (Micronal)
- Balança analítica digital modelo AB 204 (Mettler Toledo).
- A água deionizada utilizada no preparo das soluções foi de qualidade analítica resistividade 18,2 $\mu\Omega$ a 25°C, obtida pelo sistema MilliQ .
- Espectrofotômetro de varredura de 230 a 600nm, USB 400 da Oceanic, acoplado a um microcomputador Pentium core 2 due com software da Oceanic.
- Leitor de Microplacas marca Titertek Multiskan
- Contador eletrônico de 22 parâmetros da marca Coulter, modelo STKS.
- Sonicador de pulso (Sonics & Materials Inc.)

3.1.2 Reagentes

Folin Ciocalteu da MERCK; Gelatina Pura da MERCK; Guaiacol SIGMA Chemical Co.; 3,3',5,5'Tetrametilbenzidina (TMB) SIGMA Chemical Co.; Catalase; da SIGMA Chemical Co.

3.1.2.1 Tampão Acetato

Seu preparo foi realizado segundo metodologia descrita por (MORITA e ASSUMPÇÃO, 2003a)

3.1.2.2 Tampão de Sorensen

Seu preparo foi realizado segundo metodologia descrita por (MORITA e ASSUMPÇÃO, 2003b)

3.1.2.3 Tampão PBS-D

Seu preparo foi realizado segundo metodologia descrita por (DYPBUKT *et. al.*, 2005; DULBECCO & BABIOR, 1981).

3.1.2.4 PBS-Taurina

Seu preparo foi realizado segundo metodologia descrita por (PESKIN e WINTERBOURN, 2006; DYPBUKT *et. al.*, 2005; DULBECCO & BABIOR, 1981).

3.1.2.5 Solução de Gelatina

Para seu preparo foi pesado 2,5 g de gelatina, 0,819g de NaCl, transferido para um balão volumétrico e completado pra 100 mL com água Milli-Q.

3.1.2.6 Kit InnoZyme Calbiochem para determinação da atividade da MPO

As concentrações séricas de MPO (ng/mL) foram realizadas em duplicata, seguindo o protocolo do fabricante.

O Kit é composto de:

- Uma microplaca de poliestireno com 96 poços revestidas com anticorpo humano contra mieloperoxidase.
- Um frasco com padrão de MPO com 100 µg/mL.
- Um frasco com 50 µL de Peróxido de Hidrogênio a 30% (100X).
- Um frasco com 1 mL de TMB.
- Um frasco com 5 mL de tampão de ensaio.
- Um frasco com 25 mL de tampão da amostra (20X).
- Um frasco com 12 mL de solução de parada de ELISA a 2,5N H₂SO₄.
- Dois selantes de placa.

Preparo do reagente: Na hora do uso todos os reagentes foram ambientados a temperatura de 15-25°C.

Tampão de amostra (1X): O tampão de amostra do kit foi diluído 1:20 adicionando-se 25 µL de tampão de amostra em 475 µL de água destilada.

Padrão de Mieloperoxidase (1 µg/mL): Diluiu-se o padrão de MPO 1:100 adicionando-se 5 µL de padrão a 495 µL de tampão da amostra (1X) para obter uma concentração de 1 µg/mL, mantida em banho de gelo até o uso. As diluições foram obtidas seguindo a tabela 1 abaixo.

	Concentração de MPO	Padrão (1 µg/ml)	Tampão de Amostra (1X)
A	100 ng/ml	50 µL	450 µL
B	80 ng/ml	40 µL	460 µL
C	60 ng/ml	30 µL	470 µL
D	40 ng/ml	20 µL	480 µL
E	20 ng/ml	10 µL	490 µL
F	10 ng/ml	5 µL	495 µL
G	5 ng/ml	2.5 µL	497.5 µL
H	0 ng/ml (Blank)	0 µL	500 µL

Tabela 1: Volume de padrão e tampão utilizado para os padrões de MPO.

Peróxido de Hidrogênio (0,3%): Diluímos o H₂O₂ (30%) 1:100 adicionando 5 µL de H₂O₂ (30%) em 495 µL de água destilada.

Reagente de detecção TMB: Foi preparado na hora de uso.

7,16 mL de água destilada

2 mL de tampão de ensaio

0,8 mL TMB

40 µL H₂O₂ (0,3%)

Agitamos três vezes por três segundos.

Preparo do reagente: Na hora do uso todos os reagentes foram ambientados a temperatura de 15-25°C.

3.1.2.7 Kit Elisa de quantificação de CXIL8 humana sérica, RayBiotech

As concentrações séricas de CXIL8 (pg/mL) foram realizadas em duplicata, seguindo o protocolo do fabricante.

O Kit é composto de:

- CXIL-8 microplaca (Item A): 96 poços (12 tiras x 8 poços) revestidas com anticorpos monoclonais contra a CXIL-8.
- Tampão de Lavagem Concentrado (20x) (Item B): 25 mL da solução 20x concentrada.
- Padrão de CXIL8 Humana (Item C): 2 frascos, CXIL-8 humana recombinante.
- Diluente de Ensaio A (Item D): 30 mL, 0,09% azida de sódio como conservante. Para Padrão / Amostra (soro / plasma) de diluente.
- Detecção de anticorpos CXIL-8 (Item F): 2 frasco de anti-IL biotilado humano-8 (cada frasco é suficiente para ensaio de meia microplaca).
- HRP-Estreptavidina concentrado (ponto G): 8 µl de 30.000 x HRP concentrado de estreptavidina conjugada.
- Substrato Reagente de um passo TMB (ponto H): 12 mL de 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) em solução tampão.
- Solução de parada (item I): 8 mL de 2 Mol/L de ácido sulfúrico.

Protocolo nº4 do Kit RayBio® HumanCXIL-8 ELISA

1- Diluição da amostra: Se as amostras precisassem ser diluídas, utilizamos o diluente de Ensaio A (Item D) para diluir soro ou plasma

2. Diluente B deve ser diluído 5 vezes com água deionizada ou destilada.

3. Preparação do padrão: Resumidamente agitamos o frasco do item C e em seguida, adicionamos 800 µl de Diluente de Ensaio A (soro / plasma) no frasco do Item C para preparar um padrão a 50 ng/mL. Dissolvemos o pó completamente através de uma agitação suave e adicionamos 10µL do padrão CXIL-8 do frasco Item C, em um tubo com 823,3 µl de Diluente de Ensaio A para preparar uma solução padrão a 600 pg / ml. Pipetar 400 µl de Diluente de Ensaio A em cada tubo. Use a solução-mãe padrão para produzir uma série de diluição Figura 4. Misture cada tubo cuidadosamente antes da

próxima transferência. Delicadamente utilizamos a pipeta para misturar. O diluente de ensaio serve como padrão de zero (Branco) (0 pg/mL).

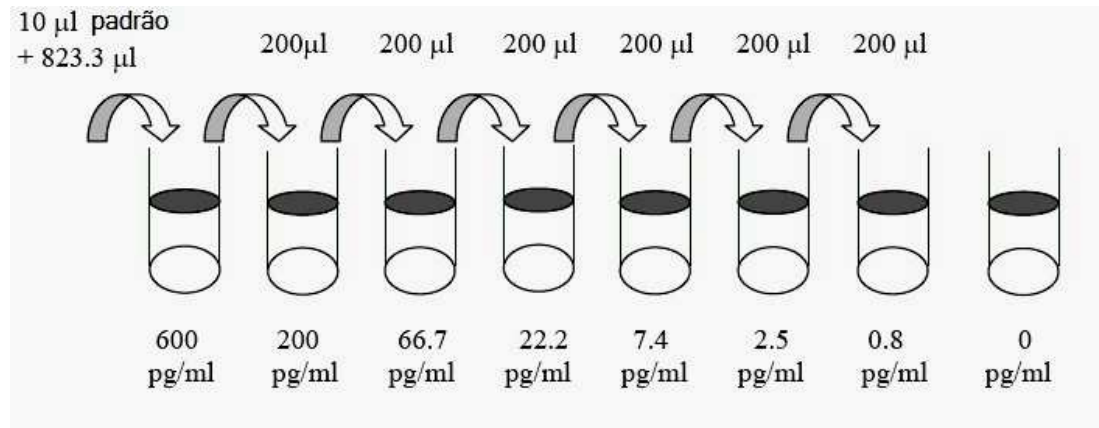


Figura 4: Esquema de diluição seriada para curva padrão do Kit RayBio® Human CXIL-8 ELISA

4. Se o Tampão concentrado de lavagem (20x) (Item B) contiver cristais visíveis, à temperatura ambiente, agitar suavemente até dissolução. Diluir 20 mL de Tampão concentrado de lavagem em água destilada ou desionizada para produzir 400 mL de tampão de lavagem 1X.

5. Antes de usar o frasco de detecção de anticorpos (item F), o mesmo deverá ser agitado. Adicionamos 100 µL de 1x Diluente de ensaio B no frasco para preparar um anticorpo de detecção de concentrado. Homogenizamos suavemente com o auxílio da pipeta. O concentrado de detecção de anticorpos deve ser diluído 80 vezes com 1x o Diluente de ensaio B.

6. Agitar o frasco de concentrado HRP-Estreptavidina (item G) e homogenizar suavemente com auxílio da pipeta. A HRP-Estreptavidina concentrada deve ser diluída 30.000 vezes com 1x Diluente de ensaio B.

Preparo do reagente: Na hora do uso todos os reagentes foram ambientados a temperatura de 15-25°C.

3.1.2.8 Determinação de proteína

Protocolo de determinação da proteína pelo protocolo de Hartree modificado por Lowry, padronizado com Albumina Humana. Foram preparadas três soluções com os seguintes reagentes:

Solução A - 2g de Tartarato de sódio e potássio

100g de Na_2CO_2 , dissolvidos em 500mL de NaOH 1 Mol/L e diluídos com água Milli-Q para um litro.

Solução B- 2g de Tartarato de sódio e potássio

1g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, dissolvidos em 90mL de água e 10mL de NaOH 1 Mol/L foi adicionado.

Solução C- 1 volume do reagente Folin-Ciocalteu diluído em 15 volumes de água Milli-Q. Esta solução (preparada diariamente) deveria estar entre 0,15 Mol/L e 0,18 Mol/L quando titulada para pH 10 com NaOH 1 Mol/L. Se a acidez fosse superior a 0,18 Mol/L deveria ser ajustada com NaOH.

3.1.2.9 Líquido de Lazarus (contagem de leucócitos)

Utilizado para hemólise das hemácias e contagem de polimorfonucleares

Ácido acético glacial 3% (3mL)

Violeta genciana a 1% (2mL)

Água destilada q s p 100% (100mL)

3.1.2.10 Cloreto de amônio (NH_4Cl) (solução hemolizante)

0,83% NH_4Cl em H_2O

3.1.2.11 Solução de Guaiacol 200 mM

A solução foi preparada dissolvendo-se 223,6 μL de guaiacol em 10 mL de tampão Sorensen pH 7,1.

3.1.2.12 Soluções estoque de enzima e substratos:

3.1.2.12.1 Solução estoque de 3,3',5,5' – tetrametilbenzidina (TMB)

Preparamos a solução estoque 14 mM pesando-se a massa adequada e dissolvendo-se em 10 % Dimetilformamida (MARQUEZ; DUNFORD, 1997).

3.1.2.12.2 Solução estoque de peróxido de hidrogênio

Preparamos a solução estoque 100 mM por diluição em água à partir de uma solução H₂O₂ 30%, e calculamos sua concentração espectrofotometricamente conforme o coeficiente de extinção molar: $\epsilon_{240\text{ nm}} = 43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (DESSER, 1972).

3.1.2.12.3 Solução mãe de Guaiacol em Sorensen a 100mM.

Guaiacol 1,099mL q.s.p. 100mL de Sorensen pH 7,1 a 20°C.

3.1.2.12.4 Solução de ácido hipocloroso

Preparamos uma solução de HOCl em água e sua concentração foi determinada espectrofotometricamente ($\epsilon_{292\text{ nm}} = 350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em NaOH 0,1 Mol/L) (BRESTEL, 1985).

3.2 MÉTODO

3.2.1 Casuística

Foram constituídos dois grupos voluntários para o estudo, selecionados entre os doadores de sangue do Hemonúcleo Professora Clara Pechmann Mendonça da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

Grupo 1 (estudo): constituído por vinte indivíduos tabagistas (12 mulheres e 8 homens), maiores de 20 anos e menores de 67 anos com média de 43 anos, triados clinicamente para a doação e sem uso de medicação relatada.

Grupo 2 (controle): constituído por vinte indivíduos não tabagistas (11 homens e 9 mulheres), maiores de 20 anos e menores de 67 anos com média de 33 anos, triados clinicamente para a doação e sem uso de medicação relatada.

De cada voluntário foi coletado 12 mL de sangue por punção venosa, em 2 tubos vacutainer-EDTA (4 mL cada tubo) e 1 tubo seco vacutainer (4 mL) para coleta de sangue total sem aditivos e posterior obtenção de soro. Sendo que um tubo de EDTA foi utilizado para a realização do hemograma completo e o outro tubo para separação de neutrófilos para determinação da produção de HOCl por mg de proteína (via clorinante) e velocidade de oxidação do guaiacol, realizada se com restrição de íons cloreto (via peroxidativa) dos neutrófilos. O tubo seco, após centrifugação e obtenção do soro foi utilizado para determinar a atividade sérica da MPO (ng/mL) e CXIL8 (pg/mL). O hemograma completo do sangue total coletado em EDTA foi realizado em contador eletrônico de 22 parâmetros da marca Coulter, modelo STKS, da disciplina de Hematologia do Laboratório de Análises Clínicas Professor Antônio Longo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

3.2.2 Separação de Neutrófilos.

Foi feita por gradiente de densidade de gelatina (LUCISANO e MANTOVANI, 1984 b).

