

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

**OXIDAÇÃO DE COMPOSTOS β -DICARBONÍLICOS
POR PEROXIDASES**

ANA PAULA RODRIGUES

**ARARAQUARA – SP
2007**

ANA PAULA RODRIGUES

**OXIDAÇÃO DE COMPOSTOS β -DICARBONÍLICOS
POR PEROXIDASES**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” como parte dos
requisitos para obtenção do grau de DOUTOR em
Análises Clínicas. Área de concentração:
Bioquímica**

Orientador: Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti

Co-Orientador: Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

ARARAQUARA – SP

2007

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

R696o Rodrigues, Ana Paula
Oxidação de compostos β -dicarbonílicos por peroxidase. / Ana Paula Rodrigues. – Araraquara, 2007.
141 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas

Orientador: Iguatemy Lourenço Brunetti

Co-orientador: Valdecir Farias Ximenes

1.Peroxidase. 2.Compostos Beta dicarbonílicos. 3.Espécies reativas de oxigênio. 4.ADEPT. I.Brunetti, Iguatemy Lourenço, orient..II.Ximenes, Valdecir Farias, co-orient. III.Título.

CDD: 574.192

CAPES: 40300005

FOLHA DE APROVAÇÃO

Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti
Orientador e Presidente

Prof. Dr. Antonio Cardozo dos Santos
Membro Titular

Prof^a. Dr^a. Mariza Pires de Melo
Membro Titular

Prof^a. Dr^a. Olga Maria Mascarenhas Faria Oliveira
Membro Titular

Prof^a. Dr^a. Chung Man Chin
Membro Titular

Araraquara, 26 de novembro de 2007

Dedico este trabalho...

...À DEUS, por ter me dado a vida, saúde e por sempre iluminar o meu caminho, fazendo com que minhas buscas não sejam em vão.

...À minha mãe, pelo exemplo de perseverança, luta e alegria, mesmo diante dos mais difíceis obstáculos. Saudades...

...Ao meu pai, que sempre foi e será modelo de dedicação à profissão, justiça e honestidade. Por todo apoio dedicado à família e aos nossos estudos.

...Ao meu irmão Marcos, minhas irmãs Luciana e Tháís, e meus cunhados André e Maria Fernanda por todos os momentos de convivência e palavras de apoio e incentivo.

...Às minhas queridas sobrinhas Maria Luíza e Marina, pela alegria que sempre trazem para todos nós.

Ao Professor Iguatemy

...pela dedicação ao ensino, à pesquisa e orientação segura e paciente

que possibilitou a realização deste trabalho

...pela convivência diária e amizade sincera e atenciosa

...pela confiança em mim depositada

Ao Professor Valdecir

...pelas valiosas discussões e estímulo

...por acompanhar meu trabalho, auxiliando-me sempre que precisei

*“Se consegui ver mais longe,
foi porque me apoiei em ombros de gigantes”*

Isaac Newton

*“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,
mas não esqueço de que a minha vida
é a maior empresa do mundo.
E que posso evitar que ela vá à falência.
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver,
apesar de todos os desafios,
incompreensões e períodos de crise.
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas
e se tornar um autor da própria história.
É atravessar desertos fora de si,
mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.
É saber falar de si mesmo.
É ter coragem para ouvir um “não”.
É ter segurança para receber uma crítica,
mesmo que injusta.
Pedras no caminho?
Guardo todas,
um dia vou construir um castelo...”*

Fernando Pessoa

Agradeço...

Ao Laboratório de Bioquímica e Enzimologia Clínica, do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, onde este trabalho foi desenvolvido,

Aos professores que fizeram parte da banca examinadora, pelas sugestões e críticas que certamente contribuíram para o enriquecimento deste trabalho,

Às professoras Dr^a. Maria Teresa Pepato e Dr^a. Regina Célia Vendramini pela amizade e agradável convívio,

À professora Dr^a. Olga Maria M. de Faria Oliveira, por sempre permitir uso de seu laboratório,

Ao professor Dr. Luiz Marcos da Fonseca pela colaboração e amizade,

Ao Professor Dr. Antonio Cardoso dos Santos, por me receber em seu Laboratório na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, colaborar com nosso trabalho e pelo início de uma parceria,

Ao Cezar, doutorando na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pelo auxílio, dedicação e paciência em experimentos realizados em conjunto,

À Tirene, pelo empenho em ajudar sempre que precisei, e por ser acima de tudo, uma grande amiga,

Às secretárias do programa de Pós Graduação, Cláudia, Laura e Sônia, pelo auxílio, paciência e amizade,

Aos colegas Marília, José Carlos, Najeh, Vanessa, Karina, Roberta, Helen pela amizade e momentos compartilhados,

À Maria Irani Coito, bibliotecária da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, pelo auxílio na revisão das referências bibliográficas,

À todos os funcionários da biblioteca da FCFAR-UNESP, pela ajuda na busca de periódicos,

Aos técnicos Valéria e Marcos, pelo auxílio e amizade,

A todos os meus amigos, pelo incentivo, momentos de alegria e descontração,

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos

Obrigada!!

RESUMO

A terapia ADEPT (*antibody-directed enzyme prodrug therapy*) tem sido caracterizada, em vários estudos experimentais focalizados na destruição de células tumorais, como uma alternativa à fármacos citotóxicos sistêmicos (anti-proliferativos). Nesta técnica, o pró-fármaco é ativado por enzimas exógenas que são levadas à célula tumoral por meio de anticorpos monoclonais (Mab). Neste contexto, *horseradish peroxidase* (HRP) e ácido 3-indolacético (IAA) constituem um dos sistemas mais citados de enzima e pró-fármaco aplicados à destruição de células tumorais com conjugados HRP-Mab. Peroxidases são enzimas inespecíficas e várias moléculas podem ser oxidadas pela suas formas ativas HRP-I e HRP-II no ciclo clássico da peroxidase, que é dependente de peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos. Por outro lado, somente NADH, dihidroxifumarato e a auxina de planta IAA, têm sido descritos como substratos para HRP em reação independente de peróxido de hidrogênio. O objetivo deste trabalho foi estudar o mecanismo pelo qual compostos β -dicarbonílicos são oxidados por HRP e explorar suas aplicações. Foi demonstrado que os compostos dicarbonílicos 2,4-pentanodiona (PD) e 3-metil-2,4-pentanodiona (MePD) são eficientemente oxidados pela HRP, na ausência de peróxido, em tampão fosfato pH 7,4, consumindo oxigênio presente em solução, o que não ocorreu com outros compostos β -dicarbonílicos testados (dimedona e acetoacetato). Observou-se também, via espectrofotometria, durante a reação com PD e MePD, que a enzima nativa passou à sua forma HRP-III, além disso, a reação produziu espécies reativas de oxigênio (ERO), detectadas por quimiluminescência dependente de luminol e fluorescência dependente de diclorofluoresceína. Também foram realizadas reações de consumo de oxigênio com outros compostos que possuem grupamento heme (citocromo C, hemina, mioglobina e mieloperoxidase) para avaliar a especificidade da HRP nessa reação de oxidação; a MePD foi eficientemente oxidada pela hemina e mioglobina. Metilglioxal (MG) foi detectado como produto da reação PD/HRP por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Considerando que a oxidação da PD catalisada por HRP possa ser útil na técnica ADEPT, avaliamos a citotoxicidade do sistema PD/HRP em leucócitos, empregando o ensaio de exclusão do Azul de Trypan. A combinação de PD e HRP causou um aumento no poder de citotoxicidade, comparado à PD somente. Em resumo, observou-se que a PD se comporta como um substrato para

HRP em uma reação independente de peróxido de hidrogênio, produzindo ERO e MG, e exibindo citotoxicidade. Finalmente, pode-se propor ser a PD um ponto de partida para projetos de novos fármacos baseados na técnica ADEPT com HRP.

Palavras-chave: peroxidases, compostos β -dicarbonílicos, espécies reativas de oxigênio, ADEPT

ABSTRACT

Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) has featured in several experimental studies focused on the destruction of tumor cells, as an alternative to systemic cytotoxic (antiproliferative) drugs. In this technique, the prodrug is activated by exogenous enzymes delivered to tumor cells *via* monoclonal antibodies (MAb). In this context, horseradish peroxidase (HRP) and indole-3-acetic acid (IAA) constitute one of the most often cited systems of enzyme and prodrug applied to destroy tumor cells with HRP – MAb conjugates. Peroxidases are unspecific enzymes and several molecules can be oxidized by the active forms HRP-I and HRP-II in the classic peroxidase cycle, which depends on hydrogen peroxide or organic hydroperoxides. On the other hand, only NADH, dihydroxyfumarate and the plant auxin IAA have been described as substrates for HRP in a reaction independent of hydrogen peroxide. The objective of this work was to study the mechanism by which β -dicarbonyl compounds are oxidized by HRP and explore possible applications. We demonstrated by measuring oxygen uptake, that the dicarbonyls PD (2,4-pentanedione) and 3-MePD (3-methyl-2,4-pentanedione) can also be oxidized by HRP in the absence of peroxide, in phosphate buffer pH 7.4, consuming the oxygen present in solution, what didn't occur with other β -dicarbonyl compounds (dimedon and acetoacetate), under the same conditions. It was also observed, in the absorption spectrum during the reaction course with PD and 3-MePD, that the native enzyme was transformed to HRP-III; moreover, the reaction produced reactive oxidant species (ROS), detected by luminol-dependent chemiluminescence and dichlorofluorescein-fluorescence dependent. Reactions of oxygen uptake with other heme-compounds (cytochrome C, hemin, myoglobin and myeloperoxidase) had been carried to detect the specificity of the HRP in the oxidation reaction. However, the MePD efficiently was oxidated by the hemin and myoglobina. Methylglyoxal (MG) was detected as product of reaction PD/HRP through liquid chromatography of high performance (HPLC). Believing that the oxidation of PD catalyzed by HRP might be useful in the ADEPT technique, we tested the cytotoxicity of the PD/HRP system in leukocytes, by employing the trypan blue exclusion assay. The combination of PD and HRP caused an increase in cytotoxicity power, compared to PD alone. In summary, it was observed that PD behaves as a substrate for HRP in a hydrogen peroxide-independent reaction, producing ROS and methylglyoxal and exhibiting

cytotoxicity. Finally, PD could be a starting point for the design of new drugs based on HRP – related ADEPT techniques.

Keywords: peroxidase, β -dicarbonyl compounds, reactive oxidant species, ADEPT

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Grupamento heme ou ferroprotoporfirina	25
Figura 2. Espectro UV-Vis da <i>Horseradish Peroxidase</i> e suas formas em diferentes estados de oxidação	30
Figura 3. Formação de radicais livres na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial	38
Figura 4. Ativação do complexo NADPH oxidase da membrana do fagócito e formação de ERO	39
Figura 5. Mecanismo de ação simplificado do citocromo P450.....	42
Figura 6. Formas do ácido ascórbico e reações com radicais	45
Figura 7. Comportamento sinérgico das vitaminas C e E	46
Figura 8. Glutathione e sua forma oxidada.....	46
Figura 9. Estrutura de um flavonóide (quercetina).....	50
Figura 10. Fontes e respostas celulares às espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	52
Figura 11. Proposta da terapia ADEPT.....	56
Figura 12. Dois tipos de β -dicetonas clivadas por enzimas.....	61
Figura 13. Mecanismo sugerido para hidrólise de acetilpiruvato por APH de <i>Pseudomonas putida</i>	62
Figura 14. Reação catalisada por FAH.....	63
Figura 15. Estrutura química dos substratos estudados.....	67
Figura 16. Mecanismo de detecção de ERO intracelular pelo uso de DCFH-DA.....	80
Figura 17. Consumo de oxigênio na oxidação de 2,4-pentanediona, metil-2,4-pentanediona, ácido 3-indolacético, ácido 5-hidroxi-3-indolacético, dimedona, acetoacetato e 1,3-ciclohexanodiona.....	83
Figura 18. Efeito do pH do meio reacional na oxidação de PD, Me-PD e IAA.....	85
Figura 19. Velocidade de consumo de oxigênio na oxidação da PD catalisada por HRP.....	86
Figura 20. Influência da concentração de HRP na oxidação da PD.....	87
Figura 21. Influência da concentração de HRP na oxidação da Me-PD.....	88
Figura 22. Velocidade de consumo de oxigênio na oxidação do IAA catalisada por HRP.....	89
Figura 23. Consumo de oxigênio provocado por oxidação PD , Me-PD e IAA pela HRP, na ausência e na presença de H ₂ O ₂	90
Figura 24. Variação espectral da HRP durante oxidação da PD.....	92