O tubo de Sangue + EDTA 3 mL foi centrifugado por 20 minutos a 550 G (1800 RPM r=16 cm) a 25 °C, removemos o plasma e a camada mononuclear de cima dos eritrócitos com ajuda de uma pipeta Pasteur. Adicionamos uma solução de salina com 2,5 % de gelatina 2:1 (gelatina: sangue) volume a volume, levamos a banho Maria a 37 °C por 30 min, logo após adicionamos 3 mL PBS D 37 °C e centrifugamos 200 G 10 min (1050 RPM r=16cm) para evitar a solidificação da gelatina e remover excesso de gelatina, ressuspendemos em uma solução hemolisante a 0,83 % NH₄Cl em água pH 7,2 por 5 min, centrifugamos a 480 G 10 min 37 °C (1500 RPM r=16cm). Este procedimento foi repetido por três vezes, depois lavamos com PBS D gelado 4 graus centrifugar 200 G 10 min 4 °C (1050 RPM r=16cm) e ressuspendemos em PBS D em igual volume da amostra inicial, contamos a suspensão de células em câmara de Neubauer que foram armazenadas em criotubos e congeladas em freezer a - 80° C, para posterior análise (Figura 5).

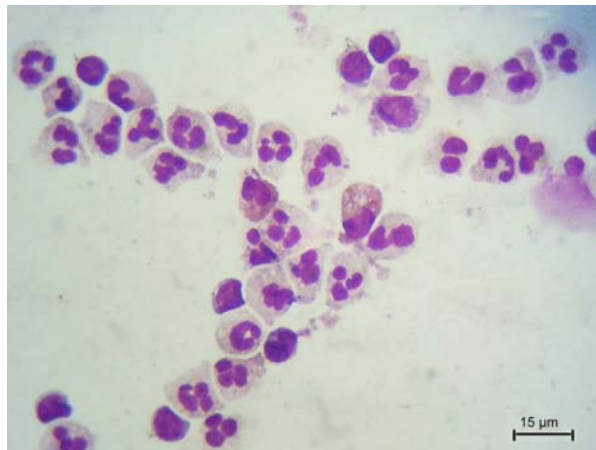


Figura 5: Polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos, após metodologia de separação por solução de gelatina a 2,5% em salina (cerca de 85% das células).

3.2.3 Dosagem de proteínas das células suspensas em Sorensen pelo método de Lowry-Hartree (HARTREE, 1972)

Como as suspensões de células em PDB-D que continham o mesmo número de células poderiam variar individualmente em relação à quantidade de proteína devido às variações individuais dos pacientes e sendo a MPO uma proteína, foi necessário um método para avaliar a quantidade de proteínas das suspensões de células para que todos os dados fossem comparados

não por número de células e sim pela concentração de proteínas em cada amostra, para isso uma metodologia para dosagem de proteína teve que ser padronizada, baseada na metodologia de Lowry- Hartree . O resultado desse procedimento pode ser observado na Figura 6.

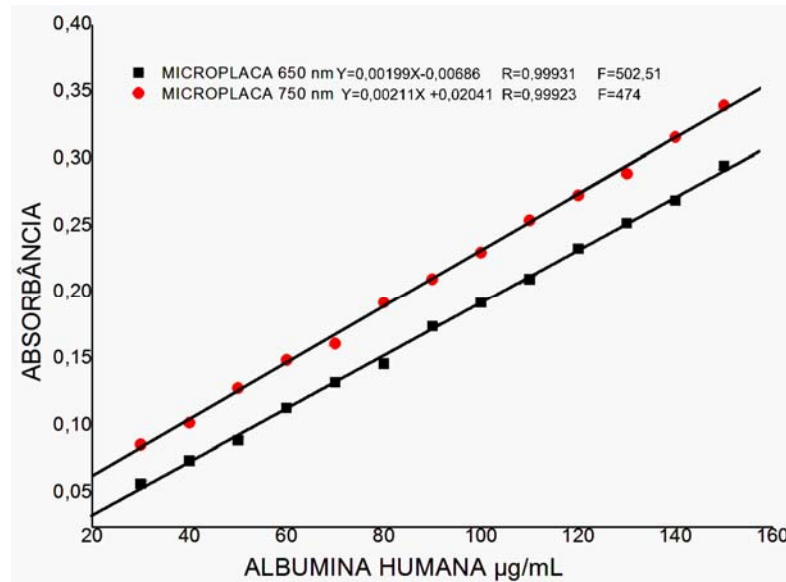


Figura 6: Padrão de albumina humana com equação da reta de regressão linear e fator a 650 nm e 750 nm.

3.2.4 Kit InnoZyme da Calbiochem para atividade da MPO

As concentrações séricas de MPO (ng/mL) foram realizadas em duplicata, seguindo o protocolo do fabricante. Na figura 15 podemos observar a curva padrão do método.

Adicionamos 100 µL de padrão de MPO diluído em seu respectivo poço em duplicata, 100 µL de branco (composto apenas por tampão de amostra (1X)) em duplicata e 100 µL das amostras diluídas 1:2 em tampão de amostra em duplicata.

Cobrimos a placa com o selante e incubamos a temperatura ambiente por 1 hora com agitação gentil.

Lavamos a placa quatro vezes com 400 µL de tampão de amostra (1X), cada lavagem seguida pelo descarte por inversão na pia, batendo a placa em uma toalha de papel absorvente para remover o líquido residual.

Adicionamos 100 µL de solução de uso TMB em cada poço e incubamos de 20 a 30 minutos a 37°C.

A reação foi interrompida com a solução de parada ELISA (H_2SO_4 2 Mol/L) em cada poço para parar o desenvolvimento de cor.

A absorbância foi lida a 450 nm.

Sensibilidade:

A atividade mínima detectada, determinada como a concentração de MPO da média dos valores de dez amostras contendo apenas diluente menos dois desvios padrão foi 0,33 ng/mL.

Espectro de ensaio: 5 a 100 ng/mL (determinado pelo fabricante)

Após a realização do teste obtivemos a curva padrão do Kit em nossas condições de trabalho, bem como o fator do ensaio.

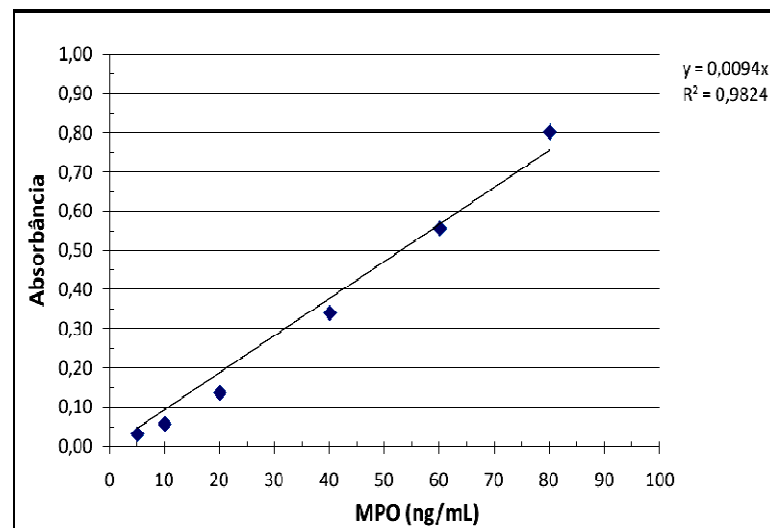


Figura 7: Curva do padrão de MPO do Kit Innozyme Calbiochem, fator ($F = 106,4$).

3.2.5 Kit Elisa de detecção da CXIL8 plasmática humana RayBiotech®

A Interleucina-8 (*CXIL-8*) é um membro da subfamília alfa (CXC) de quimiocinas chamadas CXCL8. Em resposta a estímulos pró-inflamatórias conhecidos como quimiocinas, *CXIL-8* é produzida por monócitos, macrófagos, neutrófilos e *CXIL-8* promove quimiotaxia e degranulação dos neutrófilos. Os 72 aminoácidos 8 kDa produzida através do processamento de uma proteína precursora de 99 aminoácidos *CXIL-8* é a forma predominante secretada por monócitos e linfócitos (ROFSTAD; HALSOR, 2002)

O RayBio ® Human *CXIL-8* ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) é um kit para a medição quantitativa de *CXIL-8* humana no soro, plasma, sobrenadantes de cultura de

células e de urina. Este ensaio emprega um anticorpo específico para *CXIL-8* humana revestida em uma placa de 96 poços. Padrões e amostras são pipetados nas cavidades e as *CXIL-8* presentes em uma amostra ligam-se aos poços pelo anticorpo imobilizado. Os poços são lavados com biotina e anticorpo anti-*CXIL-8* humana é adicionado. Depois de lavar o anticorpo biotinilado desvinculado, HRP conjugado a estreptavidina é pipetado nos poços. Os poços são novamente lavados, uma solução de substrato TMB é adicionada e a cor se desenvolve na proporção da quantidade de *CXIL-8* vinculado. A Solução de parada muda a cor de azul para amarela e a intensidade da cor é medida a 450 nm.

PROCEDIMENTO DE ANÁLISE:

1. Todos os reagentes e amostras à temperatura ambiente (18 - 25 ° C) antes de usar.
2. Adicionar 100 µL de amostra ou padrão nos poços apropriados. Cubra bem e incubar por 2,5 horas em temperatura ambiente ou durante a noite a 4 ° C, agitando suavemente.
3. Eliminar a solução na pia e lave 4 vezes com solução de lavagem 1x. Lavar, preenchendo cada poço com tampão de lavagem (300µL), utilizando uma pipeta multi-canal ou uma lavadora automática. A remoção completa do líquido a cada passo é essencial para um bom desempenho. Após a última lavagem, remover qualquer restante tampão por aspiração ou decantação. Inverter a placa e seca-la contra toalhas de papel limpo.
4. Adicionar 100 µl de anticorpos biotinilados preparados 1x em cada poço.
5. Incubar durante 1 hora à temperatura ambiente, agitando suavemente.
6. Rejeitar a solução. Repetir a lavagem como no passo 3.
7. Adicionar 100 µL de solução Estreptavidina preparado em cada poço.
8. Incubar durante 45 minutos em temperatura ambiente, agitando suavemente.
9. Rejeitar a solução. Repetir a lavagem como no passo 3.
10. Adicionar 100 µL de Substrato reagente de um passo TMB (Item H) em cada poço.
11. Incubar durante 30 minutos em temperatura ambiente no escuro, agitando suavemente.
12. Adicionar 50 uL de Solução de Parada (Item I) em cada poço.
13. Ler a 450 nm imediatamente.

CURVA PADRÃO:

$$Y=0,87088X -1,07378 \text{ R}= 0,99962$$

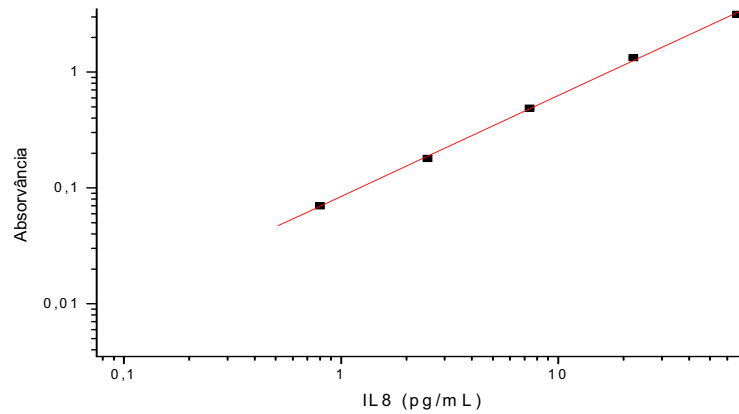


Figura 8: Curva padrão de CXIL8 do RayBiotech, determinando o fator 14,3

Sensibilidade: A dose mínima detectada de CXIL8 é menor que 1 pg/mL.

Reprodutibilidade: Intra ensaios CV<10%

Entre ensaios: CV<12%

Especificidade: Não ocorrem reações cruzadas com nenhuma das seguintes citocinas BDNF, BLC, ENA-78, FGF-4, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12 p70, IL-12 p40, IL-13, IL-15, IL-309, IP-10, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , Leptin (OB), MCP-1, MCP-2, MCP-3, MDC, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-1 δ , PARC, PDGF, RANTES, SCF, TARC, TGF- β , TIMP-1, TIMP-2, TNF- α , TNF- β , TPO, VEGF).

3.2.6 Atividade Peroxidativa com Guaiacol

Para seu preparo foi realizado utilizando metodologia descrita por CAPEILLÈRE-BLANDIN, C., 1998, (Figura 9).

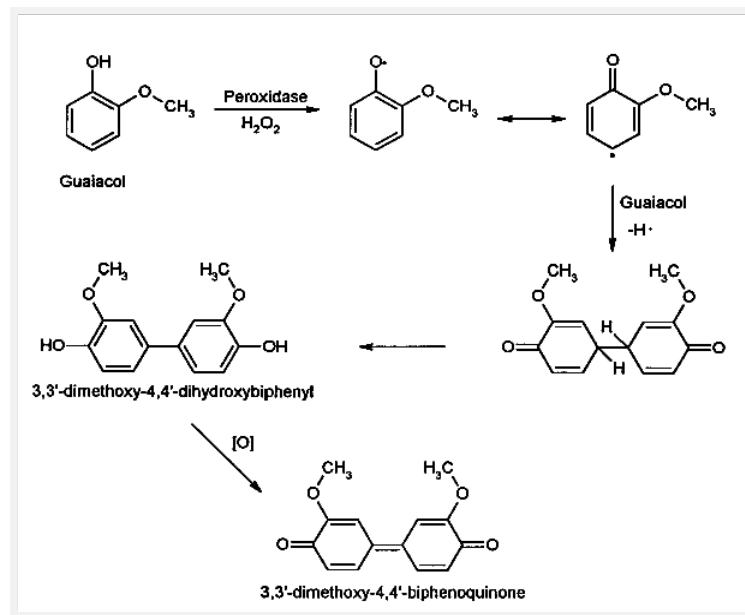


Figura 9: Mecanismo proposto para formação de produtos coloridos provenientes da oxidação do guaiacol (DOERGE et.al, 1997).

Essa metodologia utiliza peróxido de hidrogênio com uma concentração de 25 a 300 μM , medida, monitorando a absorvância a 240nm usando $\epsilon_{240}=43,6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 13,4mM de guaiacol e 20nM de MPO purificada em 20mM de tampão fosfato a 20°C durante os primeiros 30 segundos, medindo a formação de guaiacol oxidado determinada por um aumento da absorvância em 470nm usando $\epsilon_{470}=5,58\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ em duplicata, com o passar do tempo o produto formado é decomposto, apresentando é máximo após 30 segundos, sem evidência de formação de outro produto após 10 segundos de reação, após 60 segundos a absorvância começa a diminuir, como mostra a figura 10 abaixo. (DOERGE et.al, 1997)

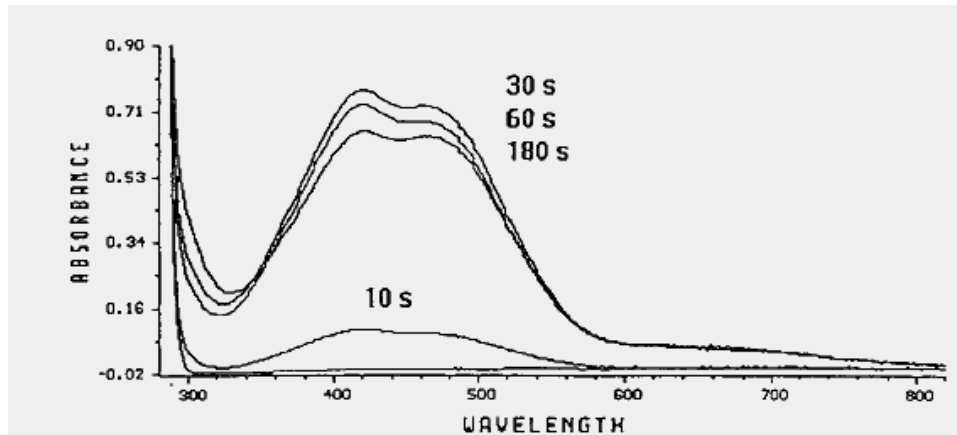


Figura 10: Espectrofotometria Ultravioleta-visível da oxidação do guaiacol (DOERGE et.al, 1997)

3.2.7 Produção de HOCl pela MPO pelo teste de clorotaurina em tetrametilbenzidina (TMB) (DYPBUKT; BISHOP, BROOKS *et. al.*, 2005).

A Atividade clorinante foi obtida com a taurina incubada com a suspensão de neutrófilos, a presença de MPO, peróxido de hidrogênio e íons cloreto, através do ácido hipocloroso causa a cloração da taurina, o excesso de peróxido foi removido com catalase e a capacidade clorinante da clorotaurina foi medida através da oxidação da 2,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) promovida pela taurinacloramina durante 3 minutos a 412 nm. Como indica a Figura 11.

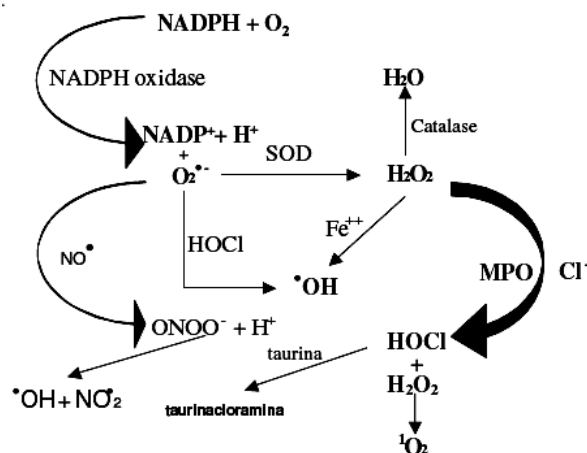


Figura 11: Esquema de formação da tarinacloramina pela MPO (HAMPTON *et. al.*, 1998).

Durante a produção de ácido hipocloroso pela MPO liberada pelos neutrófilos, a oxidação do TMB catalizada pelo iodeto apresentou, quantitativamente, os mesmos resultados que reações utilizando TNB. Dado a natureza simples deste ensaio, ele se torna ideal para medição quantitativa da geração de ácido hipocloroso por neutrófilos. Apenas 2.10^5 células já produzem um bom sinal em uma microplaca de 96 poços, um número menor de células que seriam necessárias, caso utilizássemos o ensaio de Diidrorodamina. Os ensaios já descritos têm vantagens consideráveis em comparação com os métodos existentes para medir a atividade da mieloperoxidase ou a produção de ácido hipocloroso por neutrófilos. Ensaio para mieloperoxidase que envolvem a oxidação direta por atividade peroxidase clássica com substratos como TMB, guaiacol e dianisidina não são específicos para a mieloperoxidase, e são incapazes de distinguir de outras peroxidases. Uma grande vantagem do uso de taurina para interceptar o ácido hipocloroso gerados pela MPO é que ao invés de detectá-lo diretamente, a taurina serve como um intermediário que não interfere com a atividade da enzima. Este não é o caso de cromóforos que reagem com o ácido hipocloroso. Todos eles são potenciais substratos da enzima. Como consequência, se cromóforos estão presentes, enquanto a enzima está produzindo ácido hipocloroso, esses são susceptíveis de reagir com mieloperoxidase e interferir com a sua atividade de cloração e acabam inibindo essa atividade da MPO.

3.2.8 Análise Estatística

Os dados são apresentados como média aritmética \pm s.e.m. Correlações entre duas variáveis foram pesquisadas por análise de regressão linear. A análise estatística dos dados foram realizadas por meio de teste t de Student (comparações simples) em todas as amostras normais com excessão da capacidade clorinante e peroxidativa dos neutrófilos que foi realizada pelo teste de Mann - Whitney *rank sum test* (comparações simples). O método de Dunnett (testes não-paramétricos) foi usado para identificar conjuntos de dados que diferem dos dados do controle, valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos. Todos os valores de p foram determinados a partir de experimentos realizados em duplicata. A análise estatística foi realizada utilizando o software estatístico SigmaStat (Jandel Scientific GmbH, Erkrath, Alemanha).

4. RESULTADOS

4.1 COMPARAÇÃO DOS HEMOGRAMAS DE INDIVÍDUOS FUMANTES E NÃO FUMANTES

Em anexo se encontram as séries brancas dos hemogramas dos pacientes com o número absoluto e relativo de células (Tabela 3 e Tabela 4), bem como as atividades clorinantes e peroxidativas dos grupos (Tabela 5 a Tabela 8).

4.1.1 Leucócitos totais.

Neste estudo, foram avaliados 40 indivíduos, sendo estes 20 indivíduos tabagistas e 20 indivíduos não tabagistas. O leucograma dos indivíduos tabagistas apresentou 8355 leucócitos/ μL em média, valor estatisticamente superior ($p < 0,001$) no teste t de Student, ao grupo não tabagistas, 6545 leucócitos/ μL , (Figura 12), alteração esta comum em tabagistas (OGAMA, *et al.*, 1998). Um estudo realizado entre 1967 a 1972 com 7206 homens franceses entre 43 e 53 anos, onde o risco de infarto do miocárdio, a média da contagem leucocitária e o tabagismo foram analisados, mostrou que a média de leucócitos dos não tabagistas era de 5740/ μL de sangue e entre os tabagistas, também com idades entre 43 e 53 anos, era de 7280/ μL de sangue ($p < 0,001$), (ZOLOKAR; RICHARD e CLAUDE, 1981)

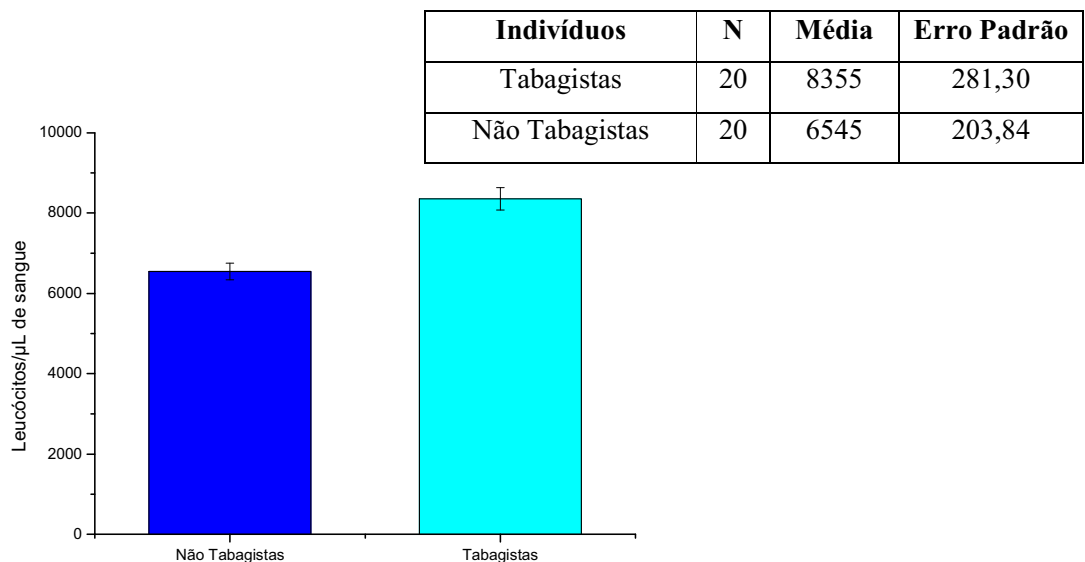


Figura 12 – Média e erro padrão dos leucócitos. ($p < 0,001$)

É possível que a contagem leucocitária seja um indicador melhor da exposição à fumaça do cigarro do que a própria contagem do número de cigarros tragados (ZOLOKAR; RICHARD e CLAUDE, 1981). A incidência de infarto do miocárdio aumenta diretamente com o aumento dos leucócitos, 10% dos homens que tiveram contagem média de leucócitos de 9000/ μ L de sangue ou maior, possuíam quatro vezes mais incidência de infarto de miocárdio que a observada em 50% dos homens com contagens abaixo de 6000/ μ L (95% de intervalo de confiança=2,5 a 7,8) (ZOLOKAR; RICHARD e CLAUDE, 1981).

4.1.2 Neutrófilos

É relatado, na literatura, que o número dos neutrófilos dos tabagistas também se encontra aumentado quando comparados com os não tabagistas (KNAAPEN; GUNGOR; SCHINS *et al.*, 2006; BEHERA; DASH e SEM, 1994; OGAMA, *et al.*, 1998). Em nosso trabalho os neutrófilos dos tabagistas apresentaram em média um valor de 4923/ μ L de sangue, e, para os não fumantes, 3690 neutrófilos / μ L, (Figura 13). Trata-se de um dado que indica uma das possíveis causas do grande aumento da MPO sérica de tabagistas em relação aos não tabagistas, encontrado em nosso trabalho, como vemos adiante.

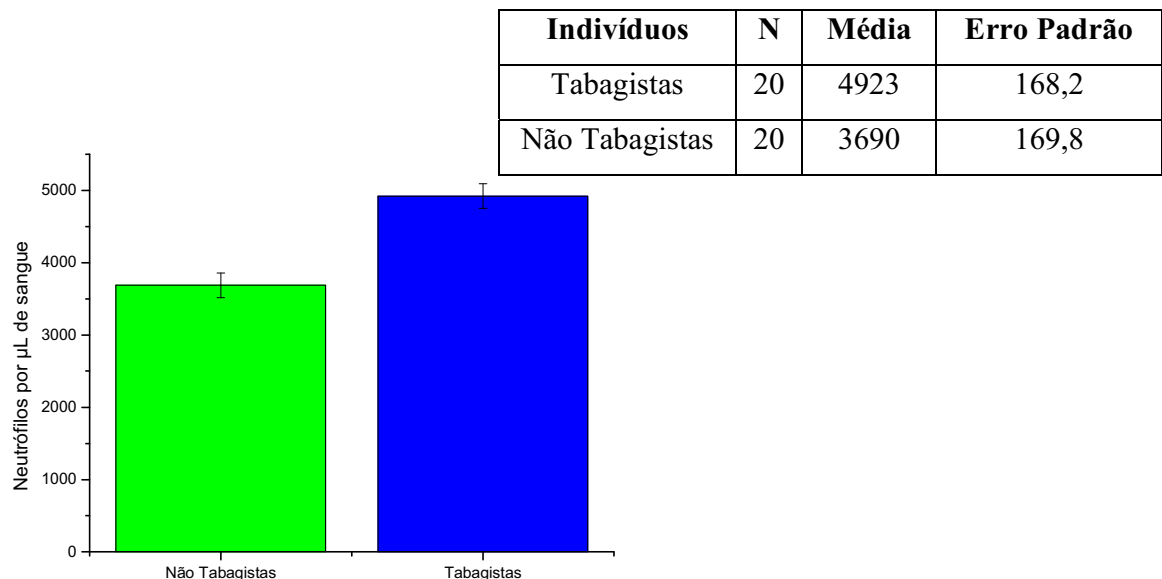


Figura 13 – Média e erro padrão dos neutrófilos dos indivíduos tabagistas e não tabagistas. ($p < 0,001$)

4.1.3 Monócitos

Monócitos e macrófagos exercem, provavelmente, importante papel nas lesões das doenças arterioscleróticas, oxidando lipídeos, liberando citotoxinas, ERO e fatores de crescimento. Monócitos ativados produzem Caliceína, considerada um dos primeiros fatores iniciadores de muitos eventos trombóticos. De fato, foi postulado que os monócitos podem ser o maior iniciador celular da trombose (BOVIL, 1996). Nossas amostras apresentaram diferença significativa entre o número de monócitos de fumantes e não fumantes (Figura 14).

Indivíduos	N	Média	Erro Padrão
Tabagistas	20	658	43,03
Não Tabagistas	20	465	30,81

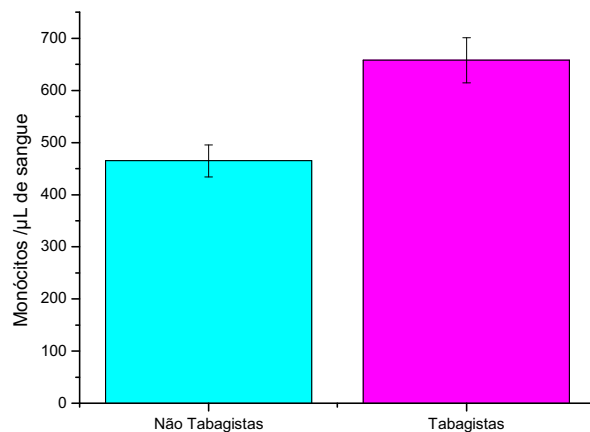


Figura 14 – Média e erro padrão dos monócitos dos indivíduos tabagistas e não tabagistas. ($p < 0,001$).