Figura 25. Efeito da presença da SOD no ciclo da HRP e no consumo de oxigênio pela reação PD/HRP.....	93
Figura 26. Efeito do oxigênio na oxidação da PD catalisada por HRP.....	95
Figura 27. Efeito da catalase no consumo de oxigênio da reação PD/HRP.....	96
Figura 28. Efeito do pH na oxidação da PD catalisada por HRP.....	97
Figura 29. Perfil cromatográfico do produto da reação da PD após oxidação catalisada por HRP e MG puro.....	99
Figura 30. Produção de ERO durante oxidação da PD catalisada por HRP.....	100
Figura 31. Produção de ERO durante oxidação da PD catalisada por HRP.....	101
Figura 32. Produção de ERO durante oxidação da PD catalisada por HRP.....	102
Figura 33. Efeito da reação PD/HRP/O ₂ na indução de formação de ERO em células HepG2.....	103
Figura 34. Efeito citotóxico de compostos em estudo na ausência e na presença de HRP.....	105
Figura 35. Lâminas preparadas em citocentrífuga com mononucleares submetidos ao teste de citotoxicidade.....	106
Figura 36. Efeito da difusão de ar no consumo de oxigênio da reação PD/HRP.....	107
Figura 37. Alteração espectral da HRP durante oxidação da Me-PD.....	109
Figura 38. Alteração espectral da HRP durante oxidação da Me-PD.....	110
Figura 39. Alteração espectral da HRP durante oxidação do IAA.....	111
Figura 40. Alteração espectral da HRP durante oxidação da DM e 5-OH-IAA.....	112
Figura 41. Variação espectral da HRP durante oxidação do AcAc.....	113
Figura 42. Ausência de consumo de oxigênio dos sistemas HRP/substrato: AcAc, CH, DM e 5-OH-IAA	114
Figura 43. Produção de ERO durante oxidação de substratos carbonílicos, catalisada por HRP.....	115
Figura 44. Ausência do consumo de oxigênio do citocromo C e da PD ou Me-PD ou IAA.....	116
Figura 45. Reação de consumo de oxigênio provocado por oxidação de Me-PD.....	117
Figura 46. Produção de ERO durante oxidação da PD catalisada por HRP ou MPO... ..	118
Figura 47. Ausência de consumo de oxigênio utilizando a PD e o IAA na presença de hemina ou mioglobina	118
Figura 48. Consumo de oxigênio provocado na oxidação da PD.....	120
Figura 49. Produção de quimiluminescência durante oxidação da PD catalisada por HRP.....	121
Figura 50. Consumo de oxigênio provocado na oxidação da Me-PD na presença de	

hemina e mioglobina	123
Figura 51. A estrutura molecular espacial das formas enólicas da PD e da DM.....	126
Figura 52. Estrutura química da curcumina e tetraidrocurcumina.....	127

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Ciclo clássico da peroxidase e vias para produção da forma ferrosa e composto III (HRP-III).....	28
Esquema 2. Redução da Ubiquinona e formação do $O_2^{\bullet -}$	37
Esquema 3. Formação de ERO a partir da síntese do ácido úrico.....	41
Esquema 4. Via catalítica proposta de DKe1.....	65
Esquema 5. Mecanismo de oxidação do luminol.....	76
Esquema 6. Via proposta para a produção de metilglioxal e ácido pirúvico pela oxidação da PD catalisada por HRP.....	99
Esquema 6 . Mecanismo proposto para oxidação da PD catalisada por HRP.....	125

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Determinação da concentração real do metilglioxal comercial, através da derivatização com semicarbazida.....	73
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

•OH - radical hidroxil
5-OH-IAA – ácido-5-hidroxi-3-indolacético
AcAc - acetoacetato
ADEPT - *antibody-directed enzyme prodrug therapy*
AGEs - produtos de glicação avançada
APH - acetilpiruvato hidrolase
BZD - 4-hidroxibenzidrazida
CAP - citosol ascorbato peroxidase
CCP - citocromo C peroxidase de levedura
CEA - antígeno carcinoembriogênico
CH - ciclohexanodiona
CPG₂ - carboxipeptidase G₂
CPO - cloroperoxidase
CYP - citocromo P450
DCF - 2,7'- diclorofluoresceína
DCFH-DA - diacetato de 2,7'- diclorofluoresceína
DKe1 - *diketone-cleaving enzyme*
DM - dimedona
ERN - espécies reativas de nitrogênio
ERO - espécies reativas de oxigênio
FAH - fumarilacetoacetato hidrolase
GPx - glutationa peroxidase
GSH - glutationa reduzida
GSSG - glutationa dissulfeto, glutationa oxidada
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
HOCl - ácido hipocloroso
HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência
HRP - peroxidase de raiz forte, *horseradish peroxidase*
IAA - ácido 3-indolacético
kM - constante de Michaelis
LDL - lipoproteínas de baixa densidade
MAP – 2-amino-2-metil-1,3-propanediol
Me-PD - metil-2,4-pentanodiona
MG – metilglioxal
MnP - manganês peroxidase

MPO - mieloperoxidase

NAD(P)H - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)

NAD⁺ – nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)

NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

NO[•] - óxido nítrico

O₂^{•-} - radical superóxido

¹O₂ - oxigênio singlete

OONO⁻ - peroxinitrito

PDH - 2,4-pentanediona hidrolase

PVA - polímero de álcool polivinílico

RO[•] – radical alcóxil

RO₂^{•-} - radical peróxil

SOD - superóxido dismutase

TNF- α – fator de necrose tumoral- α

TRX - sistema Tio-redoxina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. Peroxidasas e <i>Horseradish Peroxidase</i> (HRP)	24
1.2. Mecanismo de Ação da HRP	27
1.3. Espectros na Região do Visível e Banda Soret da HRP e Seus Compostos Intermediários	29
1.4. Reações Oxidase-Peroxidase	31
1.5. Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e de Nitrogênio (ERN).....	33
1.6. Principais ERO e ERN Geradas no Organismo.....	34
1.6.1. Radical Superóxido	34
1.6.2. Peróxido de Hidrogênio	34
1.6.3. Radical Hidroxil.....	34
1.6.4. Oxigênio Singlete.....	35
1.6.5. Radical Peroxil (RO ₂ •) e Alcoxil.....	36
1.6.6. Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN).....	36
1.7. Papel Fisiológico das ERO: Sítios de Formação e Efeitos.....	37
1.7.1. Cadeia Transportadora de Elétrons Mitocondrial.....	37
1.7.2. Via da NADPH Oxidase em Fagócitos.....	38
1.7.3. Via da Xantina Oxidase.....	41
1.7.4. Outras Vias	41
1.8. Mecanismos de Defesa Antioxidante	43
1.8.1. Sistemas Antioxidantes Enzimáticos	43
1.8.1.1. Superóxido Dismutase.....	43
1.8.1.2. Catalase	44
1.8.1.3. Glutaciona Peroxidase	44
1.8.2. Antioxidantes Não Enzimáticos	44
1.8.2.1. Vitamina C (Ácido Ascórbico)	44
1.8.2.2. Vitamina E.....	45
1.8.2.3. Antioxidantes Tióis	46
1.8.2.3.1. Glutaciona (GSH)	46
1.8.2.3.2. Sistema Tio redoxina	47
1.8.2.4. Ácido Lipóico	48
1.8.2.5. Carotenóides	48
1.8.2.6. Flavonóides	49
1.9. Estresse Oxidativo e Câncer	51

1.10. Terapia Anti-Tumoral	54
1.11. <i>Horseradish Peroxidase</i> e a Técnica ADEPT.....	58
1.12. Compostos β -Dicarbonílicos	61
2. OBJETIVOS	66
3. MATERIAIS E MÉTODOS	68
3.1. Reagentes e Soluções	69
3.2. Preparo das Soluções Estoque.....	69
3.3. Determinação da Concentração de Metilglioxal Usando Semicarbazida.....	72
3.4. Ensaio de Consumo de Oxigênio	73
3.5. Ensaio Espectrofotométrico	73
3.6. Identificação dos Produtos de oxidação da 2,4-Pentanediona.....	74
3.7. Ensaio Quimiluminescente para Avaliação da Produção de ERO.....	74
3.8. Separação de Leucócitos Humanos por Gradiente de Densidade em Ficcol – Hypaque®	77
3.9. Ensaio de Citotoxicidade	77
3.10. Ensaio com Linhagem Celular de Hepatoma Humano (HepG2)	78
3.10.1. Cultura Celular	78
3.10.2. Geração de ERO nas Células	78
3.11. Análise Estatística	80
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
4.1. Estudo de Consumo de Oxigênio nas Reações de Oxidação de Compostos β -Dicarbonílicos (PD, Me-PD, AcAc, CH e DM), IAA e 5-OH-IAA Catalisadas pela HRP na Ausência de H_2O_2	82
4.2. Cinética das Reações de Oxidação de Compostos β -Dicarbonílicos (PD, Me-PD) e IAA Catalisadas pela HRP na Ausência de H_2O_2	86
4.3. Ciclo Catalítico da HRP na Reação de Oxidação da PD na Ausência de H_2O_2	91
4.4. Produtos de Reação da Oxidação da PD Catalisada pela HRP.....	98
4.5. Citotoxicidade da Reação de Oxidação da PD Catalisada pela HRP.....	104
4.6. Ciclo Catalítico da HRP nas Reações de Oxidação da Me-PD, DM, AcAc, IAA e 5-OH-IAA na Ausência ou Presença de H_2O_2	108
4.7. Produção de ERO Durante Reações de Oxidação de Compostos β -Dicarbonílicos (PD, Me-PD, AcAc, CH e DM), IAA e 5-OH-IAA Catalisadas pela HRP na Ausência de H_2O_2	115
4.8. Avaliação da Oxidação da PD, Me-PD e IAA Catalisada pela Hemina ou Heme-proteínas na Ausência de H_2O_2	116
4.9. Estudo da Especificidade da HRP na Oxidação da PD na Ausência de H_2O_2	119

4. 10. Oxidação da Me-PD Catalisada pela Hemina ou Mioglobina na Ausência de H ₂ O ₂	122
4. 11. Mecanismo Proposto para Oxidação da PD Catalisada pela HRP, na Ausência de H ₂ O ₂	124
5. CONCLUSÕES	128
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
7. ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	140

1. INTRODUÇÃO

1.1. Peroxidases e *Horseradish Peroxidase* (HRP)

A peroxidase (E.C. 1.11.1.7) é encontrada em tecidos de vegetais, animais e microrganismos, sugerindo que tais enzimas devam ser uma parte essencial de todos seres vivos (BRUNETTI; FARIA-OLIVEIRA, 1996). As primeiras observações de reações catalisadas por peroxidase datam de 1855, quando um pedaço da raiz fresca de raiz forte (rábano, *Armoracia rusticana*, *horseradish*) foi colocado em uma tintura de resina de *Guaiacum*, desenvolvendo uma coloração fortemente azulada, decorrente da oxidação do 2,5-di-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3,4-dimetilfurano presente na tintura. Em 1898, Linossier isolou esta enzima e a chamou de peroxidase (CAMPA, 1991).

Peroxidases são enzimas que normalmente utilizam peróxido de hidrogênio para catalisar a oxidação de vários compostos orgânicos e inorgânicos, como por exemplo, mono, di, poli e aminofenóis, entre outros (FATIBELLO-FILHO; CRUZ VIEIRA, 2002).

São encontradas várias isoformas na maioria das espécies de frutas e vegetais e são relacionadas com alterações no sabor, textura e cor durante o armazenamento e decomposição das mesmas (DUARTE-VÁZQUEZ et al, 2000; HAMED et al, 1998).

Podem ser classificadas de acordo com a superfamília a que pertencem: a superfamília de peroxidases de mamíferos que incluem enzimas como a lactoperoxidase e mieloperoxidase; e a superfamília das peroxidases de vegetais, que foram divididas em três classes (DUNFORD, 1999):

Classe I: peroxidases intracelulares que incluem a citocromo C peroxidase de levedura (CCP), cloroperoxidase (CPO) e citosol ascorbato peroxidase (CAP);

Classe II: peroxidases fúngicas extracelulares, tais como a lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) de *Phanerochaete chrysosporium* e outras peroxidases que degradam ligninas obtidas a partir de basidiomicetos;

Classe III: peroxidases vegetais tais como a peroxidase de raiz forte (HRP - horseradish peroxidase).

Para quase todas as peroxidases vegetais conhecidas, o grupo prostético é a ferroprotoporfirina IX. Como pode ser observado na Figura 1, a heme peroxidase é caracterizada por um átomo de ferro (III) centralizado e pentacoordenado, ligado por quatro átomos de nitrogênio dos anéis pirrólicos (posições I, II, III e IV), a posição V

está localizada na face proximal do heme e é normalmente ocupada por uma cadeia lateral imidazólica de um resíduo de histidina. A posição VI na enzima nativa está livre e localizada sobre a face distal do heme. O heme possui ainda oito cadeias laterais das quais quatro são grupos metil (posições 1, 3, 5 e 8), dois grupos vinil (posições 2 e 4) e dois grupos propionato (posições 6 e 7) (DUNFORD, 1999).

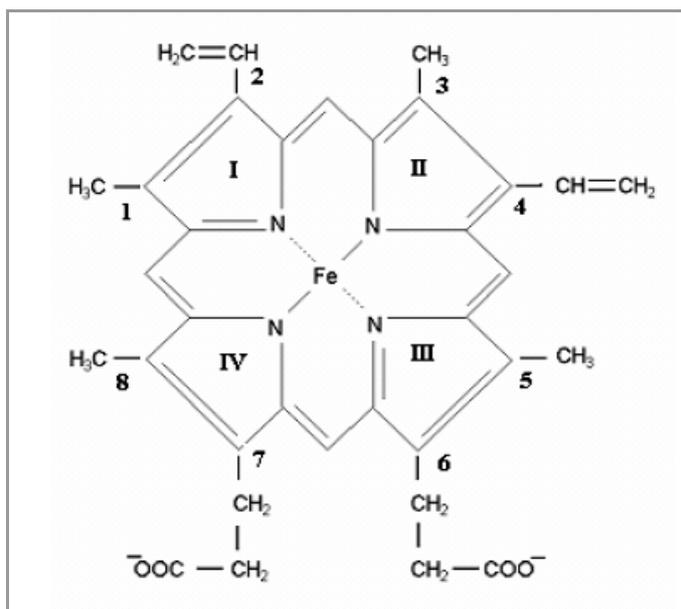


Figura 1. Grupamento heme ou ferroprotoporfirina, que representa o grupo prostético das peroxidases

A peroxidase de raiz forte (*horseradish peroxidase* ou HRP) é, provavelmente, a peroxidase mais estudada e pode ser facilmente extraída da planta “rábano silvestre ou raiz forte”, da qual provém seu nome. A planta é cultivada em regiões de clima temperado, suas raízes têm grande valor culinário, além de ser rica fonte de peroxidase. Essa enzima tem uma massa molecular de 42100 Da, é uma hemoproteína cujo grupo prostético, a ferroprotoporfirina IX, está ligada covalentemente à parte protéica da molécula. Além do ferro presente na HRP, esta também possui dois átomos de cálcio, que parecem ser importantes para a integridade estrutural e funcional da enzima, e podem ser removidos por incubação da peroxidase com guanidina ou EDTA. A perda do cálcio resulta em decréscimo na atividade enzimática e na estabilidade térmica (VEITCH, 2004). A HRP, na sua forma sólida, liofilizada, parece ser estável por mais tempo do que em solução, e

nesta forma, a temperatura de inativação está em torno de 140-160°C; já a HRP imobilizada em superfície de vidro, por exemplo, tem temperatura de inativação por volta de 80°C. Estudos demonstram que a adição de sacarose estabiliza a enzima contra a desnaturação térmica, com aumento dessa temperatura (RYAN et al, 1994). A HRP necessita de peróxido para sua ação catalítica, normalmente H₂O₂ ou perborato. Por outro lado, uma variedade de compostos inorgânicos e orgânicos, incluindo aldeídos, fenóis e aminas aromáticas, podem atuar como substratos doadores de hidrogênio (DUNFORD, 1991).

Além de ter uma ótima estabilidade térmica, a HRP também possui uma atividade numa faixa de pH relativamente grande (de pH 4 a 8) (PAUL, 1963). E ainda, existem poucos inibidores de HRP, e estes não estão usualmente presentes como interferentes em amostras de urina e sangue, por exemplo (RYAN et al, 1994)

A facilidade de obtenção, especificidade e características cinéticas das reações que participa, faz com que a HRP encontre larga aplicação como ferramenta analítica na área de análises clínicas (testes bioquímicos e imunoenzimáticos como o ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), controle de qualidade de alimentos (laticínios) e pesquisa biotecnológica, como também na obtenção de biosensores (ALONSO LOMILLO et al, 2003; BRUNETTI; FARIA-OLIVEIRA, 1996).

O termo *horseradish peroxidase* é genérico, visto que a raiz da planta contém diversas isoformas da enzima, das quais a HRP-C é a mais abundante. Muitas funções fisiológicas têm sido atribuídas à HRP, incluindo o metabolismo do ácido 3-indolacético (IAA), lignificação, ligação cruzada de polímeros de parede celular e resistência à infecções. A HRP-C é composta de um único polipeptídeo de 308 aminoácidos, que teve a sua seqüência determinada em 1976 (VEITCH, 2004).

As peroxidases possuem a capacidade de causar mudanças indesejáveis nos alimentos, como o desenvolvimento de sabor desagradável, alteração da cor e textura e/ou redução do valor nutricional. Contudo, sua capacidade de causar escurecimento, tem aplicações de interesse na indústria alimentícia, como por exemplo, na coloração do chá preto (DUARTE-VÁZQUEZ et al, 2000). Na indústria de papel e celulose é empregada na etapa de branqueamento da polpa e no tratamento de seus efluentes. Na indústria têxtil é utilizada para melhorar o branqueamento em detergentes de lavanderias e inibir a transferência de cor durante a lavagem. Em refinarias de petróleo, seu uso implica na oxidação de compostos fenólicos de efluentes (WILBERG, 2003).

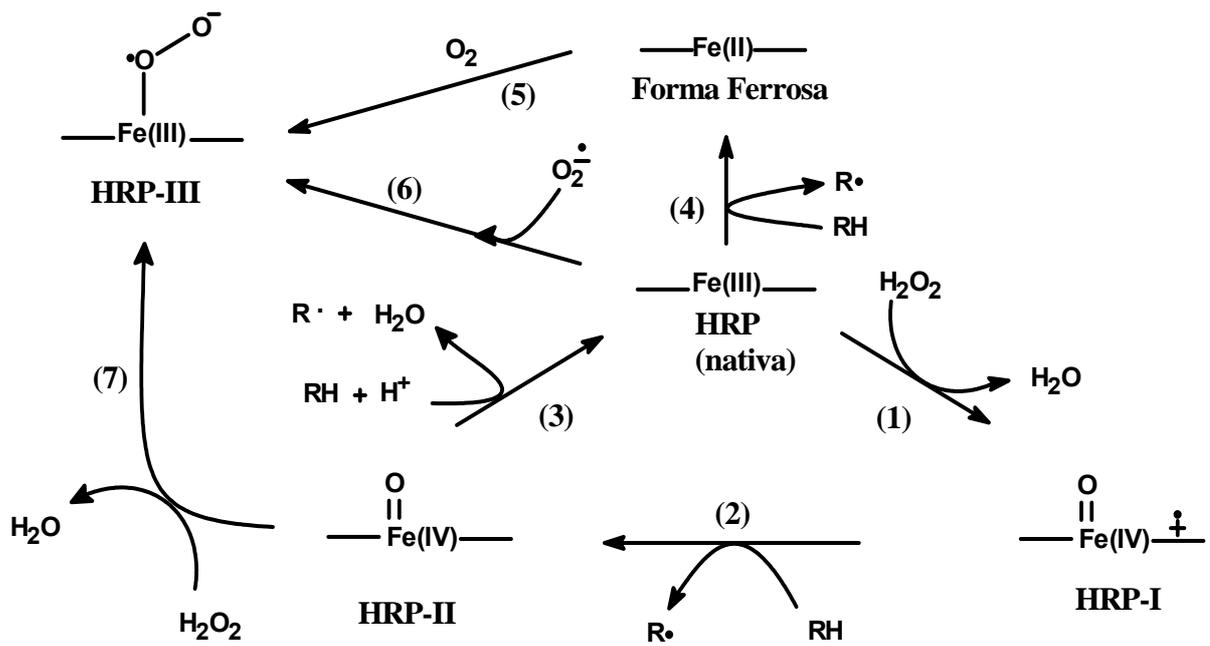
1.2. Mecanismo de Ação da HRP:

A HRP atua em geral sobre seus substratos através de um ciclo dependente de peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos, conforme mostra o Esquema 1 (reações 1 – 3)(DUNFORD, 1991):

- 1) Oxidação da HRP nativa pelo peróxido de hidrogênio levando à formação do composto I (HRP-I), que está dois níveis de oxidação acima da forma nativa, possui o átomo de ferro em estado de oxidação IV e o núcleo porfirínico deficiente em um elétron;
- 2) Abstração de um átomo de hidrogênio de um substrato redutor (RH) com conseqüente redução da HRP-I para HRP-II, na qual o elétron recebido é alocado no anel porfirínico e o próton retido pela cadeia polipeptídica, provavelmente por um resíduo de histidina, sendo que o átomo de ferro mantém o estado de oxidação IV;
- 3) Abstração de outro átomo de hidrogênio de uma segunda molécula do substrato redutor (RH) com a redução de HRP-II à forma nativa, ou seja, o retorno ao estado de oxidação III para o átomo de ferro.

Outra forma ativa importante da enzima é o chamado composto três (HRP-III) ou oxiperoxidase, que pode ser formada de várias maneiras (Esquema 1):

- i) Reação entre HRP nativa e ânion superóxido ou sua forma protonada (radical hidroperoxil HO_2^\bullet) (reação 6);
- ii) Reação entre a forma ferrosa da enzima e oxigênio (reação 5) e;
- iii) Reação entre HRP e excesso de peróxido de hidrogênio formando também o composto II como intermediário (reação 7) (DUNFORD, 1991; DUNFORD, 1999).



Esquema 1. Ciclo clássico da peroxidase e vias para produção da forma ferrosa e composto III (HRP-III). Ciclo peroxidásico clássico (reações 1 – 3), redução da forma férrica da enzima à forma ferrosa (reação 4), vias possíveis para formação de composto III (reações 5 – 7). (DUNFORD, 1991; DUNFORD, 1999)

1.3. Espectros na Região do Visível e Banda Soret da HRP e Seus Compostos Intermediários

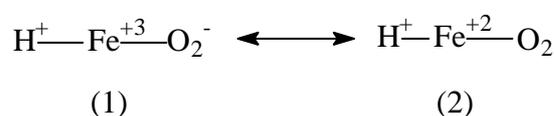
O mecanismo de ação das peroxidases não pode ser compreendido sem a aplicação das técnicas espectroscópicas, como por exemplo, as de espectroscopia óptica, ressonância Raman, absorção de raios x e difração, ressonância magnética nuclear e paramagnética eletrônica. As formas que a HRP pode se apresentar estão descritas a seguir (Figura 2) (BERGLUND et al, 2002; DUNFORD, 1999):

1.3.1. HRP Nativa: estudos espectrofotométricos demonstram que a principal característica da HRP nativa é o pico máximo da banda Soret localizado em 403 nm;

1.3.2. Composto I: nessa forma, o pico de absorção máxima na região da Banda Soret decresce aproximadamente pela metade, o que é válido também para a maioria das peroxidases (Figura 2A);

1.3.2. Composto II: o composto II mostra o pico de absorção máxima da banda Soret deslocado para a região de 420 nm, sendo este um pouco maior que o da enzima nativa; alguns trabalhos mostram um pico de banda Soret do composto II menos intenso, o que indica que menos de 100% da enzima está convertida à composto II. Finalmente, existem 2 bandas bem definidas na região do visível (527 e 554 nm). O composto II é mais estável do que o composto I, portanto, mais fácil de ser caracterizado;

1.3.3. Composto III: é postulado como um complexo do íon férrico com superóxido, e pode estar em duas formas:



Em geral a forma (1) é dominante e altamente reativa. O composto III costuma apresentar a banda Soret deslocada para 417 nm e banda dupla no visível em 544 e 580 nm (Figura 2B).

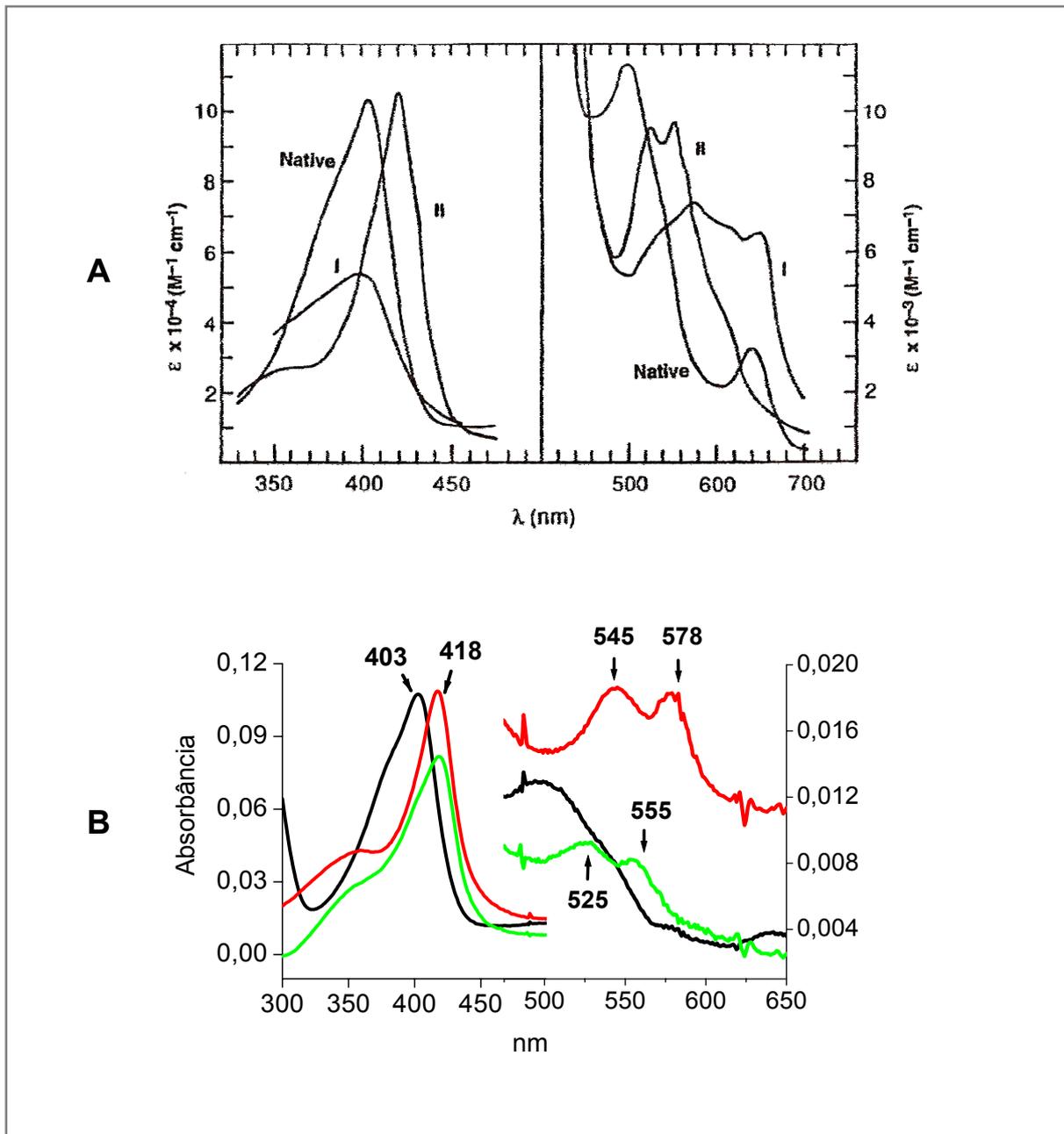
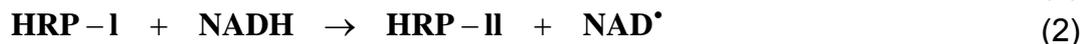


Figura 2. Espectro UV-Vis da *Horseradish Peroxidase* e suas formas em diferentes estados de oxidação (adaptado de DUNFORD, 1999)

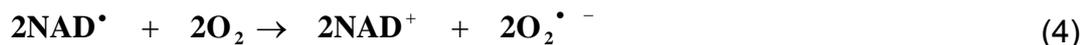
1.4. Reações Oxidase-Peroxidase

Oxidases são enzimas que têm a capacidade de transferir elétrons para o oxigênio molecular. O NADH é o exemplo clássico de substrato do ciclo oxidásico, como também do peroxidásico da HRP. Na presença de oxigênio, a reação HRP/NADH forma o composto III da HRP (HRP-III), que desaparece após o consumo completo de oxigênio, e uma mistura das formas férrica e ferrosa da HRP é obtida. A reoxigenação do meio reacional regenera a HRP-III (DUNFORD, 1999).