4.1.4 Linfócitos

Não houve diferença significativa entre as médias ($p>0,05$), (Figura 15).

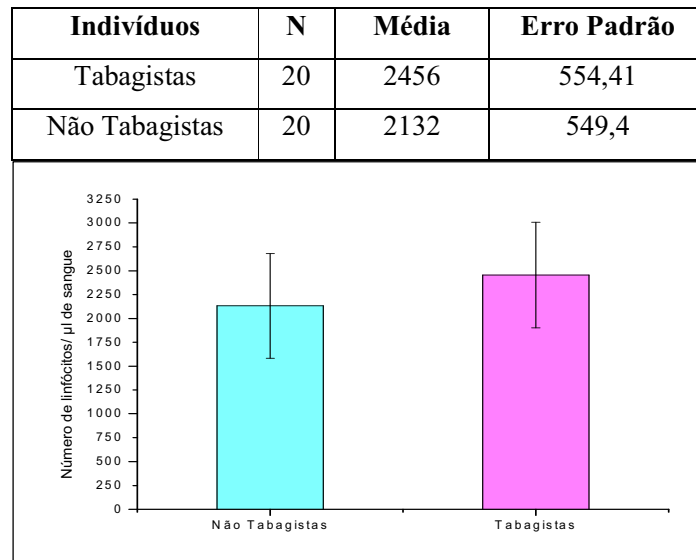


Figura 15 – Média e erro padrão dos linfócitos dos indivíduos tabagistas e não tabagistas.

4.1.5 Eosinófilos

Não houve diferença significativa entre as médias ($p>0,05$), (Figura16).

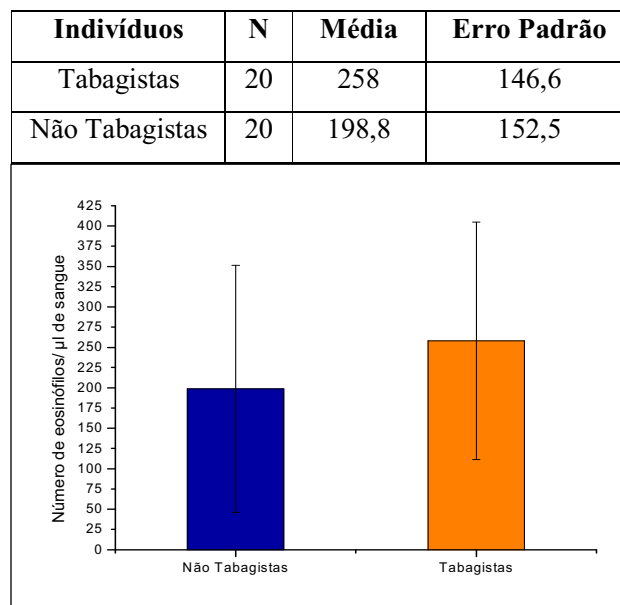


Figura 16– Média e erro padrão dos eosinófilos dos indivíduos tabagistas e não tabagistas.

4.1.6 Basófilos

Não houve diferença significativa entre as médias ($p > 0,05$), (Figura 17).

Indivíduos	N	Média	Erro Padrão
Tabagistas	20	60	55,96
Não Tabagistas	20	58,5	54,9

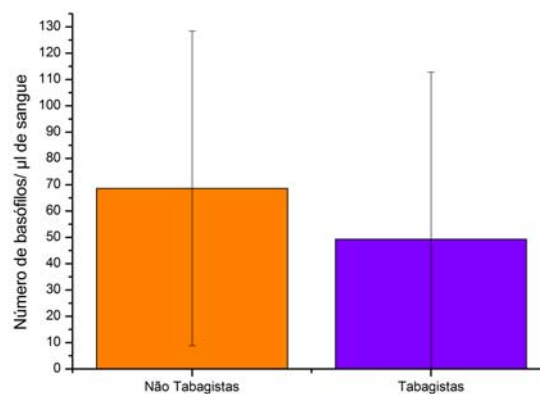


Figura 17– Média e erro padrão dos basófilos dos indivíduos tabagistas e não tabagistas.

4.2 Atividade sérica da MPO

A MPO sérica basal não é diferente na população total de estudos até aqui realizados em relação ao sexo e idade. Pacientes com síndromes coronarianas agudas, quando acompanhados pelos níveis de MPO séricos aumentados, indicam fortemente o aumento de risco de eventos cardiovasculares subseqüentes e ampliam as ferramentas para avaliar o prognóstico dessas patologias, quando comparado com os marcadores tradicionais. Esses estudos sugerem que a atividade sérica da MPO, pode servir como marcador e mediador de inflamação vascular, além de ressaltar a importância da ativação dos neutrófilos na fisiopatologia da síndrome coronariana aguda (BALDUS *et. al.*, 2003) e, também, predizer precocemente o risco de infarto do miocárdio com segurança de 30 dias a 6 meses antes do evento, mesmo na ausência de necrose do miocárdio, aumentando o potencial de ser usada como estratificador de risco entre pacientes que apresentam dores no peito (CAYLEY *et. al.*, 2004). Em outro estudo com 182 homens com

coronariopatia seguidos por dois anos mostrou que pacientes com valores de MPO $\leq 20,34$ pg/ μ L apresentaram taxa de sobrevivência ao infarto do miocárdio de 88%, e, entre pacientes com MPO $\geq 20,34$ pg/ μ L, apresentaram taxa de sobrevivência ao infarto do miocárdio de 74% ($p=0,0249$), (BRENNAN; PENN; LENTE; *et. al.*, 2003)

A média de MPO sérica entre os pacientes tabagistas foi de 66 pg/ μ L, enquanto a média de não fumantes foi de 22,68 pg/ μ L, Figura 18.

Indivíduos	N	Média	Erro Padrão
Tabagistas	20	66	5,61
Não Tabagistas	20	22,68	2,40

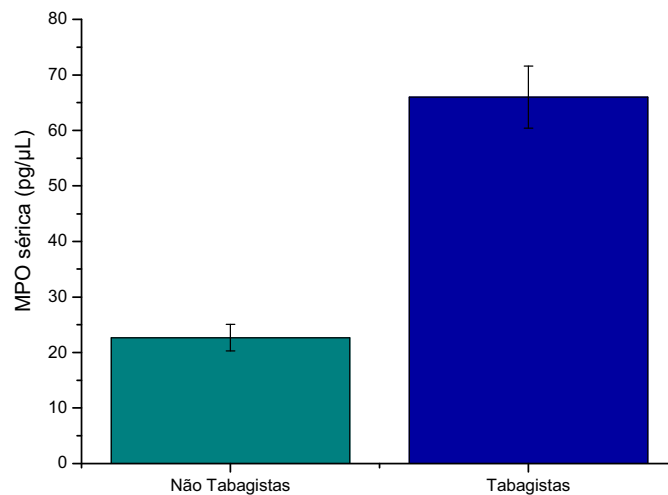


Figura 18- Média e erro padrão da concentração sérica de MPO (pg/ μ L) de indivíduos tabagistas e não tabagistas. ($p<0,001$).

4.3 Atividade sérica da MPO por célula

Ao dividirmos o nível sérico da MPO do indivíduo pela somatória das células produtoras de MPO (neutrófilos e monócitos), observamos que há diferença significativa ($p < 0,001$) entre o nível sérico de MPO por célula de tabagistas quando comparado com não tabagistas. Tabagistas possuem em média duas vezes mais MPO sérico por células que não tabagistas.

Indivíduos	N	Média	Erro Padrão
Não Tabagistas	20	$5,56 \cdot 10^{-3}$	$5,62 \cdot 10^{-4}$
Tabagistas	20	$12,36 \cdot 10^{-3}$	$1,34 \cdot 10^{-3}$

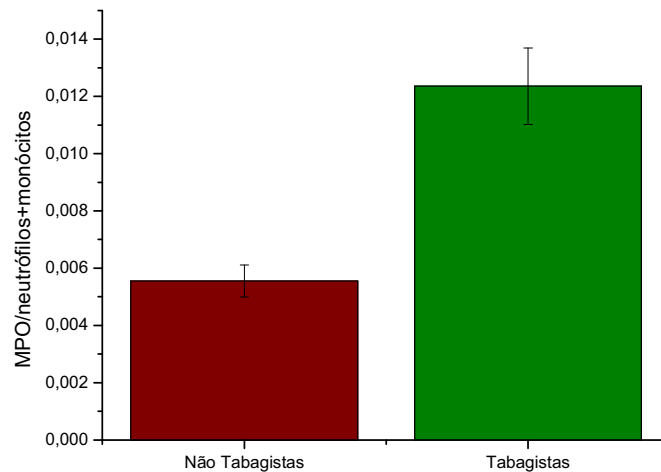


Figura 19- Média e erro padrão da concentração sérica de MPO (pg/μL) dividida por (neutrófilos + monócitos) de indivíduos tabagistas e não tabagistas. ($p < 0,001$).

4.4 Detecção CXIL8 sérica humana Kit Elisa RayBiotech

Os indivíduos apresentavam-se saudáveis antes do início das pesquisas, mesmo assim a concentração sérica de CXIL8 dos tabagistas mostrou ser cerca de 4 vezes maior que o dos não tabagistas.

Indivíduos	N	Média	Erro Padrão
Tabagistas	20	13,16	3,00
Não Tabagistas	20	3,01	0,82

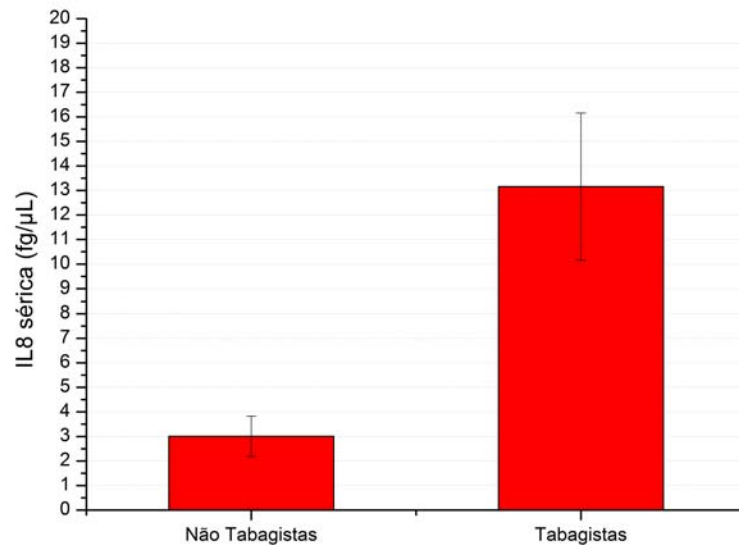


Figura 20- Média e erro padrão da concentração sérica de CXIL8 (fg/μL) de indivíduos tabagistas e não tabagistas. ($p < 0,001$).

4.5 Resultados da Via Peroxidativa

Na atividade peroxidativa segundo método proposto por Capeillère, este não utilizou extratos de polimorfonucleares para sua padronização da oxidação do guaiacol pela MPO, e sim MPO pura, portanto tivemos que padronizar a metodologia ao nosso trabalho.

O tampão precisou ser substituído, ao invés de PBS-D utilizamos o Sorensen, que se diferencia do tampão PBS-D apenas por não conter íons cloreto Cl^- , isso porque ao utilizarmos o tampão PBS-D observamos a diminuição da absorbância a 470 nm se comparado à mesma amostra analisada com o tampão Sorensen, como mostra a Figura 21 abaixo.

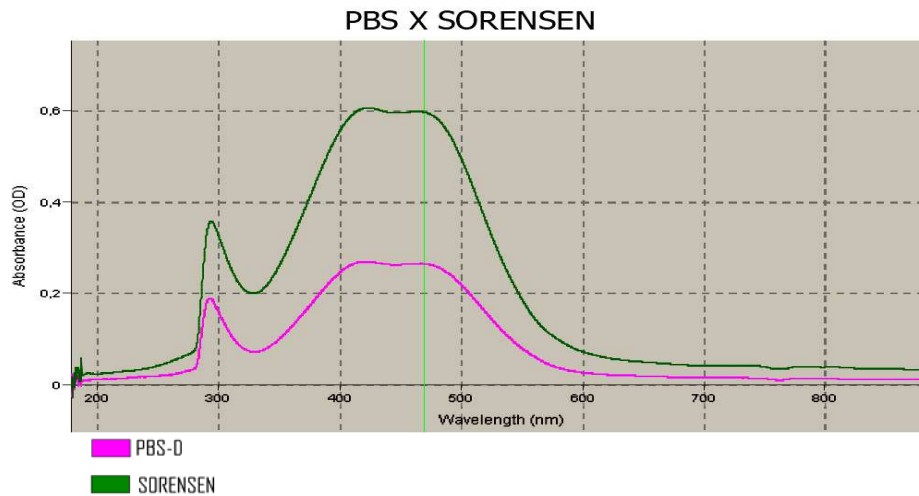


Figura 21: Espectrofotometria Ultravioleta-visível da oxidação do guaiacol utilizando-se PBS-D $A=0,262$ e Sorensen $A=0,594$.

Essa redução de absorvância se dá devido à competição que ocorre entre a oxidação, pelo composto I da MPO, do guaiacol e dos íons cloreto que formam respectivamente dímero de guaiacol com resíduos de quinona e ácido hipocloroso (HOCl), portanto para minimizar essa competição e medir preferencialmente a via peroxidativa de nossas amostras decidimos pela substituição do tampão, restringindo assim o Cl^- disponível.

Para testar a atividade peroxidativa em guaiacol, realizadas com suspensões de polimorfonucleares, foram feitas análises com várias concentrações de água oxigenada (H_2O_2), que variaram de $350\mu M$ a $800\mu M$ e de $12,5mM$ a $50mM$ de guaiacol mantendo a quantidade de amostra fixa em cada análise normalizada em $35,75\ \mu g$ de proteína e também pela concentração de $7,6 \cdot 10^5$ células. A partir de várias análises realizadas variando-se a concentração de guaiacol e de peróxido foi feito um gráfico de absorvância pelo tempo, a fim de determinar, quais seriam as condições ideais para que a enzima mieloperoxidase trabalhasse com excesso de substrato, na temperatura e pH ideais, pelo maior tempo possível e sempre em sua velocidade máxima. Os resultados dessas análises são apresentados no gráfico abaixo e demonstram que concentrações finais entre $400\mu M$ e $539\mu M$ de H_2O_2 e concentrações de guaiacol de $25\ mM$ a $50mM$ são ideais até 180 segundos, como demonstra a Figura 22 abaixo, portanto, para realização desse trabalho às condições determinadas das soluções iniciais de guaiacol será de $25\ mM$ a $50mM$ e de H_2O_2 entre $400\mu M$ a $539\mu M$.