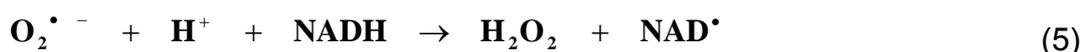
A autooxidação de NADH a NAD^+ é um processo lento e leva ao aparecimento de H_2O_2 . No sistema peroxidase-oxidase, o H_2O_2 gerado na autooxidação do NADH pode dar início ao ciclo peroxidásico clássico, gerando NAD^\bullet , como nas reações seguintes (reações 1-3) (KIRKOR; SCHEELINE, 2000):



O NAD^\bullet pode dar seqüência a outras reações do ciclo oxidativo (reação 4) (DUNFORD, 1999; KIRKOR; SCHEELINE, 2000):



A dismutação do $\text{O}_2^{\bullet -}$ gerado forma H_2O_2 e este é regenerado para o ciclo da peroxidase. O H_2O_2 também pode ser produto de uma reação mais eficiente (reação 5) (DUNFORD, 1999):



Dando seqüência às reações oxidativas, também pode ocorrer (reação 6) (KIRKOR; SCHEELINE, 2000):



Resultados similares a este foram encontrados em outros sistemas HRP/O₂ e os substratos ácido 3-indolacético e diidroxifumarato (DUNFORD, 1999).

1.5. Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e de Nitrogênio (ERN)

Os radicais livres são moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados no orbital molecular ligante, ou seja, ocupando um orbital molecular sozinho (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). A existência de tais espécies foi primeiramente descrita em torno de 1900, mas ganharam importância em 1940, com a introdução de técnicas que permitiam sua detecção (BERGENDI et al, 1999). Além das espécies radicalares, outras espécies com oxigênio na sua composição, também apresentam extraordinária reatividade, com grande capacidade de interação com vários outros componentes da estrutura celular. O termo espécies reativas de oxigênio (ERO) também é utilizado para designar espécies que não são radicais livres, mas derivados de oxigênio, as quais também são capazes de gerar radicais livres, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000).

A evolução do estudo sobre ERO no meio biológico acentou-se com a identificação de enzimas que usam como substrato radicais livres, e progrediu para a identificação de vias metabólicas geradoras de tais espécies, bem como com a detecção dos efeitos celulares e tissulares quando as ERO atingem altas concentrações no organismo, e em especial a associação de ERO com várias patologias e sua participação em vias de sinalização celular. Atualmente, o conhecimento dos mecanismos de formação e regulação das ERO são de grande importância para a compreensão dos eventos celulares relacionados ao controle da sobrevivência, morte e proliferação celular (VALKO et al, 2006).

Assim como as ERO, as ERN também são dotadas de grande reatividade, apresentando um duplo papel nos sistemas biológicos, já que podem ser benéficas e essenciais ou então deletérias para um organismo vivo (VALKO et al, 2006).

1.6. Principais ERO e ERN Geradas no Organismo

As formas de vida aeróbias estão constantemente sujeitas ao efeito oxidante dos metabólitos reativos de oxigênio e de nitrogênio. As ERO formadas *in vivo* apresentam diferenças principalmente quanto à reatividade e tempo de meia vida.

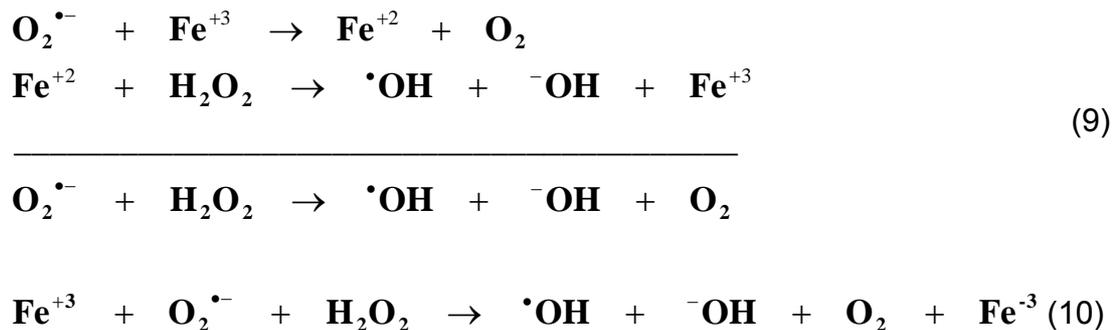
1.6.1. Radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$): é o mais comum e abundante na célula. Formado a partir da redução parcial do oxigênio molecular por um elétron. É um produto de cadeia transportadora de elétrons ou da ação de fagócitos para defesa bactericida (DIAZ et al, 1998). Os fagócitos produzem $O_2^{\bullet -}$ durante a fagocitose devido à ativação da enzima NADPH oxidase presente na membrana dessas células. Algumas biomoléculas, como por exemplo, hemoglobina, mioglobina e catecolaminas, autoxidam-se gerando $O_2^{\bullet -}$, e podem atuar como propagadores de cadeias radicalares. O $O_2^{\bullet -}$ sofre decomposição enzimática numa velocidade aproximada de $5 \times 10^5 \text{ (mol/L)}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em pH 7,0 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000).

1.6.2. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2): não é um radical livre por definição, porém, é importante devido ao poder de permear membranas e possibilitar reações com alvos biológicos em compartimentos distantes de seu local de formação (HANCOCK et al, 2001). É formado a partir da redução do oxigênio molecular por dois elétrons (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990), pela dismutação espontânea do $O_2^{\bullet -}$ ou pela ação da superóxido dismutase (SOD) (FRIDOVICH, 1998; HAMPTON et al, 1998). O H_2O_2 tem atividade bactericida somente em altas concentrações (HYSLOP et al, 1995) e pode ser substrato de peroxidases ou catalases intracelulares, resultando na produção de H_2O e O_2 . Sua meia vida depende da decomposição enzimática (reações 7 e 8) (HAMPTON et al, 1998),



1.6.3. Radical hidroxil ($^{\bullet}OH$): é a mais reativa das ERO em meio biológico e em teoria, pode oxidar qualquer molécula biológica, assim, é provável que sua ação seja

próxima ao sítio de geração (HALLIWELL; GUTERIDGE, 1990). É formado a partir da redução do oxigênio molecular por três elétrons nas reações de Fenton (reação 9) e de Haber-Weiss (reação 10), catalisadas por metais de transição. Sua formação ocorre em locais adjacentes à produção de $O_2^{\bullet -}$ / H_2O_2 na presença de metais (principalmente ferro).



O radical hidroxil é extremamente reativo, ou seja, uma vez formado, tem uma meia vida bastante curta (aproximadamente 10^{-9} s), reagindo rápida e inespecificamente com os alvos mais próximos, podendo assim lesar DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos. O organismo não dispõe de sistema enzimático de defesa contra esse radical, o que pode explicar seu poder de lesar superior às outras ERO. Em função da ocorrência dessas reações, a compartimentalização de compostos metálicos nos vacúolos e o estoque de ferro pela ferritina podem ser considerados parte das defesas antioxidantes da célula (HALLIWELL; GUTERIDGE, 2000).

1.6.4. Oxigênio singlete (1O_2): é o primeiro estado eletronicamente excitado do oxigênio molecular. O 1O_2 é capaz de modificar o DNA diretamente (CADENAS, 1989). Pode ser gerado por fagócitos, por reações catalisadas por peroxidases, por reação do H_2O_2 com ácido hipocloroso (HOCl), pela dismutação espontânea do $O_2^{\bullet -}$ (CADENAS, 1989; STEINBERG et al, 1992). Seu tempo de meia vida é de 10^{-5} segundos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Pode reagir com lipídeos de membranas, proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, carboidratos e tióis (RYTER; TYREL, 1998).

1.6.5. Radical peroxil (RO_2^\bullet) e alcoxil (RO^\bullet): formados a partir de hidroperóxidos orgânicos. É a ERO que tem o maior tempo de meia vida (7 segundos) é um intermediário na peroxidação dos lipídeos de membrana (VALKO et al, 2006).

1.6.6. Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN): o óxido nítrico (NO^\bullet), tem os elétrons desemparelhados centrados no átomo de nitrogênio; esta espécie pode reagir com outras ERO, principalmente $\text{O}_2^{\bullet -}$, gerando peroxinitrito (OONO^-) e outros produtos tóxicos, capazes de danificar proteínas e induzir lipoperoxidação (CARRERAS et al, 1994; MONCADA, 1994). O óxido nítrico NO^\bullet é sintetizado em vários tipos celulares e tecidos por uma sintase específica de óxido nítrico (NOSs) que metaboliza arginina à citrulina com a formação de NO^\bullet através de uma reação oxidativa. A produção excessiva de ERN é denominada de estresse nitrosativo e este pode alterar a estrutura de proteínas, prejudicando suas funções normais. O NO^\bullet tem um tempo de meia vida de poucos segundos em meio aquoso e sua estabilidade aumenta em baixas concentrações de oxigênio (tempo de meia vida maior que 15 segundos). As células do sistema imune produzem tanto NO^\bullet como $\text{O}_2^{\bullet -}$ durante o surto oxidativo disparado durante processos inflamatórios, condição na qual o OONO^- pode ser gerado. O NO^\bullet pode se ligar facilmente a metais de transição e é solúvel tanto em sistemas hidrofílicos como lipofílicos, o que facilita sua difusão através do citoplasma e membranas plasmáticas. Atua como importante molécula sinalizadora em diversos processos fisiológicos, incluindo a neurotransmissão, regulação da pressão arterial, mecanismos de defesa, relaxamento de músculos lisos e regulação imune (VALKO et al, 2006).

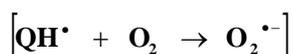
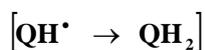
A membrana celular é um dos primeiros alvos das espécies reativas, e sua função é vital para a célula; as membranas que revestem organelas intracelulares como mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleo, entre outras, apresentam componentes bilipídicos, proteínas e carboidratos, que também podem ser atacadas por ERO e ERN (AYDIN, 2006).

Apesar dos efeitos deletérios acima listados, ERO e ERN são essenciais para a vida devido ao seu papel em muitos processos vitais assim como transdução de sinal e a atividade bactericida dos fagócitos (CONKLIN, 2004).

1.7. Papel Fisiológico das ERO: Sítios de Formação e Efeitos

O radical superóxido é a primeira das espécies formadas pela redução unieletrônica do oxigênio molecular e dá origem a outras espécies reativas. Existem várias vias metabólicas onde o radical superóxido é formado, dentre as quais se destacam:

1.7.1. Cadeia Transportadora de Elétrons Mitocondrial: essa via ocorre em todas as células aeróbias, cerca de 2 a 5% do oxigênio consumido na cadeia respiratória é destinado à formação de radical superóxido, devido ao escape de elétrons dos complexos que compõem a cadeia respiratória (Figura 3). A redução completa da ubiquinona (coenzima Q) forma um intermediário radicalar semiquinona, que pode ser oxidado pelo O₂ molecular, dando origem ao O₂^{•-}, como pode ser visto no Esquema 2 (DRÖGE, 2002):



Esquema 2. Redução da Ubiquinona e formação do O₂^{•-}; onde: e⁻ = elétrons, Q= Ubiquinona, QH = forma semiquinona de Q, QH₂ = Q reduzida

Há evidências que a membrana mitocondrial é quantitativamente, a mais importante fonte de O₂^{•-} nos organismos (DRÖGE, 2002). Como consequência, a mitocôndria é altamente rica em antioxidantes, incluindo glutathiona reduzida (GSH) e enzimas, assim como superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx), que estão presentes em ambos os lados das suas membranas, com a finalidade de minimizar o estresse oxidativo na organela. Na Figura 3, observa-se que o O₂^{•-} formado em ambos os lados da membrana mitocondrial interna são eficientemente detoxificados à H₂O₂ e posteriormente à H₂O pela Cu, Zn-SOD (membrana mitocondrial interna, espaço inter-membrana) e Mn-SOD (matriz mitocondrial) (VALKO et al, 2006).