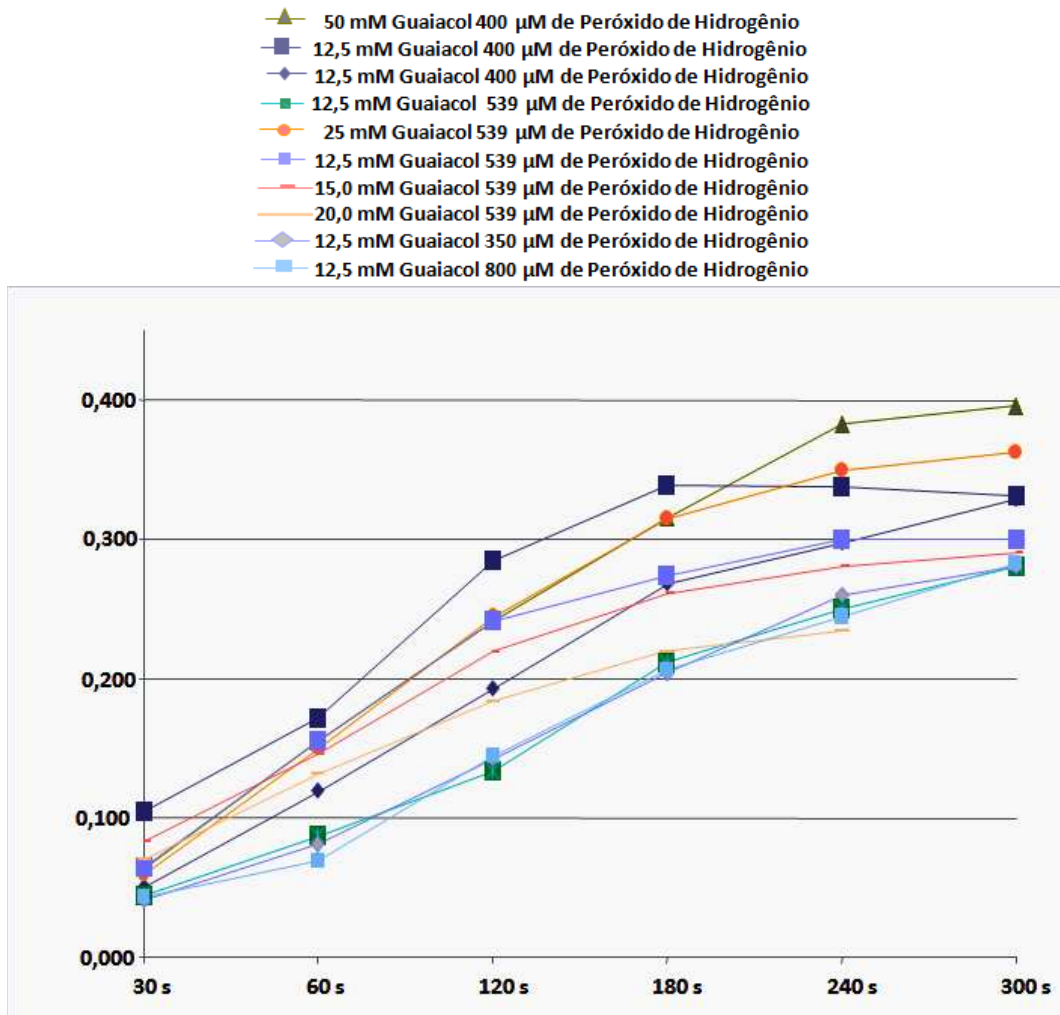


Figura 22: Espectrofotometria da oxidação do guaiacol com amostra fixa em $0,76 \cdot 10^5$ células ($35,75 \mu\text{g}$ de proteína) por reação.

Após determinarmos em suspensões de neutrófilos que as melhores condições de reação foram: guaiacol de 25 mM a 50 mM e de H_2O_2 entre $400\mu\text{M}$ e $539\mu\text{M}$, a quantidade de amostra foi variada, a fim de determinar qual seria a influência do aumento de amostra em nossas condições e até quando (tempo ideal de cinética), nossas condições seriam lineares (enzima trabalhando em sua velocidade máxima com substrato em excesso) para atividade da mieloperoxidase em suspensão de neutrófilos. Uma amostra foi então quantificada por número de células contadas em câmara de Neubauer e variou-se a concentração desta amostra de $0,76 \cdot 10^5$ células ($35,85 \mu\text{g}$ de proteína) a $22,8 \cdot 10^5$ células ($107,26 \mu\text{g}$ de proteína) por reação, para isso fixou-se as condições do experimento em 50mM de guaiacol e $400\mu\text{M}$ H_2O_2 . A Tabela 2 abaixo

indica quantas células foram usadas por reação e quanta proteína representa essa quantidade de células e a Figura 23 indica a variação da absorbância pelo tempo das condições fixas variando-se o número de células.

Número de Células	µg de proteína na reação
$0,76 \cdot 10^5$	3,59
$1,52 \cdot 10^5$	7,16
$2,28 \cdot 10^5$	10,73
$3,04 \cdot 10^5$	14,31
$3,80 \cdot 10^5$	17,88
$4,56 \cdot 10^5$	21,46
$5,32 \cdot 10^5$	25,03
$6,08 \cdot 10^5$	28,60
$6,84 \cdot 10^5$	32,18
$7,60 \cdot 10^5$	35,75
$11,4 \cdot 10^5$	53,63
$15,2 \cdot 10^5$	71,51
$19,0 \cdot 10^5$	89,38
$22,8 \cdot 10^5$	107,26

Tabela 2: Número de células e µg de proteínas correspondentes

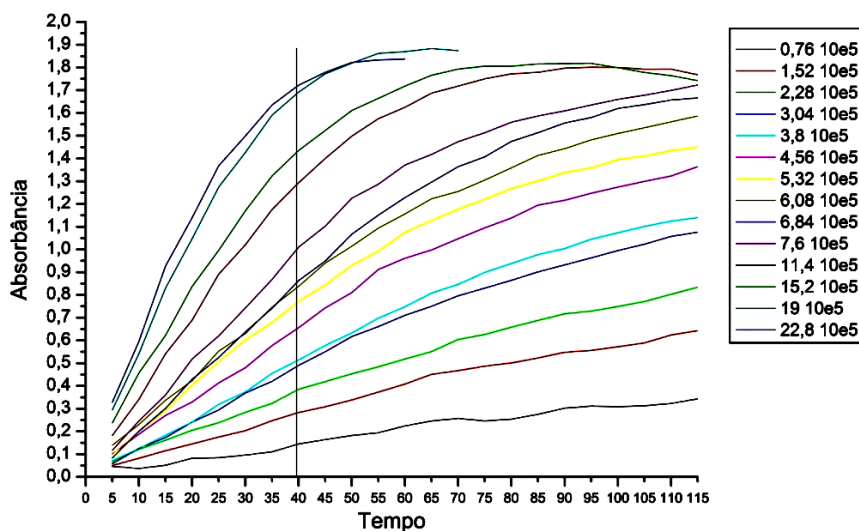


Figura 23: Espectrofotometria Ultravioleta-visível da oxidação do guaiacol, fixando-se o guaiacol e H_2O_2 e variando-se a amostra.

A partir da análise do gráfico pudemos observar que em **até 40 segundos de reação temos condições lineares** de $0,76 \cdot 10^5$ células (35,75 μg de proteína) à $22,8 \cdot 10^5$ células (107,26 μg de proteína). Esses dados indicam os valores que devemos trabalhar em relação ao limite de tempo de reação e quantidade de células e/ou proteínas por experimento.

Após análise pudemos avaliar que não houve diferença significativa entre as médias (Figura 24).

Indivíduos	N	Média	Erro padrão
Tabagistas	20	$3,42 \cdot 10^{-4}$	$8,775 \cdot 10^{-5}$
Não Tabagistas	20	$3,5 \cdot 10^{-4}$	$7,177 \cdot 10^{-5}$

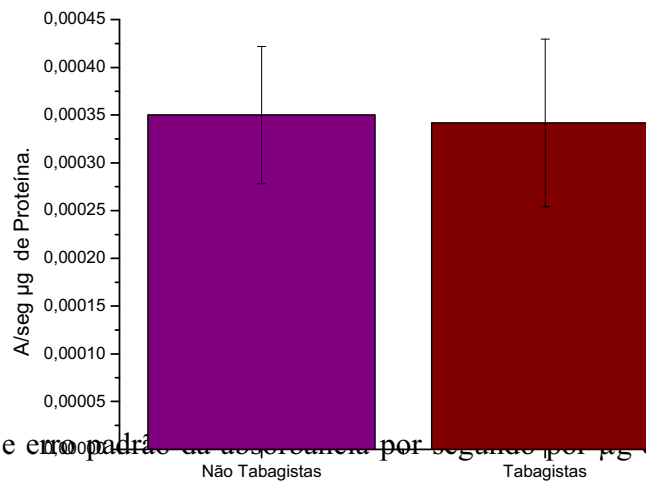


Figura 24- Média e erro padrão da absorção por segundo por μg de proteína dos indivíduos tabagistas e não tabagistas. ($p > 0,05$)

4.6 Resultados da Via Clorinante

Além da padronização do fator e das condições de reação da Clorotaurina com o TMB observamos que o aumento da quantidade de proteína causou uma diminuição na atividade oxidativa da clorotaurina, a Figura 25 demonstra que quanto mais proteína na amostra, menor é a concentração em μM HOCl formado por mL de amostra em 1 minuto. Fato este explicado devido ao aumento da atividade redutora dos aminoácidos e sua grande concentração no meio, capaz de causar interferência na reação (HAWKINS, PATTISON e DAVIES, 2003). Devido a isso todas nossas amostras foram diluídas com tampão PBS-D taurina e glicose para que sempre ficassem com a concentração igual ou menor a 375 μg de proteína por mL de amostra para que não houvesse interferência da proteína no teste.

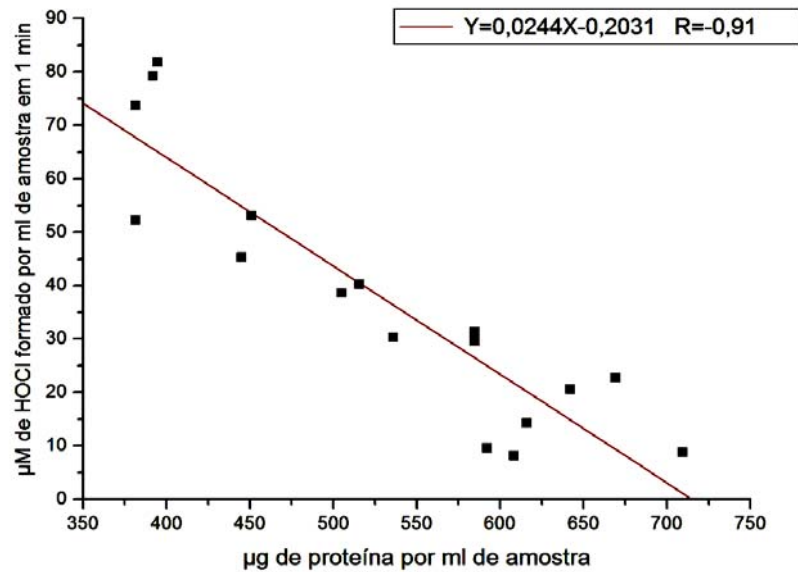


Figura 25: Espectrofotometria Ultravioleta-visível da oxidação do TMB pelo ácido hipocloroso, demonstrando menor formação de HOCl

Quanto maior a concentração de proteína por mL de amostra. Após realização dos testes avaliamos que não houve diferença significativa entre as médias. Figura 26

Indivíduos	N	Média	Erro Padrão
Tabagistas	20	0,0586	0,00445
Não Tabagistas	20	0,0775	0,02767

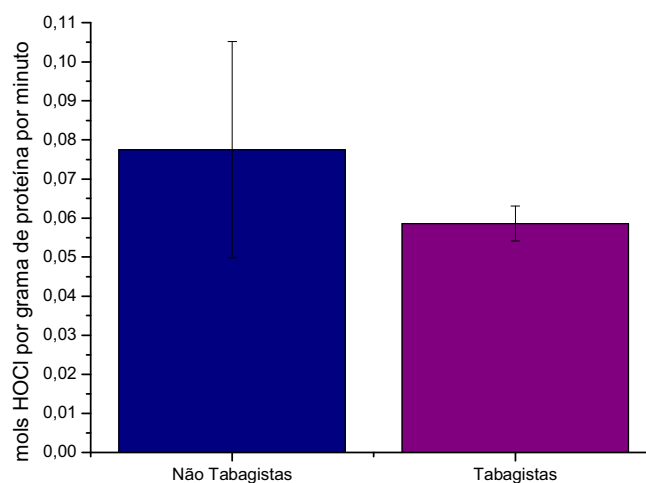


Figura 26 – Média e desvio padrão da produção em mols de HOCl por grama de proteína por minuto de reação dos indivíduos tabagistas e não tabagistas. ($p>0,05$)

5 DISCUSSÃO

A leucocitose é a principal alteração imunológica observada no sangue circulante de indivíduos fumantes e essa leucocitose se deve principalmente ao aumento do número de neutrófilos (neutrofilia). Essa neutrofilia também pode ser observada na secreção brônquica e nas biopsias dos bronquíolos desses indivíduos tabagistas (GORSKA, KRENKE, DOMAGALA-KULAWIK *et. al.*, 2008).