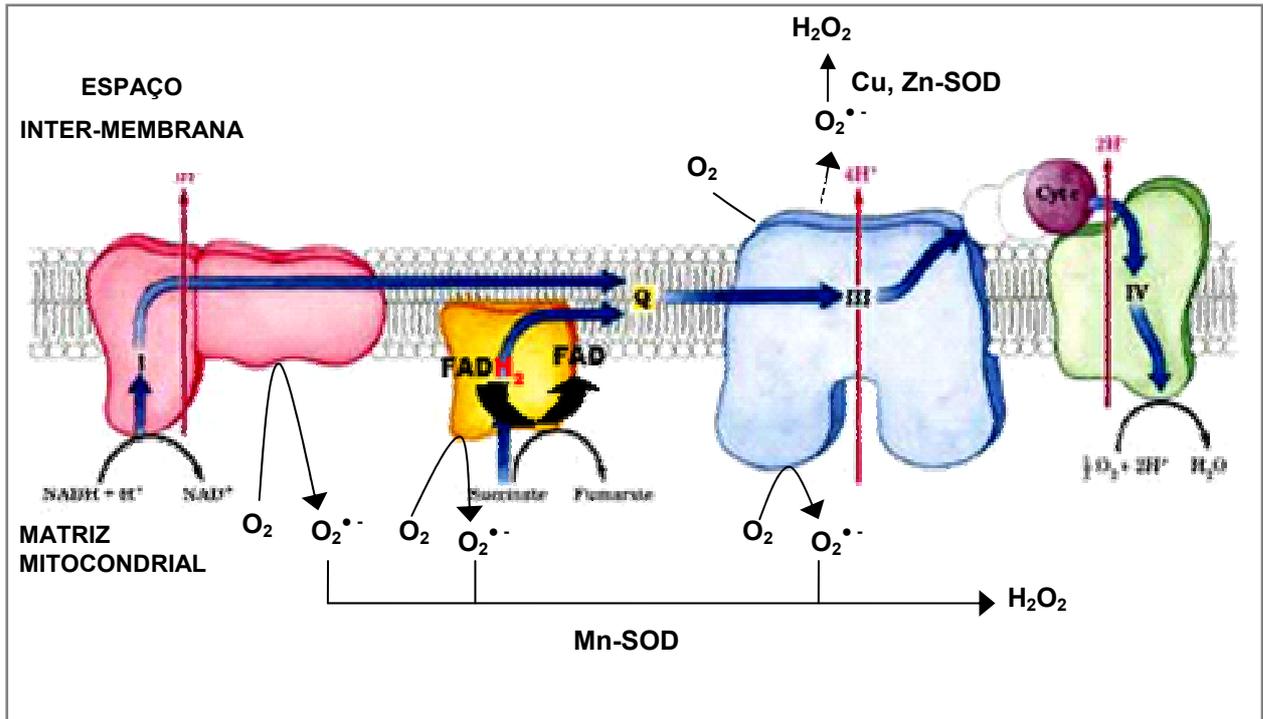


Figura 3. Formação de radicais livres na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (adaptado de CERQUEIRA et al, 2007)

1.7.2. Via da NAD(P)H Oxidase em Fagócitos: durante o processo de fagocitose, ocorre a ativação do complexo NADPH oxidase presente na membrana de células fagocíticas (Figura 4), tendo como consequência a redução do O_2 molecular a $O_2^{\bullet -}$. A maior parte do $O_2^{\bullet -}$ é convertido a H_2O_2 pela ação catalítica da SOD ou por dismutação espontânea. O H_2O_2 formado no fagolisossoma dos fagócitos é consumido pela reação catalisada pela mieloperoxidase (MPO) (existente nos grânulos azurófilos) na oxidação de várias substâncias, em especial o íon cloreto, formando um potente bactericida, o ácido hipocloroso (HOCl)(Figura 4). O HOCl é um oxidante extremamente forte, que ataca biomoléculas fisiologicamente importantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

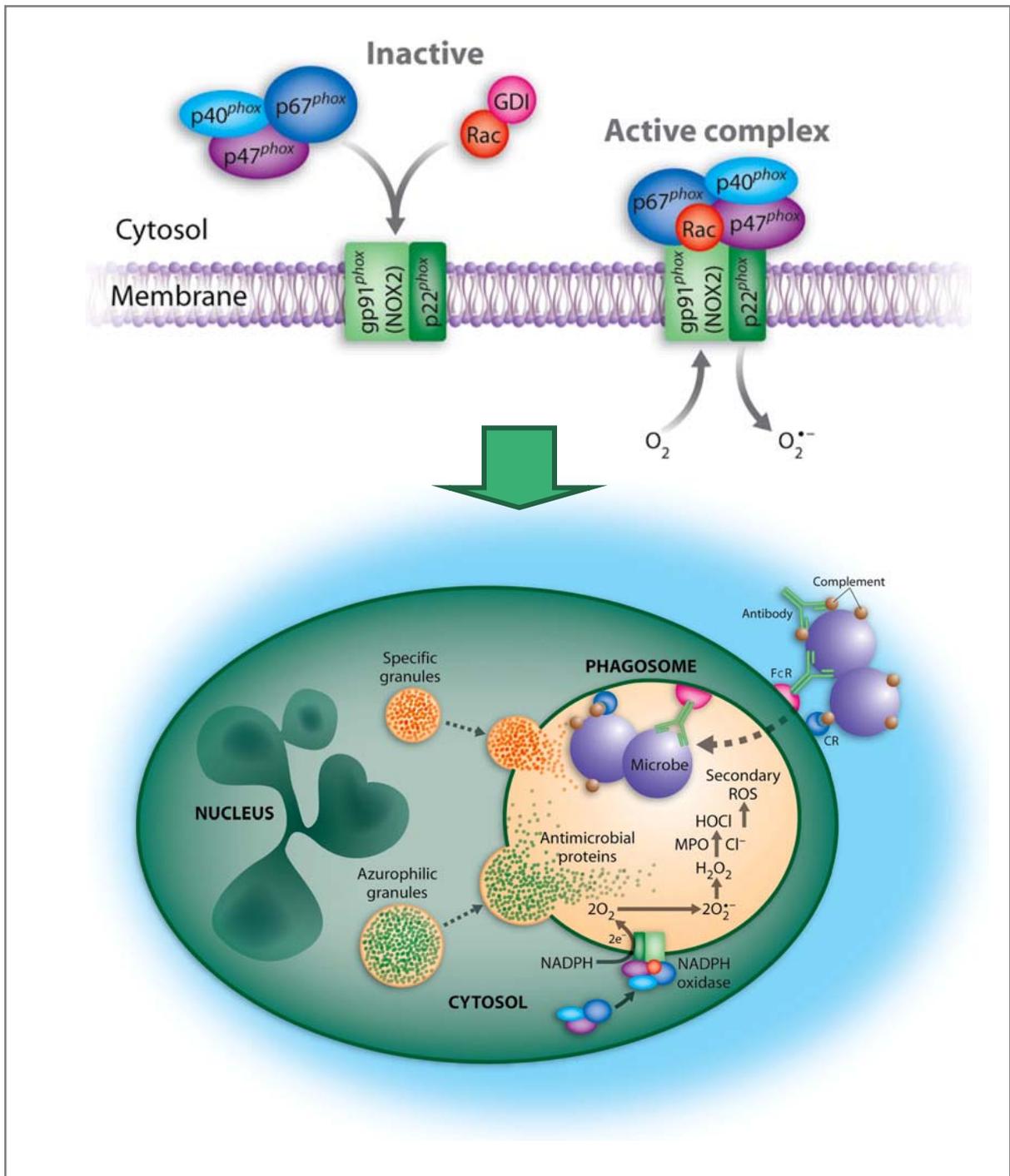


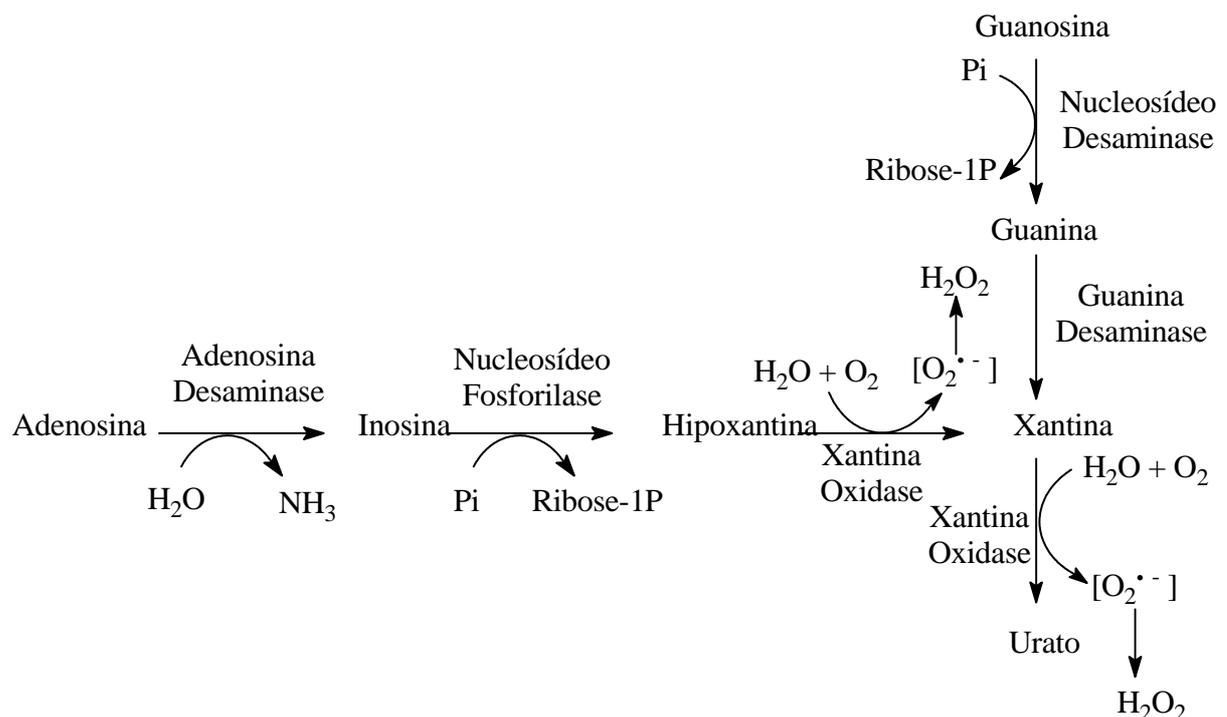
Figura 4. Ativação do complexo NADPH oxidase da membrana do fagócito e formação de ERO (adaptado de QUINN et al, 2006). Proteínas citossólicas phox e Rac migram até o fagossomo ou membrana plasmática para formar o complexo gerador de O₂⁻ ativo. Receptores de complemento e de anticorpos (CRs e FcRs) promovem a entrada de microrganismos no fagócito, que inicia desgranulação e produção de ERO.

Estudos recentes relatam a possibilidade da geração de ERO intracelular não estar restrita às células fagocíticas, mas também a outros tipos celulares, inclusive as células modificadas. A geração de ERO em células não fagocíticas parece envolver a atividade de vias sinalizadoras, assim como receptores de citocinas, receptores acoplados à proteína G e receptores tirosina e serina/treonina quinases (PERVAIZ; CLEMENT, 2007).

A NAD(P)H oxidase da parede vascular apresenta um importante papel tanto em processos fisiológicos, assim como regulação da pressão sanguínea, crescimento, modificação e migração da matriz extracelular, como também em patologias, incluindo a aterosclerose e a hipertensão. No sistema vascular, a produção de ERO pela NAD(P)H oxidase tem sido observada em fibroblastos da camada adventícia, em células endoteliais e do músculo liso, participando na regulação da disponibilidade de óxido nítrico (NO^\bullet) e processos de sinalização. Níveis reduzidos de NO^\bullet causam disfunção endotelial, contribuindo para hipertensão e outras doenças vasculares. Contudo, existem inúmeras hipóteses sugeridas para explicar a diminuição dos níveis de NO^\bullet , mas a maioria dos estudos relata que o efeito é causado pela reação do NO^\bullet com ERO vasculares, principalmente pela reação do NO^\bullet com $\text{O}_2^{\bullet-}$, que é uma das mais rápidas reações bioquímicas. Assim, nesta reação, o NO^\bullet pode ser consumido rapidamente, afetando diretamente o relaxamento vascular e ainda, formando peroxinitrito (OONO^-), que tem a capacidade de provocar vários efeitos deletérios. Também existem outras vias a serem consideradas na etiologia da hipertensão (QUINN et al, 2006). A dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ pela SOD leva à formação de H_2O_2 , uma ERO mais estável, que implica na regulação de vias sinalizadoras que levam ao crescimento de musculatura lisa vascular, contração, migração e inflamação (LYLE; GRIENDLING, 2006). Estima-se que a NADPH oxidase vascular produza cerca de um terço do $\text{O}_2^{\bullet-}$ produzido pelo complexo enzimático similar em neutrófilos e, além disso, enquanto a liberação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ em fagócitos é imediata, em células endoteliais, da musculatura lisa vascular ou fibroblastos, leva de minutos a horas para ser produzido. Uma característica importante da oxidase cardiovascular é sua resposta a hormônios, forças hemodinâmicas, e alterações metabólicas locais. A angiotensina II aumenta a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ via NAD(P)H oxidases em células do músculo liso vascular em cultura e em fibroblastos da camada adventícia da aorta. A trombina, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de necrose tumoral- α (TNF- α)

também estimulam a produção de $O_2^{\bullet -}$ pela NAD(P)H oxidase. Em relação a alterações metabólicas, a reoxigenação e aumento de lactato estimulam a atividade da NADH oxidase em miócitos cardíacos. As ERO formadas por essa via podem ainda contribuir para a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), dando seqüência à formação e eventual ruptura de placa aterosclerótica (GRIEDLING et al, 2000).