O número de neutrófilos do sangue periférico correlaciona-se positivamente com a intensidade do hábito, assim, fumantes apresentam aumento do número de neutrófilos diretamente proporcional ao número de cigarros consumidos. Fumantes que abandonam o hábito e estão abstinentes por menos de cinco anos, ainda apresentam leucometria e neutrofilia elevadas em relação aos indivíduos não fumantes. Somente após cinco anos os valores de leucócitos totais e neutrófilos tendem a atingir valores encontrados em população saudável que nunca fumaram (PARRY, COHEN, SCHLARB, *et.al.* 1997). No presente trabalho encontramos, também, entre os indivíduos fumantes, um número significativamente aumentado de leucócitos totais, neutrófilos e monócitos em relação a indivíduos do grupo controle (não fumantes) conforme pode ser observado nas figuras 12, 13 e 14 e nas tabelas 3 e 4 em anexo.

A monocitose junto com a linfocitose (em menor escala) também compõe o quadro hematológico de indivíduos tabagistas, quadro esse conhecido há já bastante tempo (BRIDGES, WYATT, & REHM, 1985)

A causa da neutrofilia entre fumantes não foi ainda totalmente elucidada, porém, observou-se recentemente, que a nicotina, um dos principais constituintes do tabaco, parece estar implicada na indução de neutrófilos a produzirem CXIL8, a qual é, reconhecidamente, uma poderosa citocina quimio-atratora e também estimuladora da ativação de neutrófilos. A interleucina 8 causa uma moderada neutrofilia e o seu nível no sangue de tabagistas é diretamente proporcional ao número de cigarros consumidos por esses indivíduos (IHO; TANAKA; TAKAUJI; *et. al.*, 2003). O mecanismo pelo qual a nicotina estimula a produção de Interleucina 8 parece estar ligado à estimulação de receptores nicotínicos de Acetilcolina (nAChRs) via geração de peroxinitrito e subsequente ativação da via NF-Kappa B (IHO; TANAKA; TAKAUJI; *et. al.*, 2003). Recentemente, também se constatou cabalmente que células dendríticas quando

expostas a nicotina e constituintes oxidantes do tabaco; liberam interleucina 8 (VASSALLO; KROENING; PARAMBIL; KITA, 2008).

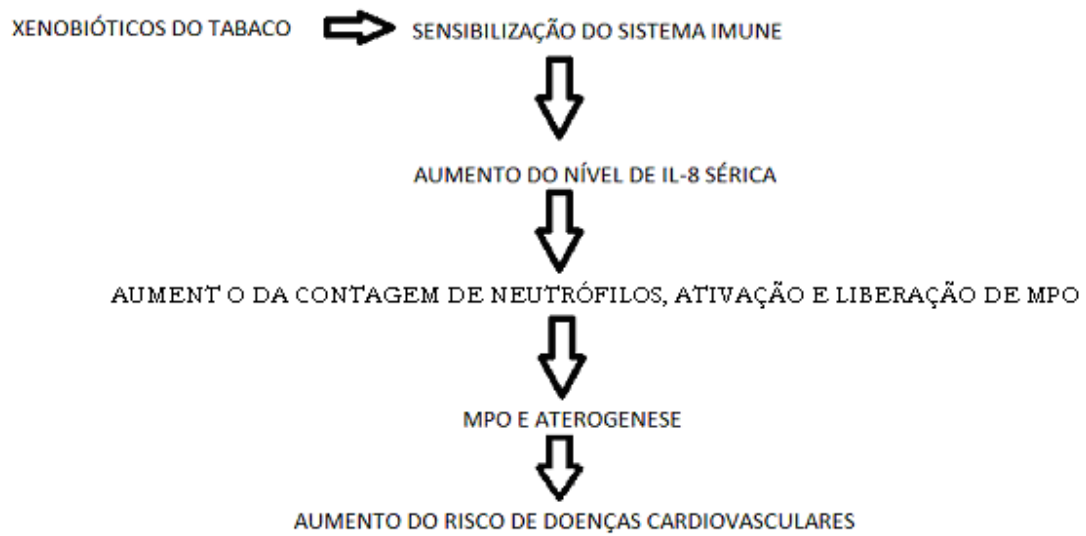
O hábito de fumar crônico também estimula a produção da medula óssea, aumentando o tamanho dos compartimentos mitóticos e pós-mitóticos de neutrófilos, reduzindo ainda, o tempo de armazenamento dessas células na medula óssea e, conseqüentemente, liberando neutrófilos já maduros e funcionais para o sangue periférico (TERASHIMA; WIGGS; ENGLISH; HOGG; VAN EEDEN, 1997).

Nossos resultados corroboram esses dados da literatura, pudemos constatar uma concentração cerca de quatro vezes superior de CXIL8 em fumantes, comparados com os resultados do grupo controle (não fumante) como pode ser observado na figura 20. Em relação ao número de cigarros fumados ao dia a média de nosso trabalho foi de 18 cigarros/dia por 21 anos, com o mínimo 3 cigarros/dia e o máximo 40 cigarros/dia, fumantes pesados são aqueles que fumam acima de 40 cigarros/dia (ZOLOKAR; RICHARD e CLAUDE, 1981) nosso trabalho foi com fumantes moderados e mesmo assim notamos significativa alteração na IL8 e MPO sérica, com $p < 0,001$ em ambos casos, todos os efeitos deletérios da alta concentração de IL8 e MPO tendem a ser intensificados pelo aumento do número de cigarros ao dia e o tempo de exposição ao tabaco, em relação a este tempo de exposição notamos uma tendência de fumantes moderados que fumam por mais tempo possuem maior MPO e IL8 sérica do que fumantes pesados que fumam a menos tempo, indicando que o tabaco possui efeito acumulativo.

A mieloperoxidase (MPO) que constitui cerca de 5% do peso seco dos neutrófilos (SCHULTZ; KAMINKER, 1962), parece desenvolver um papel crucial na aterogênese (SHAO; ODA; ORAM et.al., 2010; CHANTEPIE; MALLE; SATTLER; et.al, 2009; VAN DER VEEN; DE WINTHER; HEERINGA, 2009). O ácido hipocloroso (HOCl) produto endógeno, catalizado pela oxidação do íon cloreto pela MPO, tem sido implicado como um dos mais importantes intermediários reativos envolvido na oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), fenômeno esse, confirmado como um dos eventos mais precoces na gênese da aterosclerose (SPICKETT, 2007; LAU & BALDUS, 2006). O transporte essencial do colesterol pelas lipoproteínas de alta densidade (HDL) também pode ser comprometido, uma vez que essa lipoproteína é um alvo, *in vivo*, de um processo oxidativo mediado pela MPO, levando a diminuição das suas capacidades cardioprotetora e anti-inflamatória (SHAO; ODA; ORAM et.al., 2010; UNDURTI; HUANG; LUPICA; et.al, 2009; MALLE; MARSCHE; PANZENBOECK; et.

al.; 2006). Da mesma forma, a MPO também impede o efluxo do colesterol dependente do transportador ABCA-1 pela oxidação de resíduos de metionina e cloração de tirosina em sítios específicos da apolipoproteína A-1 (SHAO; ODA; *et. al.*. 2006). Além disso, níveis elevados de MPO estão intimamente associados com disfunção endotelial (BALDUS; HEESCHEN; MEINERTZ; *et. al.*; 2003) e o infarte do miocárdio está frequentemente associado com leucocitose e especialmente, com contagens elevadas de neutrófilos no sangue periférico (GREEN; VOWELS; *et. al.*; 1996). A influencia do tabagismo na saúde humana é ainda um problema importante em todo o mundo. No nosso trabalho, pela primeira vez, demonstramos que indivíduos fumantes apresentam um nível aumentado de MPO sérico quando comparados com não fumantes (Figura 18). Esse resultado se correlaciona perfeitamente com o numero de neutrófilos aumentados e o alto nível de interleucina 8, que caracterizam os indivíduos tabagistas. Além dos valores séricos de MPO, avaliamos também a atividade dessa enzima em neutrófilos lisados dos grupos estudados, com a intenção de obtermos a atividade de MPO por μg de proteína (mieloperoxidase endógena). Os resultados obtidos (Figuras 24 e 26) indicam uma pequena diminuição da mesma no “pool” de neutrófilos dos indivíduos tabagistas (diferença não significativa em relação aos não tabagistas). Essa diminuição endógena poderia estar correlacionada com o aumento sérico observado da MPO, mas, teria que ser confirmada com um aumento do número de experimentos, pois como já mencionamos a diferença não foi significativa.

O Esquema 1, apresenta nossa proposta para a correlação entre o hábito de fumar, o aumento da contagem de neutrófilos e de sua ativação, o aumento de MPO sérico e finalmente o aumento das doenças coronarianas em indivíduos fumantes.



Esquema 1 – Proposta de correlação entre tabagismo, neutrofilia, aumento do nível sérico de MPO e aumento de doenças coronárias entre indivíduos fumantes.

6 CONCLUSÕES

6.1.O número absoluto de leucócitos/ μL de sangue está significativamente aumentado entre os indivíduos tabagistas quando comparado com indivíduos saudáveis não tabagistas

6.2.Esse número aumentado de leucócitos se deve ao aumento do número de neutrófilos, principalmente, e, em segundo lugar, do aumento do número de monócitos. A concentração sérica da MPO foi significativamente superior também, entre os indivíduos tabagistas.

6.3.A concentração de CXIL8 sérica foi cerca de quatro vezes superior entre os indivíduos tabagistas.

6.4.Não observamos diferenças significativas entre a atividade clorinante e peroxidativa da MPO endógena nos dois grupos estudados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H.; PODER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**. Cap. 17, p. 354-368, 1995.

ABU-SOUD, H. M.; HAZEN, S. L. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 5425-5430, 2000.

ARNHOLD, J. Free radicals – Friends or foes? Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**, v.69, p. 4-9, 2004.

ASKARI, A.T; BRENNAN, M.L., *et. al.*. Myeloperoxidase and plasminogen activator inhibitor 1 play a central role in ventricular remodeling after myocardial infarction. **J Exp Med**, v. 197, p. 615-624, 2003.

BABIOR, BM. NADPH Oxidase: an Update. **Blood**, v. 93, p. 1464-76, 1999.

BABIOR, BM. The respiratory burst of phagocytes. **J Clin Invest**, v. 73, p.599- 601, 1984.

BAIN, B.J. Células sanguíneas: um guia prático. 4^{ed}, Porto Alegre: Artmed, 2007.

BALDUS, S., HEESCHEN, C., MEINERTZ, T., ZEIHNER, A.M., EISERICH, J.P., MUNZEL, T., SIMOONS, M. L. E HAMM, C.W. Myeloperoxidase Serum Levels Predict Risk in Patients With Acute Coronary Syndromes. **Circulation**, v.108, p.1440-1445. 2003.

BONDY S.C. e LE BEL C.P. The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. **Free Rad Biol Med**, v.14, p.633-642. 1993.

BOVIL E.G.;BILD D.E., *et. al.*. White blood cell counts in persons aged 65 years or more from the cardiovascular health study. Correlations with baseline and demographic characteristics. **Am. J. Epidemiol.**, v.143, p.1107-1113. 1996.

BRENNAN, M.L; PENN, M.S., LENTE,F.V.; *et. al.* Prognostic Value of Myeloperoxidase in Patients with Chest Pain, **N Engl J Med**, v. 349, p.1595-1604,2003.

BRESTEL, E. P. Co-oxidation of luminol and hydrogen peroxide. Implications for neutrophil chemiluminescence. **Biochemical Biophysical Research Communication**, v. 126, p. 482-488, 1985.

BRIDGES, R.B.; WYATT, R.J.; & REHM, S.R. Effect of smoking on peripheral blood leucocytes. **Eur. J. Respir. Dis.**, v.661, p.24-33, 1985

BUFFON, A., BIASUCCI, L.M. E LIUZZO, G. Widespread coronary inflammation in unstable angina. **N. Engl. J. Med.**, v.347, p.5-12. 2002.

CADENAS E. e DAVIES K.J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Rad Biol Med**, v.29, p.222-230, 2000.

CAPEILLÈRE-BLANDIN, C. Oxidation of guaiacol by myeloperoxidase: a twoelectron-oxidized guaiacol transient species as a mediator of NADPH oxidation. **Biochemical Journal**, v. 336, p. 395-404, 1998.

CAYLEY W. E. JR., ASSELBERGS F. W., COHEN TERVAERT J.-W., TIO R. A., BRENNAN M.-L., PENN M. S., HAZEN S. L. Prognostic Value of Myeloperoxidase in Patients with Chest Pain **N Engl J Med.** v.350, p.516-5180, 2004.

COUSSENS, L. M. & WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, p. 860-867, 2002.

CHANTEPIE, S.; MALLE, E.; SATTLER, W.; CHAPMAN, M.J.; KONTUSH, A. Distinct HDI subclasses present similar intrinsic susceptibility to oxidation by HOCl. **Arch. Biochem. Biophys.** v.487, n.1, p.28-35, 2009

DESSER, R. K.; HIMMELHOCH, S. R.; EVANS, W. H.; JANUSKA, M.; MAGE, M.; SHELTON, E. Guinea pig neutrophil and eosinophil peroxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 148, p. 452-465, 1972.

DOERGE, D.R; DIVI, R.L. e CHURCHWELL, M.I. MI. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. **Analytical biochemistry**, v. 250, n.1, p.10-17, 1997.

DOMAGALA-KULAWIK, J . Effects of cigarette smoke on the lung and systemic immunity. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 59, n.6, p.19–34, 2008.

DULBECCO, R. AND VOGT, M. PLAQUE FORMATION AND ISOLATION OF PURE LINES WITH POLIOMYELITIS VIRUSES. **J. Exp. Med.**, v.99, n.2, p.167-182. 1954.

DYPBUKT, J.M.; BISHOP, C; BROOKS, W.M.; THONG, B.; ERIKSSON, H.; KETTLE, A. J. A sensitive and selective assay for chloramines production by myeloperoxidase, **Free Radical Biology & Medicine**, v.39, p. 1468 – 1477, 2005.

FERREIRA, A.L.; MATSUBARA, L.S. Free radicals: concepts, diseases, defense system and oxidative stress. **Rev. Assoc. Méd. Bras.**, v.43, p.61-68, 1997.

FU, X.; KASSIM, S.Y. e PARKS, W.C.; Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP7) a mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidases. **J Biol Chem**, v.276, p.41279-41287, 2001.