1.7.3. Via da Xantina Oxidase: a xantina oxidase é uma flavoproteína que participa do catabolismo das purinas, promovendo a oxidação da xantina ao ácido úrico, como podemos observar no esquema 3. Na reação há formação de $O_2^{\bullet -}$ que participa como intermediário nas reações que formam H_2O_2 (VALKO et al, 2006).



Esquema 3. Formação de ERO a partir da síntese do ácido úrico

1.7.4. Outras Vias: O sistema microsomal das monooxigenases, presentes principalmente no retículo endoplasmático liso, está envolvido no metabolismo de xenobióticos, que são hidroxilados para que sua polaridade aumente e facilite reações de conjugação e posterior excreção. O radical $O_2^{\bullet -}$ é um intermediário da

1.8. Mecanismos de Defesa Antioxidante

O efeito das espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio é equilibrado pela ação de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que têm como função a remoção destas espécies, protegendo assim o organismo. Os antioxidantes enzimáticos mais eficientes envolvem a SOD, catalase e a glutathione peroxidase, enquanto os não enzimáticos são: as vitaminas C e E, carotenóides, antioxidantes tióis, flavonóides naturais, melatonina e outros. O local de atuação dos antioxidantes dentro de uma célula depende de sua solubilidade, a vitamina C, por exemplo, reage com $O_2^{\bullet -}$ em fase aquosa, enquanto a vitamina E o faz em meio hidrofóbico (VALKO et al, 2006).

1.8.1. Sistemas Antioxidantes Enzimáticos:

1.8.1.1. Superóxido Dismutase (SOD – E.C. 1.15.1.1): é um dos mais efetivos antioxidantes enzimáticos intracelulares, catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet -}$ a oxigênio e peróxido de hidrogênio (reação 11).



A SOD foi isolada em 1939, mas somente em 1969, sua atividade antioxidante foi demonstrada (McCORD; FRIDOVICH, 1969). Existe em isoformas diferentes, que dependem do metal no sítio ativo, número de subunidades, cofatores e outras características. Em humanos existem 3 isoformas de SOD (VALKO, 2006):

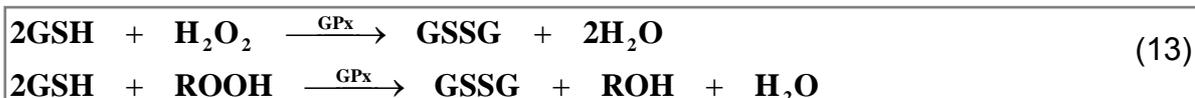
- I. **Cu, Zn-SOD citossólica:** apresenta massa molecular de 32 KDa, composta por 2 subunidades idênticas (homodímero), sua atividade independe de pH na faixa de 5 a 9,5.
- II. **Mn-SOD mitocondrial:** é um homotetrâmero de 96 KDa, contém um átomo de Mn^{+2} por subunidade; é uma das mais efetivas enzimas antioxidantes e tem atividade anti-tumoral, retardando o crescimento do tumor. Mas também há estudos demonstrando que índices elevados de Mn-SOD estão relacionados com aumento do poder invasivo de células neoplásicas.

III. **SOD extracelular (EC-SOD):** é uma glicoproteína tetramérica que contém Cu^{+2} e Zn^{+2} , com alta afinidade por certos glicosaminoglicanos, como a heparina.

1.8.1.2. Catalase (E.C. 1.11.1.6): encontrada em plantas, animais e bactérias aeróbias, localizada nos peroxissomos, promove a conversão de peróxido de hidrogênio a água e oxigênio molecular (reação 12). A catalase é uma das enzimas com “turnover” dos mais elevados: uma molécula de catalase pode converter aproximadamente seis milhões de moléculas de peróxido de H_2O_2 à H_2O e O_2 por minuto (MATES et al, 1999).



1.8.1.3. Glutathiona Peroxidase: existem duas formas da enzima, uma que é independente de selênio (glutathiona-S-transferase, GST, E.C. 2.5.1.18) e outra dependente de selênio (GPx, E.C. 1.11.1.19). As duas diferem no número de subunidades, nas ligações do selênio no sítio ativo e no mecanismo catalítico. Os Homens tem quatro diferentes glutathionas peroxidases dependentes de selênio (MATES et al, 1999). A GPx atua em conjunto com o tripeptídeo glutathiona (GSH), está presente nas células em altas concentrações, utiliza como substrato H_2O_2 ou um peróxido orgânico (ROOH), que são decompostos em H_2O (ou álcool) enquanto, simultaneamente, oxidam GSH (reação 13)(VALKO, 2006).



1.8.2. Antioxidantes Não Enzimáticos:

1.8.2.1. Vitamina C (Ácido Ascórbico): é uma vitamina hidrossolúvel e plantas e muitos animais podem sintetizá-lo através de glicose, mas humanos e outros primatas perderam umas das enzimas necessárias para a sua biosíntese durante o processo evolutivo, com obtenção através da dieta (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1996).

O ácido ascórbico apresenta dois grupos hidroxil ionizáveis, em pH fisiológico, 99,9% da vitamina C está na forma monoprotionada (AscH^-) e porções muito pequenas de AscH_2 e Asc^{2-} (Figura 6). O AscH^- reage com os radicais produzindo o radical ascorbato tricarbonil (AscH^\bullet), que se converte à forma de radical semi-deidroascorbato ($\text{Asc}^{\bullet-}$), que é uma molécula pequena, pouco reativa, sendo sua monitoração útil para avaliar o estresse oxidativo. Acredita-se que a vitamina C proteja membranas contra oxidação, mas em contraste, é capaz também de promover a formação de radical hidroxila na presença de íons metálicos, em fluidos biológicos (VALKO et al, 2006).

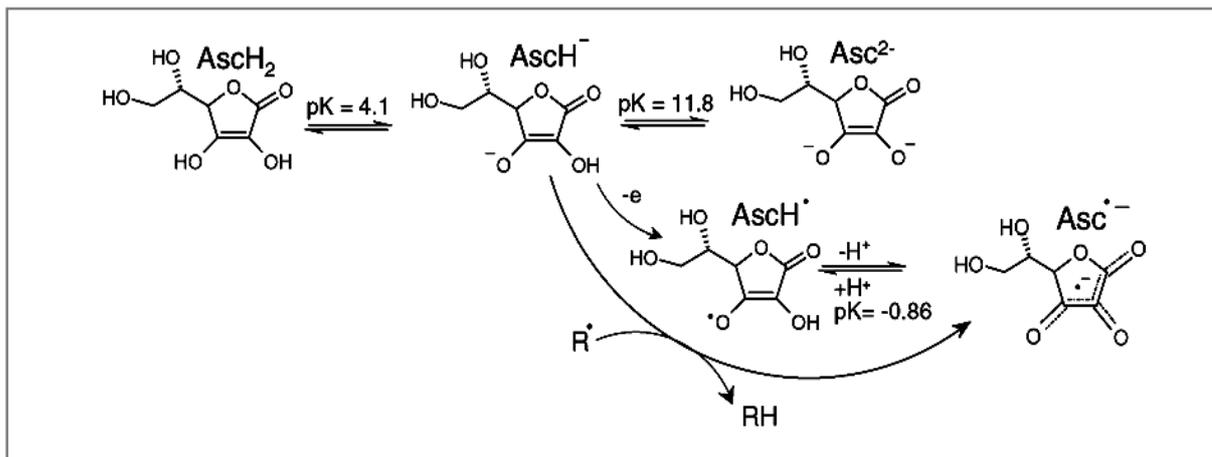


Figura 6. Formas do ácido ascórbico e reações com radicais (adaptado de VALKO et al, 2006)

1.8.2.2. Vitamina E: é uma vitamina lipossolúvel, que existe em diferentes formas, sendo que a mais ativa é a α -tocoferol. Sua principal função antioxidante é a proteção contra lipoperoxidação (PRYOR, 2000). Estudos recentes sugerem que a vitamina C e E atuam em conjunto. Durante a reação antioxidante, o α -tocoferol é convertido a um radical tocoferil pela doação de um átomo de hidrogênio para um radical peroxil lipídico. O radical α -tocoferil pode ser reduzido à forma α -tocoferol original pelo ácido ascórbico (Figura 7) (KOJO, 2004).

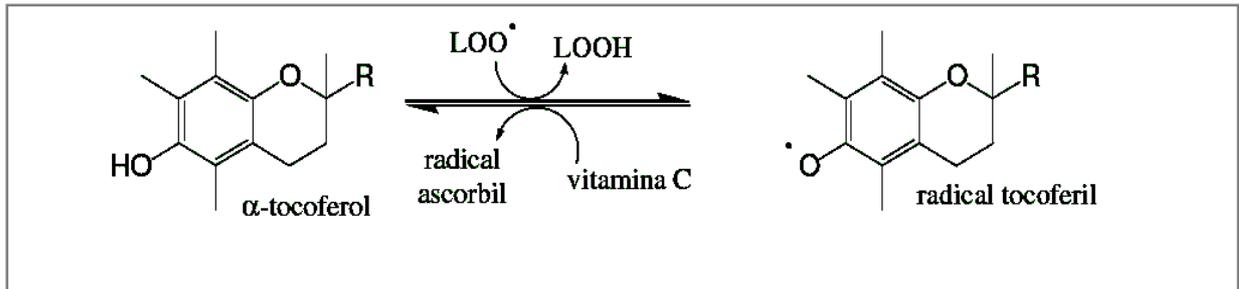


Figura 7. Comportamento sinérgico das vitaminas C e E

1.8.2.3. Antioxidantes Tióis:

1.8.2.3.1. Glutathiona (GSH): é um tripeptídeo (Figura 7) que funciona como um antioxidante intracelular não enzimático multifuncional. Apresenta-se em grandes quantidades no citossol (1-11 mol/L), núcleo (3-19 m mol/L) e mitocôndria (5-11 m mol/L) e é o antioxidante mais solúvel nesses compartimentos celulares. A forma reduzida da glutathiona é GSH e a oxidada é GSSG (glutathiona dissulfeto) (Figura 8).

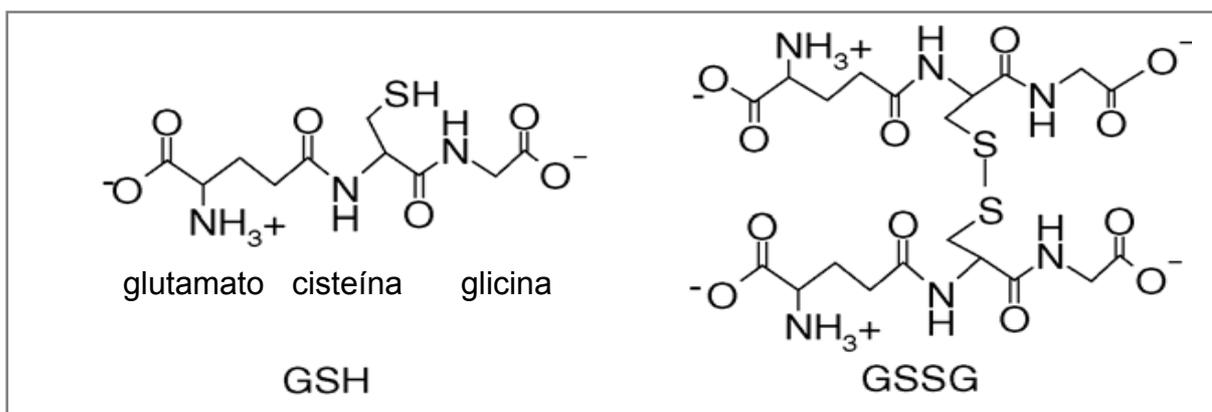


Figura 8. Glutathiona e sua forma oxidada

A GSH no núcleo é importante para manter o estado redox de proteínas-sulfidríla que são necessárias para a expressão e reparo de DNA. A capacidade antioxidante de compostos tióis é devido ao átomo de enxofre que pode ser facilmente oxidado (VALKO et al, 2006). A reação genérica da glutathiona com um radical é descrita da seguinte maneira (reação 14):



Os radicais GS• podem dimerizar para a forma não radical, glutathiona oxidada (GSSG) (reação 15):



A GSSG acumula-se dentro da célula e a proporção GSH/GSSG é considerada uma boa maneira de monitorar o estresse oxidativo em um organismo (VALKO et al, 2006).