GAINET, J.; CHOLLET-MARTIN, S.; BRION, M.; HAKIM, J.; GOUGEROT-POCIDALO, M.A.; *et. al.* Interleukin-8 production by polymorphonuclear neutrophils in patients with rapidly progressive periodontitis: an amplifying loop of polymorphonuclear neutrophil activation. **Lab Invest.** v.78, n.6, p. 755-762, 1998.

GESSER, B.; DELEURAN, B.; LUND, M.; VESTERGAARD, C.; LOHSE, N.; DELEURAN, M.; *et. al.* Interleukin-8 induces its own production in T lymphocytes – a process regulated by interleukin-10. **Biochem Biophys Res Commun.** v.210, n.3, p. 660-669, 1995.

GOLDBLUM S.E.; WU K.M., *et. al.* Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits. **J Appl Physiol.**, v.59, n.6, p.1978-1985. 1985.

GORSKA, K; KRENKE, R. ; DOMAGALA-KULAWIK J. ; KORCZYNSKI, P. ; NEJMAN-GRYZ, P. ; KOSCIUCH, J. ; HILDEBRAND, K.; CHAZAN, R. J.; Comparison of cellular and biochemical markers of airway inflammation in patients with mild-to-moderate asthma and chronic obstructive pulmonary disease: an induced sputum and bronchoalveolar lavage fluid study. **J. Physiol Pharmacol.** v.59, n.6, p.271-283, 2008.

GOTTO, A. M., BELKHODE, M. L e TOUSTER, O. **Cancer Res.**v.29, p.807–811, 1969.

GOUGEROT-PODICALO, M.A.; ELBIM, C.; CHOLLET-MARTIN, S. Modulation of the oxidative burst of human neutrophils by pro-and anti-inflammatory cytokines. **Pathol Biol (Paris)**, v. 44, n.1, p.36-41, 1996.

GREEN S.M.; VOWELS J., *et. al.* Leucocytosis: a new look at an old marker for myocardial infarction. **Acad. Emerg. Med.**, v.3, n.11, p.1034-1041. 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. **Free radicals in biology and medicine.** 3.ed. New York: Oxford University Press Inc, 1999.

HALLIWELL B. e GUTTERIDGE J.M.C. Free radicals in biology and medicine. **Oxford: Clarendon Press**, p.543. 1993.

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

HARRINSON, J. E.; SCHULTZ, J. Studies on the Chlorinating activity of myeloperoxidase. **Biological Chemistry**, v. 251, p. 1371-7134, 1976.

HARTREE, E. F. Determination of Protein: A Modification of the Lowry Method That Gives a Linear Photometric Response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HAWKINS, C. L.; PATTISON, D.I. e DAVIES, M.J., Hypochlorite induced oxidation of amino acids, peptides and proteins, **Amino Acids**, v.25, p.259-274, 2003.

HEIT, B. e al. An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration opposing chemotactic gradients. **The Journal of Cell Biology**, v. 159, n.1, p.91-102, 2002.

IHO, S.; TANAKA, Y.; TAKAUJI, R.; KOBAYASHI, C.; MURAMATSU, I.; IWASAKI, H.; NAKAMURA, K.; SASAKI, Y.; NAKAO, K.; TAKAHASHI, T. Nicotine induces human neutrophils to produce *CXCL-8* through the generation of peroxynitrite and subsequent activation of NF-Kappa B. **J Leukoc Biol.** v.74, n.5, p.942-951, 2003.

KHALIL, N. M. Interação das aminas terciárias nicotina, quinina, ranitidina e trimetilamina com o ácido hipocloroso: efeitos em biomoléculas e sistemas enzimáticos. 2005. **Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas**, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

KLEBANOFF S.J. Phagocyte antimicrobial systems: Myeloperoxidase. **Proceedings of the Association of American Physicians** v.111, n.5, p.383-389. 1999.

KNAAPEN, A. M.; GUNGOR, N.; SCHINS, R.P.F.; BORM, P.J.A, e SCHOOTEN, F.J.V. Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review. **Mutagenesis**. v.21, n.4, p.225-236, 2006.

LAU, D. & BALDUS, S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. **Pharmacol Ther.** v.111, n.1, p.16-26, 2006.

LEWANDOWSKI, E.C. Update on Cardiac Biomarkers. **J. American Society for Clinical Pathology**, v.37, n.10, p.598-605. 2006.

LOWE, G.D.; MACHADO, S.G. e KROL, W.F.; White blood cell count and haematocrit as predictors of coronary recurrence after myocardial infarction. **Thromb. Haemost.**, v.54, p.700-703. 1985.

LOWRY, OH, NJ ROSBROUGH, AL FARR, AND RJ RANDALL. **J. Biol. Chem.** v.193, n.265, 1951.

LUCISANO, Y.M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG. **J. Immunol.** v.132, n.4, p.2015-2020, 1984.

MALLE, E.; MARSCHE, G.; PANZENBOECK, U.; SATTLER, W. Myeloperoxidase-mediated oxidation of high-density lipoproteins: fingerprints of newly recognized potential proatherogenic lipoproteins. **Arch Biochem Biophys.** v.445, n.2, p.245-255, 2006.

MARQUEZ, L.A.; DUNFORD, H.B. Mechanism of the oxidation of 3,5,3',5'-Tetramethylbenzidine by myeloperoxidase determined by transient-and steady-state

kinetics. **Biochemistry**, v.36, p.9349-9355, 1997.

MASTROIANNI, C. M., *et. al.*. Improvement in neutrophil and monocyte function during highly active antiretroviral treatment of HIV-1-infected patients. **AIDS**, v.13, p.883-890, 1999.

MASUDA, M; SUZUKI, T; FRIESEN, MD; RAVANAT, JL; CADET, J; PIGNATELLI, B; NISHINO, H; OHSHIMA, H. Chlorination of guanosine and others nucleosides by hypochlorous acid and myeloperoxidase of activated human neutrophils: catalysis by nicotine and trimethylamine. **J Biol Chem**, v.276, p.4486-4496, 2001.

MATHESON, N. R.; WONG, P. S.; TRAVIS, J. Isolation and properties of human neutrophil myeloperoxidase. **Biochemistry**, v.20, p.325-330, 1981.

MATHY-HARTERT, M.; BOURGEOIS, E.; GRULKE, S.; DEBY-DUPONT, G.; CAUDRON, I.; DEBY, C.; LAMY, M.; SERTEYN, D. Purification of myeloperoxidase from equine polymorphonuclear leucocytes. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.62, p.127-132, 1998.

MELANSON S.E.F. e GREEN S.M. Elevation of Myeloperoxidase in Conjunction With Cardiac-Specific Markers After Marathon Running. **Am J Clin Pathol**, v.26, n.6, p.888-893, 2006.

MICHISHITA, E.; KURAHASHI, T.; SUZUKI, T., FUKUDA, M.; FUJII, M., HIRANO, H. e AYUSAWA, D. **Exp. Gerontol.** v.37, p.885–890, 2002a.

MICHISHITA, E.; MATSUMURA, N.; KURAHASHI, T.; SUZUKI, T.; OGINO, H.; FUJII, M e AYUSAWA, D. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v.66, p.877–879, 2002b.

MOCATTA T.J.; PILBROW A.P., *et. al.*. Plasma Concentrations of Myeloperoxidase Predict Mortality After Myocardial Infarction. **J Am Coll Cardiol**, v.49, p.1993-2000, 2007.

MORITA,T.; ASSUMPÇÃO, R.M.V. Manual de Soluções, Reagentes & Solventes. **ed. Edgard Blucher Ltda**, e.12, p.278, 2003a.

MORITA,T.; ASSUMPÇÃO, R.M.V. Manual de Soluções, Reagentes & Solventes. **ed. Edgard Blucher Ltda**, e.12, p.276-277, 2003b.

NIETO, F.J.; SZKLO, M. E FOLSOM, A.R;. Leukocyte count correlates in middle-aged adults: The AthEROclEROis Risk in Communities (ARIC) Study. **Am J Epidemiol**, v.136, p.525-537, 1992.

OGAMA, Y.; IMAKI, M.; YOSHIDA, Y.; SHIBAKAWA, M.; TANADA, S. An Epidemiological Study on the Association between the Total Leukocyte and Neutrophil Counts, and Risk Factors of Ischemic Heart Disease by Status in Japanese Factory Workers. **Appl Human Sci**, v.17, n.6, p. 239-47, 1998.

ORAM J.F.; BERGT C., *et. al.*. The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. **PNAS**, v.101, n.35, p.13032-13037. 2004.

PAL, B. C., CUMMING, R. B., WALTON, M. F. e PRESTON, R. J. **Mutat. Res.** v.91, p.395-401, 1981.

PARRY, H.; COHEN, S.; SCHLARB, J.E.; TYRRELL, D.A.; FISHER, A.; RUSSELL, M.A. & JARVIS, M.J. Smoking, alcohol consumption, and leukocyte counts. **Am J Clin Pathol.** v.107, n.1, p.64-67, 1997.

PESKIN, A.V.; WINTERBOURN, C.C. Taurine chloramine is more selective than hypochlorous acid at targeting critical cysteines and inactivating creatine kinase and glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, **Free Radical Biology & Medicine**, 40, p.45-53, 2006.

PODREZ, E. A.; ABU-SOU, H. M.; HAZEM, S. L. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v.28, p.1717-1725, 2000.

PRUTZ, WA. Reactions of hypochlorous acid with biological substrates are activated catalytically by tertiary amines. **Arch Biochem Biophys**, v.357, p.265-73, 1998.

PRUTZ, W. A.; KISSNER, R. e KOPPENOL, W. H. **Arch. Biochem. Biophys.** v.393, p.297-307, 2001.

REPINE J.E.; BAST A., *et. al.*. Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v.156, p.341-357, 1997.

SGARBI, M.W.M; SILVA, B.A., *et. al.*. The importance of systemic inflammatory response (SIRS) in the prognosis of polytraumatized patients. **Rev Bras Ortop**, v.41, n.2, p.1-6, 2006.

SHAO B.; ODA M.N., ORAM, J.F.; HEINECKE, J.W. Myeloperoxidase: an oxidative pathway for generating dysfunctional high-density lipoprotein. **Chem Res. Toxicol.** v.23, n.3, p.447-454, 2010.

SHAO B.; ODA M.N., *et. al.*. Myeloperoxidase Impairs ABCA1-dependent Cholesterol Efflux through Methionine Oxidation and Site-specific Tyrosine Chlorination of Apolipoprotein A-I. **Journal of biological chemistry**, v.281, n.14, p.9001-9004, 2006.

SCHULTZ, J.; & KAMINKER, K. Myeloperoxidase of leukocyte of normal blood. I. Content and localization. **Arch. Biochem. Biophys.** v.98, p.465-471, 1962.

SPERTINI, O. *et. al.*. Leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1, L-selectin) interacts with a inducible endothelial cell ligando to support leucocyte adhesion. **The Journal of Immunology**, v.147, p.2565, 1991.

SPICKETT, C.M. Chlorinated lipids and fatty acids: na emerging role in pathology. **Pharmacol Ther.** v.115, n.3, p.400-409, 2007.

TERASHIMA, T.; WIGGS, B.; ENGLISH, D.; HOGG, J.C.; VAN EEDEN, S.F. The effect of cigarette smoking on the bone marrow. **Am. J Respir Crit Care Med.** v.155, n.3, p.1021-1026, 1997.

TOBLER, A; KOEFFLER, P. Myeloperoxidase: localization, structure, and function. In: HARRIS, J.R. **Blood Cell Biochemistry**. New York: Plenum, v.3, p.255-287, 1991.

UNDURTI, A.; HUANG, Y.; LUPICA, J.A.; SMITH, J.D.; DIDONATO, J.A.; HAZEN, S.L. Modification of high density lipoprotein by myeloperoxidase generates a pro inflammatory particle **J Biol Chem.** v.284, n.45, p.30825-30835, 2009.

VELLOSA, J.C.R.; BARBOSA, V.F.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. IV (2), p. 119-130, 2007.

WAGNER, J.G.; ROTH, R.A. Neutrophil migration during endotoxemia. **Journal of Leucocyte Biology**, v. 66, p. 10, 1999.

WAHL, L.M. ; KLEINMAN, H.K. Tumor-associated macrophages as targets for cancer therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v.90, p.1583-1584, 1998.

WARD, R.J.; PETERS, T.J. Free Radicals. In: MARSHALL, W.J.; BANGERT, S.K. **Clinical biochemistry: Metabolic and clinical aspects**. New York: Churchill Livingstone, p.765-777, 1995.

WINTERBOURN C.C.; VISSERS M.C.M., *et. al.*. Myeloperoxidase. . **Current Opinion in Hematology** v.7, p.53-58, 2000.

VAN DER VEEN, B.S.; DE WINTHER, M.P.; HEERINGA, P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. **Antioxid. Redox Signal.** v.11, n.11, p.2899-2937, 2009

VASSALLO, R.; KROENING, P.R.; PARAMBIL, J.; KITA, H. Nicotine and oxidative cigarette smoke constituents induce immune-modulatory and pro-inflammatory dendritic cell responses. **Mol Immunol.** v.45, n.12, p.3321-3329, 2008.

ZOLOKAR J.B.; RICHARD J.L, *et. al.*. Leucocyte count smoking and myocardial infarction. **N. Engl. J. Med**, v.304, n.8, p.465-468, 1981.

ZUURBIER, K. W; VAN DEN BERG, J. D.; VAN GELDER, B. F.; MUIJSERS, A. O. Human Hemi-myeloperoxidase. Initial chlorinating activity at neutral pH, compound II and III formation, and stability towards hypochlorous acid and high temperature. **European Journal of Biochemistry**, v.205, p.737-742, 1992.