Os principais papéis protetores da GSH contra estresse oxidativo são (JONES et al, 2000):

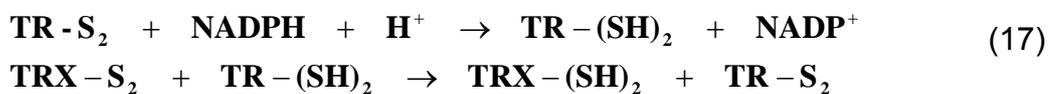
- i) É um cofator para várias enzimas antioxidantes contra o estresse oxidativo, por exemplo, glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona transferase e outras;
- ii) Participa do transporte de aminoácidos através da membrana plasmática;
- iii) Seqüestra HO• e ¹O₂ diretamente, detoxificando H₂O₂ e peróxidos de lipídeos por ação catalítica da glutathiona peroxidase;
- iv) É capaz de regenerar a vitamina C e E à suas formas ativas.

A GSH protege as células contra apoptose através de regulação de estado redox celular e interação com sinais anti e pró-apoptóticos; sendo assim, a eficácia de alguns fármacos contra o câncer que induzem apoptose, requerem depleção de GSH, facilitando o tratamento (VALKO et al, 2006)

1.8.2.3.2. Sistema Tioredoxina [TRX, TRX-S₂/TRX-(SH)₂]: As tioredoxinas são proteínas pequenas com duas cisteínas redox-ativas e que possuem uma seqüência conservada (cys-gly-pro-cys), essencial para sua função. A TRX contém dois grupos SH na sua forma reduzida que é convertida a uma unidade dissulfeto na reação catalisada pela TRX oxidase em reação redox com várias proteínas (reação 16):



A redução do dissulfeto á forma ditiol ocorre via reação catalisada pela tioredoxina redutase (TR), que utiliza como fonte de elétrons a NADPH (reação 17):



Existem vários dados experimentais relacionando a tioredoxina ao câncer e que demonstram (VALKO, 2006):

- i) Níveis elevados de TRX têm sido associados com vários tipos de câncer, incluindo carcinoma cervical, hepatoma, tumores gástricos, carcinoma de pulmão e coloretal;
- ii) Muitas células cancerosas secretam TRX;
- iii) TRX é capaz de estimular o crescimento de uma grande variedade de linhagens celulares de leucemia e tumores sólidos humanos;
- iv) A super-expressão de TRX protege as células da apoptose induzida por danos oxidativos e proporcionam a sobrevida e o crescimento dos tumores;
- v) Níveis elevados de tioredoxina em tumores humanos podem causar resistência à quimioterapia,

1.8.2.4. Ácido Lipóico: é um composto natural derivado do ácido octanóico, solúvel tanto em água como em lipídeos, o que explica sua ampla distribuição nas células. É absorvido na dieta e reduzido à sua forma ácido diidrolipóico. Ambas formas tem poder antioxidante, seqüestrando ERO, regenerando antioxidantes endógenos e exógenos (como vitaminas C e E e glutathiona), quelando metais, reparando proteínas oxidadas. O efeito do ácido lipóico tem sido associado com melhora de vários processos patológicos que envolvem estresse oxidativo, como diabetes, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares e outras (BUSTAMANTE et al, 1998).

1.8.2.5. Carotenóides: são pigmentos encontrados em microrganismos e plantas, seu poder antioxidante reside na capacidade de capturarem radicais livres e outras espécies, como oxigênio singlete. Em concentrações suficientemente altas,

os carotenóides protegem lipídeos de peroxidação. Geralmente os mecanismos de reação de radicais com carotenóides são: adição radical, abstração de hidrogênio do carotenóide e reação de transferência de elétrons (EL-AGAMEY et al, 2004). A capacidade antioxidante ocorre em baixa pressão parcial de oxigênio, mas pode perder essa capacidade em alta pressão de oxigênio; a concentração de carotenóides também influencia suas propriedades anti/pró-oxidante de maneira similar, em altas concentrações, acredita-se que prevaleça a ação pró-oxidante. Muitos carotenóides tem mostrado efeito anti-proliferativo em várias linhagens de células tumorais, como o licopeno, por exemplo, que se mostra capaz de inibir ciclo de progressão nos tumores de mama, pulmão e próstata (KARAS et al, 2000).

1.8.2.6. Flavonóides: são compostos polifenólicos, potentes antioxidantes, capazes de atuar como aceptores de radicais livres ou de íons metálicos. Estão presentes em frutas e vegetais, estando presente em quantidade considerável na dieta humana. Existem mais de 4000 compostos descritos, a característica estrutural comum é a molécula de difenilpropano, que consiste de dois anéis aromáticos ligados através de três átomos de carbono, formando um composto heterocíclico oxigenado (Figura 9). O consumo desses compostos tem sido frequentemente associado a tratamento e prevenção de várias patologias, como por exemplo, câncer e doenças cardiovasculares. Sob certas condições, como altas concentrações destes compostos e pH alto, podem comportar-se como pró-oxidantes. Vários fatores podem afetar a atividade biológica dos flavonóides, como sua natureza, a posição dos substituintes e o número de hidroxilas. Esses fatores determinarão se um flavonóide estará atuando como antioxidante, modulador de atividade enzimática, ou se possui atividade anti-mutagênica ou citotóxica (SCHROETER et al, 2002; VALKO et al, 2006).

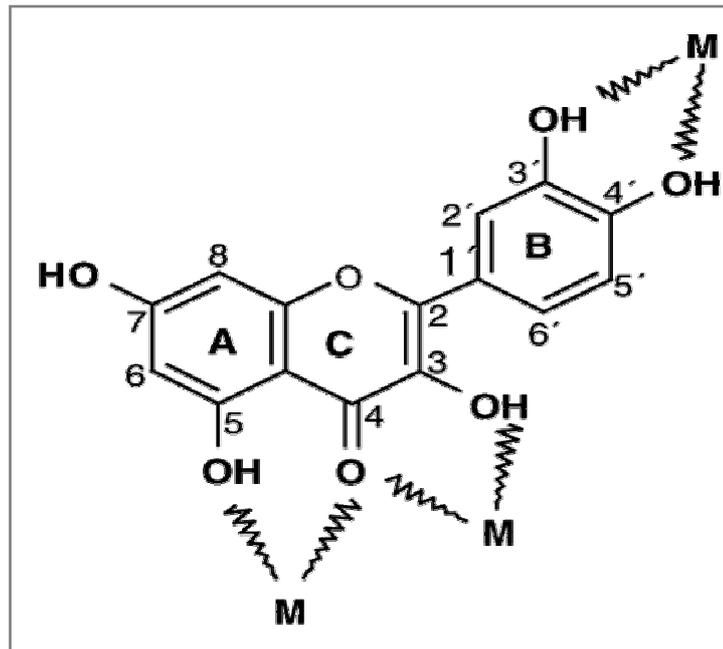


Figura 9. Estrutura de um flavonóide (quercetina). M = íon metálico coordenado

1.9. Estresse Oxidativo e Câncer

O estresse oxidativo é uma condição bioquímica caracterizada pelo desequilíbrio entre a presença de níveis relativamente altos de espécies reativas tóxicas, principalmente as ERO e/ou ERN, e insuficiência dos mecanismos de defesa detoxificantes. O estresse oxidativo é considerado um evento celular importante em muitos processos patológicos, sendo uma das hipóteses mais atraentes, na medicina, para explicar os mecanismos moleculares de algumas doenças, como por exemplo, aterosclerose, doenças neurodegenerativas (doença de Alzheimer, esclerose múltipla, mal de Parkinson), câncer e síndrome de Down (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000; VALKO, 2006).

Além do envolvimento com patologias, as ERO também têm sido apontadas como responsáveis pelo processo de envelhecimento; em decorrência do desacoplamento das reações de transporte de elétrons e da elevação dos níveis de metais, que causam aumento de ERO, oxidação protéica com conseqüente acúmulo destas, alterando a homeostase celular (Figura 10) (FINDEL; HOLBROOK, 2000).

Os mecanismos de defesa celular contra radicais livres incluem antioxidantes com baixa massa molecular, como a vitamina E, vitamina C, glutathiona, coenzima Q10 e também enzimas do sistema antioxidante, como a glutathiona peroxidase, catalase e SOD. Estes mecanismos sequestram ERO e protegem o organismo contra danos oxidativos (OZBEN, 2007).

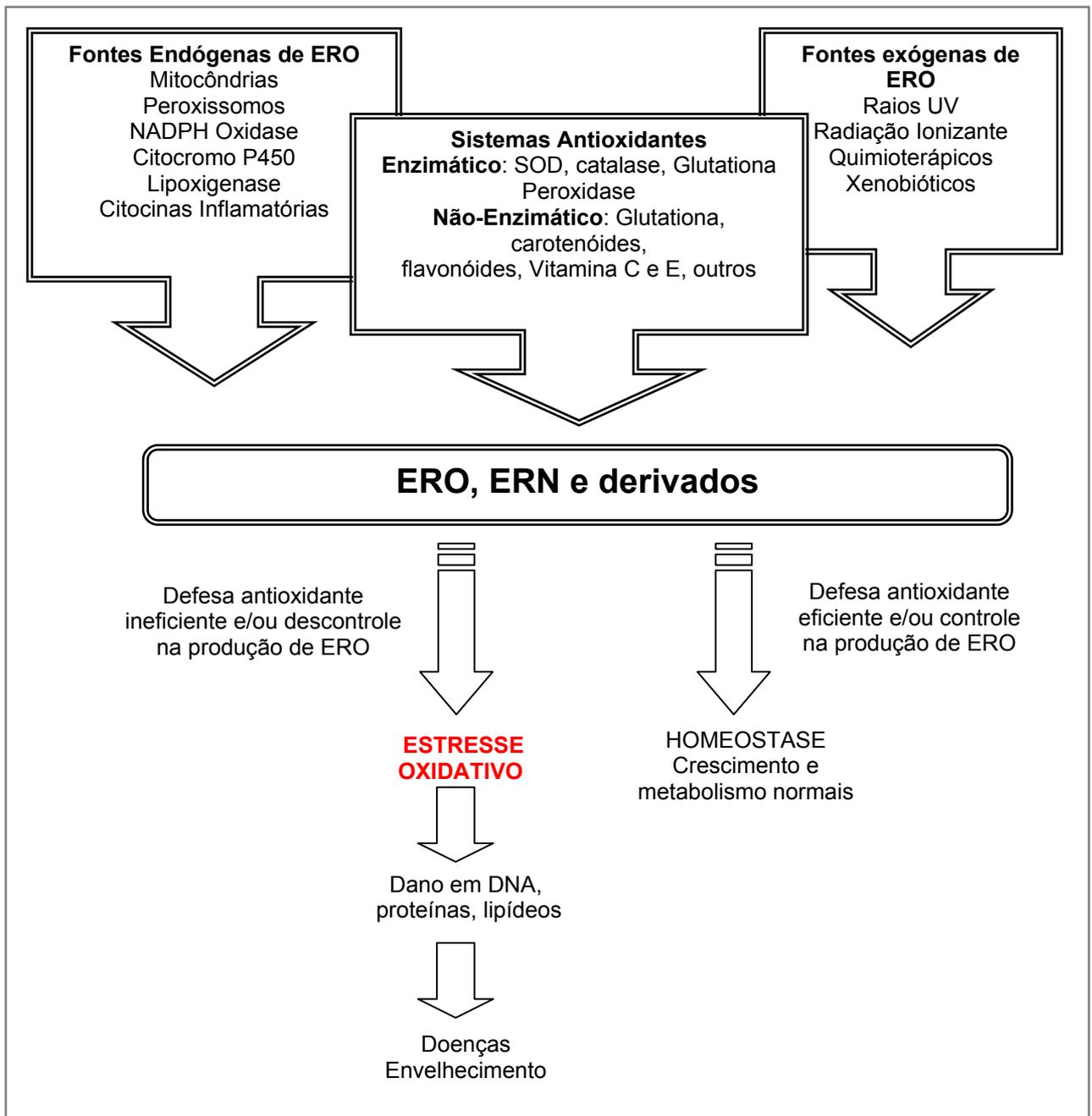


Figura 10. Fontes e respostas celulares às espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (adaptado de FINKEL; HOLBROOK, 2000)

Existem evidências que pacientes com câncer apresentam níveis de ERO maiores que indivíduos controle, bem como uma menor atividade de SOD e glutaciona peroxidase (MANTOVANI et al, 2003). O tecido tumoral é rico em fagócitos inflamatórios que podem gerar grande quantidade de ERO. Além disso, as células tumorais são metabolicamente muito ativas, requerendo ATP para seu funcionamento adequado, com crescimento e proliferação descontrolada. Esta alta quantidade de energia na cadeia respiratória mitocondrial, contribui para aumentar a

geração de ERO. Outros mecanismos que podem levar ao estresse oxidativo no câncer são a desnutrição, a produção de citocinas pró-inflamatórias e fármacos antineoplásicos (LAMSON; BRIGNALL, 1999; MANTOVANI et al, 2003).

1.10. Terapia Anti-Tumoral

O objetivo da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma inespecífica, levando à morte as células malignas, mas também as células normais, principalmente aquelas que apresentam um rápido crescimento, como as gastrintestinais, capilares e do sistema imune.

Os agentes quimioterápicos podem ser divididos em várias categorias, com alguns exemplos de fármacos mais utilizados (LAMSON; BRIGNALL, 1999):

- i) Agentes alquilantes (ciclofosfamida);
- ii) Antibióticos antraciclina (doxorubicina e bleomicina);
- iii) Compostos de platina (cisplatina e carboplatina);
- iv) Inibidores mitóticos (vincristina);
- v) Antimetabólitos (fluorouracil);
- vi) Modificadores de resposta imunológica (interferon);
- vii) Agentes hormonais (tamoxifen).