ANEXOS

Amostras	Leucócitos	Neutrófilos		Linfócitos		Monócitos		Eosinófilos		Basófilos	
		V.R.	V.A.	V.R.	V.A.	V.R.	V. A.	V. R.	V. A.	V. R.	V. A.
28	6.100	65,9	4019,9	22,8	1390,8	7,4	451,4	3,5	213,5	0,4	24,4
10	6.700	60,4	4046,8	24,3	1628,1	10,6	710,2	3,9	261,3	0,8	53,6
6	8.900	51,2	4556,8	32,6	2901,4	8,8	783,2	6,4	569,6	1	89
21	7.900	60,5	4779,5	29,3	2314,7	6,9	545,1	2,4	189,6	0,9	71,1
32	9.200	59,5	5474,0	28	2576	7,5	690	4,2	386,4	0,8	73,6
7	9.700	61,9	6004,3	25,6	2483,2	9,2	892,4	3,1	300,7	0,2	19,4
25	11.000	57,7	6347,0	30,5	3355	7,1	781	3,9	429	0,8	88
50	8.300	62,1	5154,3	23,5	1950,5	6	498	6,6	547,8	1,8	149,4
27	8.100	59	4779,0	29,4	2381,4	9,2	745,2	2	162	0,4	32,4
60	9.200	54,1	4977,2	35,5	3266	6,8	625,6	3,4	312,8	0,2	18,4
61	7.100	55,5	3940,5	32,7	2321,7	9,6	681,6	2,2	156,2	0	0
62	8.400	64,6	5426,4	25,8	2167,2	7,7	646,8	1,3	109,2	0,6	50,4
63	8.200	68,3	5600,6	21,6	1771,2	8,8	721,6	0,9	73,8	0,4	32,8
31	6.700	61,1	4093,7	32,2	2157,4	5	335	1,2	80,4	0,5	33,5
51	8.400	49,5	4158,0	37	3108	8,1	680,4	4,5	378	0,9	75,6
49	8.200	53	4346,0	32,4	2656,8	12	984	2,4	196,8	0,2	16,4
23	7.900	56,9	4495,1	33,3	2630,7	6	474	3	237	0,8	63,2
53	7.300	63,2	4613,6	27,1	1978,3	7,6	554,8	1,6	116,8	0,5	36,5
48	9.200	59,4	5464,8	33,2	3054,4	3,4	312,8	1,3	119,6	2,7	248,4
34	10.600	58,3	6179,8	28,5	3021	9,8	1038,8	3,1	328,6	0,3	31,8
Média	8.355	59	4.923	29	2.456	8	658	3	258	1	60
SD	1258	4,8	752,2	4,4	554,4	2,0	192,4	1,6	146,6	0,62	56,0

Tabela 3- Valores hematimétricos relativos e absolutos dos leucócitos/ μL de sangue de indivíduos tabagistas. Determinação em contador automático Coulter- STKS.

V.R. - Valor Relativo

V.A. - Valor Absoluto

SD- Desvio Padrão

Amostras	Leucócitos	Neutrófilos		Linfócitos		Monócitos		Eosinófilos		Basófilos	
		V.R.	V.A.	V.R.	V.A.	V.R.	V.A.	V.R.	V.A.	V.R.	V.A.
19	5300	49	2597	43,2	2289,6	6,7	355,1	0,9	47,7	0,2	10,6
35	7700	34,2	2633,4	51,3	3950,1	7,3	562,1	4,1	315,7	3,1	238,7
45	7900	55	4345	29,3	2314,7	7,9	624,1	6,9	545,1	0,9	71,1
37	6100	53,5	3263,5	36,2	2208,2	7,3	445,3	2	122	1	61
24	6300	63,1	3975,3	30,1	1896,3	4,7	296,1	1,7	107,1	0,4	25,2
40	7500	60,1	4507,5	28,9	2167,5	8,4	630	1,9	142,5	0,7	52,5
44	6800	64,6	4392,8	25,2	1713,6	7,1	482,8	2,6	176,8	0,5	34
30	6900	64,4	4443,6	25,1	1731,9	7,7	531,3	2	138	0,8	55,2
43	7100	49,8	3535,8	40,4	2868,4	7,6	539,6	1,8	127,8	0,4	28,4
57	5400	43,4	2343,6	45,6	2462,4	7,8	421,2	2,7	145,8	0,5	27
41	5700	66,3	3779,1	23,8	1356,6	7,7	438,9	1,9	108,3	0,3	17,1
17	6100	56,1	3422,1	28,8	1756,8	7	427	7,4	451,4	0,7	42,7
22	5900	53,9	3180,1	31,8	1876,2	9,7	572,3	3,9	230,1	0,7	41,3
4	6400	67,1	4294,4	26,4	1689,6	2,2	140,8	1,9	121,6	2,4	153,6
42	6900	53,4	3684,6	30,4	2097,6	7,3	503,7	7,4	510,6	1,5	103,5
9	6900	54,7	3774,3	32,3	2228,7	8,1	558,9	4,5	310,5	0,4	27,6
47	6300	63,5	4000,5	28,3	1782,9	6	378	0,7	44,1	1,5	94,5
2	7700	65,1	5012,7	26,6	2048,2	7,2	554,4	0,8	61,6	0,3	23,1
56	4500	54	2430	40,2	1809	4,4	198	1	45	0,4	18
39	7500	55,8	4185	32,1	2407,5	8,5	637,5	3	225	0,6	45
Média	6.545	56,4	3.690,0	32,8	2.132,8	7,0	464,9	3,0	198,8	0,9	58,5
SD	912	8,3	759,5	7,6	549,4	1,7	137,8	2,1	152,5	0,7	54,9

V.R. - Valor Relativo

V.A. - Valor Absoluto

SD- Desvio Padrão

Tabela 4- Valores hematimétricos relativos e absolutos dos leucócitos/ μL de sangue de indivíduos não tabagistas. Determinação em contador automático Coulter- STKS.

TABELA CLORINANTE

Amostras	M de HOCl /g de Proteína. Min
28	0,0749
10	0,0281
6	0,0679
21	0,0530
32	0,0488
7	0,0762
25	0,0645
50	0,0577
27	0,0812
60	0,0551
61	0,0583
62	0,0710
63	0,0642
31	0,0872
51	0,0250
49	0,0216
23	0,0864
53	0,0454
48	0,0715
34	0,0336
Média	0,0586
SD	0,0199

Tabela 5- Teste de formação de ácido hipocloroso da via clorinante, marcador específico da atividade da MPO em indivíduos tabagistas

Amostras	M de HOCl /g de Proteína. Min
19	0,0776
35	0,0422
45	0,0715
37	0,0810
24	0,0770
40	0,0415
44	0,0268
30	0,0187
43	0,0383
57	0,0421
41	0,0299
17	0,0679
22	0,0566
4	0,0582
42	0,0470
9	0,0480
47	0,5980
2	0,0386
56	0,0430
39	0,0456
Média	0,0775
SD	0,1238

Tabela 6 - Teste de formação de ácido hipocloroso da via clorinante, marcador específico da atividade da MPO em indivíduos não tabagistas.

TABELA PEROXIDATIVA

Amostras	A/seg μ g de Proteína.
28	0,0002874
10	0,0002007
6	0,0005978
21	0,0002785
32	0,0002752
7	0,0004630
25	0,0002911
50	0,0003238
27	0,0002876
60	0,0003890
61	0,0003654
62	0,0004219
63	0,0003961
31	0,0002954
51	0,0003290
49	0,0003039
23	0,0002690
53	0,0003360
48	0,0003042
34	0,0004211
Média	0,0003418
SD	0,0000878

Tabela 7- Teste de absorvância por segundo por μ g de proteína da via peroxidativa dos indivíduos tabagistas.

Amostras	A/seg μg de Proteína.
19	0,0002530
35	0,0003417
45	0,0004297
37	0,0003969
24	0,0003655
40	0,0002734
44	0,0003351
30	0,0002169
43	0,0003128
57	0,0002821
41	0,0002888
17	0,0004611
22	0,0003867
4	0,0003731
42	0,0004475
9	0,0004287
47	0,0003316
2	0,0004453
56	0,0003630
39	0,0002691
Média	0,0003501
SD	0,0000718

Tabela 8- Teste de absorvância por segundo por μg de proteína da via peroxidativa dos indivíduos não tabagistas.

TABELA MPO Sérica

Amostras	MPO Sérica (ng/mL)
28	109,62
10	133,93
6	67,34
21	92,34
32	55,32
7	62,39
25	72,82
50	46,54
27	42,07
60	41,35
61	68,42
62	72,61
63	39,25
31	69,94
51	80,10
49	60,58
23	30,21
53	60,00
48	71,38
34	40,21
Média	59,11
SD	4,81

Tabela 9- Teste de ELISA MPO dos indivíduos tabagistas.

Amostras	MPO Sérica (ng/mL)
19	21,06
35	26,97
45	52,34
37	25,85
24	15,16
40	11,01
44	23,56
30	18,19
43	8,88
57	6,17
41	35,5
17	30,05
22	24,95
4	14,84
42	22,55
9	25,48
47	14,95
2	37,76
56	20,85
39	17,50
Média	22,68
SD	10,76

Tabela 10- Teste ELISA MPO indivíduos não tabagistas.

TABELA CXIL8 Sérica

Não Tabagistas	CXIL8 (pg/μL)	Leucócitos	MPO sérica (pg/μL)	Tabagistas	CXIL8 (pg/μL)	Cigarro/dia	Anos de tabagismo	Leucócitos	MPO sérica (pg/μL)
19	1,964	5300	21,06	28	31,889	20	20	6.100	109,62
35	1,144	7700	26,97	10	33,176	20	40	6.700	133,93
45	17,446	7900	52,34	6	28,600	40	20	8.900	67,34
37	0,348	6100	25,85	21	8,437	15	10	7.900	92,34
24	0,520	6300	15,16	32	8,842	30	30	9.200	55,32
40	2,278	7500	11,01	7	53,901	20	10	9.700	62,39
44	3,246	6800	23,56	25	12,441	20	20	11.000	72,82
30	4,266	6900	18,19	50	10,816	30	40	8.300	46,54
43	1,392	7100	8,88	27	5,539	7	20	8.100	42,07
57	1,392	5400	6,17	60	4,238	10	5	9.200	41,35
41	2,779	5700	35,5	61	9,824	20	23	7.100	68,42
17	3,565	6100	30,05	62	11,102	10	10	8.400	72,61
22	1,606	5900	24,95	63	1,406	3	4	8.200	39,25
4	2,074	6400	14,84	31	8,528	8	6	6.700	69,94
42	4,338	6900	22,55	51	1,921	16	7	8.400	80,1
9	5,653	6900	25,48	49	3,952	10	40	8.200	60,58
47	0,715	6300	14,95	23	1,406	10	28	7.900	30,21
2	2,750	7700	37,76	53	7,698	30	35	7.300	60
56	2,002	4500	20,85	48	9,443	30	40	9.200	71,38
39	0,663	7500	17,5	34	10,015	10	6	10.600	40,21

Tabela 11- Teste CXIL8 indivíduos não tabagistas e tabagistas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____,
RG _____, Estado Civil _____, Idade ____ anos, Residente na
_____,
nº ____, Bairro _____, Cidade _____,
Telefone _____ Fumo _____ cigarros a _____ anos.

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. O trabalho tem por finalidade avaliar a influência do tabagismo na quantidade e ação de uma proteína do sangue que indica a possibilidade de enfarte cardíaco e/ou derrame cerebral.
2. Ao participar desse trabalho estarei contribuindo para um maior entendimento da ciência dos riscos do tabagismo
3. Doarei para a realização dessa pesquisa, o seguinte material biológico, sangue coletado após a doação voluntária de sangue no Hemonúcleo, juntamente com os tubos de sangue são coletados para avaliar a saúde do doador, em três tubos de ensaio totalizando 15 mL que será utilizado exclusivamente para essa pesquisa, não podendo ser reutilizado em pesquisa posterior;
4. A minha participação como voluntário terá a duração de 5 minutos durante a coleta do sangue para realização dos exames de rotina do hemonúcleo;
5. Ao participar dessa pesquisa não corro nenhum risco e o desconforto será apenas durante a entrada da agulha para coleta do sangue para realização dos exames de rotina do hemonúcleo e para nossa pesquisa;
6. Todos os materiais utilizados na coleta do sangue serão descartáveis
7. Não há necessidade de retorno ao laboratório.
8. Não terei nenhuma despesa ao participar desse estudo;
9. Os procedimentos aos quais serei submetido não provocarão danos físicos ou financeiros e por isso não haverá a necessidade de ser indenizado por parte da equipe responsável por esse trabalho ou da Instituição (FCF/UNESP);

10. Meu nome será mantido em sigilo, assegurando assim a minha privacidade e se desejar, serei informado sobre os resultados dessa pesquisa;
11. Estou ciente de que o material a ser doado será utilizado exclusivamente nesta pesquisa, não podendo ser armazenado para uso posterior sem o meu consentimento;
12. Poderei me recusar a participar ou mesmo retirar meu consentimento a qualquer momento da realização dessa pesquisa, sem nenhum prejuízo ou penalização (isto é, sem interrupção do meu tratamento, quando for o caso);
13. Qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos poderei entrar em contato com a equipe científica do projeto pelo telefone 16 33576833 celular 16 97166833 e-mail abm1979@yahoo.com.br com André Bittencourt Martins no departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, laboratório de hematologia, no mesmo prédio onde será realizado a doação.
14. Para notificação de qualquer situação, relacionada com a ética, que não puder ser resolvida pelos pesquisadores deverei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, pelo telefone (0XX16) 3301-6897.

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar, como voluntária(o), do estudo “CONCENTRAÇÃO E ATIVIDADE SÉRICA DA MIELOPEROXIDASE EM INDIVÍDUOS TABAGISTAS”.

Araraquara, ___ de _____ de 200__

Assinatura do Voluntário

Assinatura do Pesquisador

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEP/FCF/CAr. nº 07/2008

Interessado: ANDRÉ BITTENCOURT MARTINS

Orientador: Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca

Projeto: Concentração e atividade sérica da mieloperoxidase em indivíduos tabagistas


Parecer nº 24/2008 – Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto "Concentração e atividade sérica da mieloperoxidase em indivíduos tabagistas", encontra-se adequado em conformidade com as orientações constantes da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS.

Por essa razão, o Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, em sessão de 02 de julho de 2008, considerou o referido projeto estruturado dentro de padrões éticos manifestando-se **FAVORAVELMENTE** à sua execução.

O relatório final do projeto de pesquisa deverá ser entregue em agosto de 2009, no qual deverá constar o Termo de Consentimento Livre Esclarecido dos sujeitos da pesquisa.

Araraquara, 02 de julho de 2008.


Profª Drª AURELUCE-DEMONTE
Coordenadora do CEP