Os quimioterápicos que geram maiores níveis de ERO incluem as antraciclinas, compostos de platina e agentes alquilantes. Durante a apoptose induzida por quimioterápicos envolvendo liberação de citocromo C da mitocôndria, NADH desidrogenase e coenzima Q reduzida que desviam elétrons do sistema transportador de elétrons para o oxigênio, resultando na formação de $O_2^{\bullet -}$. As antraciclinas geram os maiores níveis de ERO, entre elas, a doxorubicina, que é um dos antineoplásicos mais estudados e mais efetivo, usado em vários tipos de câncer. Seu efeito tóxico consiste na habilidade de reagir com o DNA da célula neoplásica (CONKLIN, 2004). Estudos demonstram que a suplementação com antioxidantes concomitante à doxorubicina protege contra as injúrias oxidativas, sem diminuir a eficácia clínica (QUILES et al, 2002).

A terapia por radioterapia utiliza raios x e gama, que destroem as células tumorais também pela geração de radicais livres, mas assim como na quimioterapia, células normais ao redor do sítio de aplicação também são destruídas. O estresse oxidativo aumentado modifica o equilíbrio no estado redox da célula e acaba desencadeando várias reações, como por exemplo: parada no crescimento celular

transitória, adaptação, transcrição gênica, vias de iniciação de sinal de transdução e reparo de DNA danificado. Tais eventos determinarão se a célula irá à necrose, apoptose ou sobrevivência e proliferação. A extensão dessas respostas dependerá do tipo de ERO envolvida, da intensidade e duração do estresse oxidativo (OZBEN, 2007).

A maioria dos fármacos utilizados clinicamente contra o câncer são agentes anti-proliferativos sistêmicos (citotoxinas), que destroem preferencialmente células em divisão. Contudo, esses fármacos não são seletivos para células neoplásicas e sua eficácia terapêutica fica limitada, em decorrência ao dano que podem causar às células e tecidos normais, além da possível resistência após tratamento prolongado (DENNY, 2001; ROOSEBOOM et al, 2004; XU; McLEOD, 2001).

Uma estratégia para superar tais limitações desses agentes quimioterápicos é o uso de pró-fármacos relativamente atóxicos, que possam ser ativados seletivamente no tecido tumoral. Pró-fármacos inativos que precisam ser transformados, pelo metabolismo ou alteração química, e assim tornarem-se farmacologicamente ativos (ALBERT, 1958).

Enzimas humanas relacionadas a determinados tecidos e tumores têm sido estudadas quanto à sua capacidade de ativar pró-fármacos e assim serem utilizadas como agente terapêutico anti-tumoral (ROOSEBOOM et al, 2001). Nestes casos, o pró-fármaco deve ser um bom substrato para a enzima produzida na célula tumoral, mas não ser ativado por enzimas endógenas em células normais. Além disso, a citotoxicidade diferencial entre pró-fármaco e sua correspondente forma farmacologicamente ativa deve ser a mais alta possível. E ainda, o tempo de meia vida do fármaco ativo deve ser o suficiente para exercer seu efeito *in situ* e não atingir a circulação sistêmica (NICULESCU-DUVAZ, 1998; XU; McLEOD, 2001).

Uma abordagem derivada utilizando pró-fármacos e o fato que certos tipos de células tumorais apresentam antígenos característicos associados a sua superfície (DUBOWCHIK; WALKER, 1999), é a proposta da terapia com a técnica ADEPT (antibody-directed enzyme prodrug therapy); esses antígenos, uma vez complexados com anticorpos específicos conjugados com uma enzima (exógena) e sendo o pró-fármaco um bom substrato para essa enzima, ocorrerá a formação do fármaco ativo *in situ* (DENNY, 2001).

Na técnica ADEPT, são administrados ao paciente anticorpos monoclonais, que reconhecem o tumor, conjugados à uma enzima exógena (Figura 11). O pró-

fármaco com baixa ou nenhuma toxicidade é administrado e seu alvo vai ser o conjugado enzima-anticorpo associado às células tumorais, resultando na geração do fármaco ativo, o qual exercerá seu efeito citotóxico no local. A ligação dos conjugados enzima-anticorpo ao tecido tumoral exige certo tempo, que ainda demanda em estudos, bem como o intervalo de tempo entre a administração do conjugado e pró-fármaco, que deve ser otimizado para que o conjugado fique restrito ao tecido tumoral, e ausente na circulação sanguínea e nos tecidos normais. Deve-se ainda ser considerado que o conjugado enzima-anticorpo pode ser imunogênico, e assim, anticorpos anti-conjugado do hospedeiro podem interferir com o tratamento (STRIBBLING et al, 1997; SYRIGOS et al, 1998; SYRIGOS; EPENETOS, 1999).

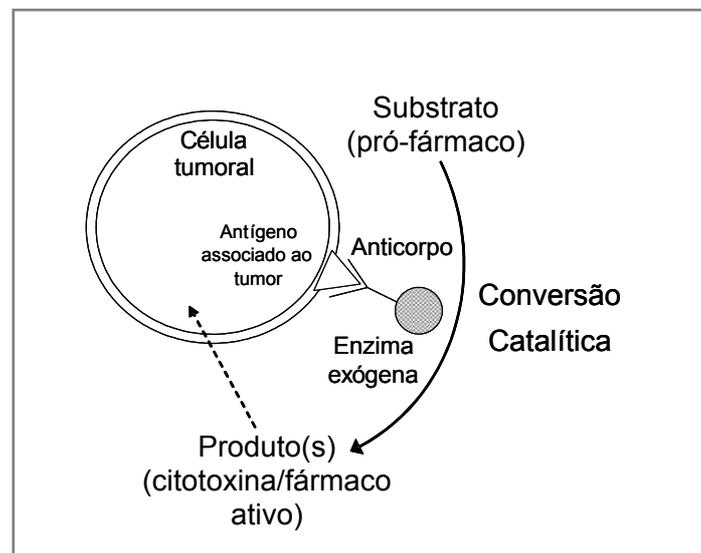


Figura 11. Proposta da terapia ADEPT (modificado de DENNY, 2001)

Para que essa terapia tenha êxito, tanto a enzima como o pró-fármaco tem que apresentar certos pré-requisitos. As enzimas devem ser de origem não humana ou ser uma proteína humana que não seja produzida em tecidos normais, deve ter alta atividade catalítica em condições fisiológicas e rápida e eficiente ativação do pró-fármaco em baixas concentrações do substrato (k_{cat} alta e k_M baixa) (RAINOV et al, 1998; RIGG; SIKORA, 1997).

Existem ainda muitas limitações clínicas associadas à técnica ADEPT; em tumores pobremente vascularizados, a liberação do conjugado enzima-anticorpo é restrita, podendo não atingir todas as células tumorais (MARTIN et al, 1997; NENNY;

WILSON, 1998). Devido aos baixos níveis de enzima, a quantidade do fármaco ativo gerado pode ser ineficiente para atingir uma concentração letal. Além disso, a ligação do conjugado à superfície celular é limitada pela heterogeneidade antigênica. Outros problemas da técnica ADEPT incluem custo e dificuldades com desenvolvimento e purificação de anticorpos, imunogenicidade de anticorpos e/ou conjugados e a ativação do pró-fármaco em tecidos não tumorais (MASON; WILLIAMS, 1980). Entre estes, o principal problema é a imunogenicidade do conjugado enzima-anticorpo, que limita ciclos múltiplos de sua administração (NENNY; WILSON, 1998; SYRIGOS; EPENETOS, 1999). Para solucionar esse problema, várias hipóteses têm sido testadas, incluindo o uso de proteínas humanas e administração concomitante de imunossupressores (SYRIGOS; EPENETOS, 1999).

O primeiro estudo clínico experimental da técnica ADEPT foi realizado em Londres, no hospital Charing Cross, utilizando um anticorpo contra o antígeno carcinoembriogênico (CEA) conjugado a uma carboxipeptidase G₂ (CPG₂) bacteriana. O pró-fármaco foi uma mostarda de ácido benzóico, que tem baixa toxicidade, mas gera um fármaco citotóxico através da clivagem de um glutamato terminal. A terapia foi aplicada a oito pacientes com câncer coloretal que não responderam aos tratamentos convencionais, e cinco deles conseguiram uma redução maior que 50% da massa tumoral. O anticorpo foi de origem murina e a enzima bacteriana (MARTIN et al, 1997). Foi verificado que todos os pacientes imunocompetentes apresentaram por dez dias, após a data da infusão, anticorpos contra os dois componentes do complexo enzima-anticorpo na sua circulação. (BAGSHAWE et al, 1995). Um estudo posterior, utilizando o mesmo protocolo, foi realizado para verificar a depuração do complexo enzima-anticorpo no sangue, tecidos normais (fígado) e tumor. Observou-se que o nível do conjugado enzima-anticorpo em tecidos normais também era alto, o que pode ter contribuído para a mielossupressão que foi observada nos dois estudos, e devido a isso, tem aumentado a busca de pró-fármacos que gerem fármacos ativos com tempo de vida média de poucos segundos (BLAKEY et al, 1995).

1.11. *Horseradish Peroxidase* e a Técnica ADEPT

A terapia para o câncer utilizando agentes oxidantes citotóxicos tem sido muito discutida, e baseia-se na geração de radicais livres e/ou ERO como fonte oxidante. A glicose oxidase tem sido avaliada como fonte de peróxido de hidrogênio; hipoxantina e xantina oxidase para produzir $O_2^{\bullet -}$, e também peroxidases imobilizadas na tentativa de obtenção de efeitos anti-tumorais. Existem relatos de elevada atividade peroxidásica em tumores mamários induzidos quimicamente e produção de grandes quantidades de peróxido de hidrogênio por células tumorais. Em um estudo com células tumorais HL60, sugeriu-se que a peroxidase endógena das células tumorais não é suficientemente ativa para resultar numa citotoxicidade significativa e seletiva para a célula tumoral, com o uso do ácido 3-indolacético (IAA) como pró-fármaco (FOLKES et al, 1998).

A HRP tem sido estudada há mais de um século; nos últimos anos, várias informações surgiram sobre sua estrutura tridimensional, mecanismos e sítios de catálise, bem como função de resíduos de aminoácidos específicos. Tais descobertas são muito importantes para aplicação prática da enzima em indústrias químicas e na medicina (VEITCH, 2004).

Uma das reações mais estudadas da HRP ocorre com o hormônio de planta IAA, que como uma das poucas exceções em relação à maioria das reações catalisadas por peroxidases, ou seja, ocorre sem a necessidade de peróxido de hidrogênio. Nesse contexto, o par IAA e HRP tem sido um dos mais estudado para aplicação na técnica ADEPT, podendo oferecer um novo potencial para esta técnica (DE MELO et al, 2004; FOLKES; WARDMAN, 2001; GRECO et al, 2001; WARDMAN, 2002).

Estudos recentes da reação IAA/HRP/ O_2 em meio neutro, aparentemente indicam não ser um mecanismo de oxidase e que, talvez seja um mecanismo peroxidase acoplado a um processo muito eficiente onde peróxido orgânico é formado (DUNFORD, 1999). A reação inicia-se quando um traço de radical cátion indol-3-acetato é produzido. Os principais produtos da oxidação do IAA incluem indol-3-metanol, indol-3-aldeído e 3-metileno-oxindol. Além disso, teorias conflitantes têm sido propostas para explicar o mecanismo de reação em meio ácido, onde a formação da enzima na forma ferrosa, composto-III e radical hidroperoxil podem aparecer (GAZARIAN et al, 1998).

O IAA é encontrado no líquido, no sangue e em vários órgãos, como pulmões, rins, fígado e cérebro. Seus níveis plasmáticos e de seus metabólitos, como o ácido 5-hidroxi-3-indolacético (5-OH-IAA), são elevados em doenças como fenilcetonúria e disfunção renal. Tais níveis podem variar de 2 µmol/L sob condições fisiológicas a 11 µmol/L em doenças renais. As principais fontes de obtenção de IAA nos animais são: dieta rica em caules de vegetais, produção por bactérias intestinais e a sua síntese a partir do triptofano em vários tecidos (PIRES DE MELO et al, 1998).

Sabe-se que o efeito do IAA na redução de viabilidade celular está totalmente relacionado com a atividade peroxidásica, fato comprovado pela mudança estrutural em neutrófilos na presença da auxina, acredita-se que tal efeito não seja devido à diminuição da capacidade antioxidante da célula, mas sim decorrente da produção de radicais peroxil, indolil, escatolil e ERO, como radical ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio (CANDEIAS et al, 1995; KAWANO et al, 2001; PIRES DE MELO et al, 1998). Contudo, o mecanismo da interação IAA/HRP/O₂ ocorre de maneira complexa e ainda não totalmente elucidada (KIM et al, 2006).

As ERO causam mudanças estruturais na membrana plasmática de células via peroxidação lipídica, o que acarreta dano celular e apoptose (KIM et al, 2006), há indícios de que radicais peroxil possam ser citotóxicos às células tumorais, entretanto, outros estudos, indicam que a lipoperoxidação não é o principal indutor da citotoxicidade (FOLKES; WARDMAN, 2001).

O mecanismo primário de citotoxicidade é a formação de um produto de reação entre IAA e HRP já identificado: o 3-metileno-2-oxindol, que mostra alta reatividade contra nucleófilos celulares como glutatona e grupos tióis de proteínas ou histonas (WARDMAN, 2002). Assim, a associação HRP-IAA oferece várias vantagens para futuras terapias envolvendo anticorpos, genes ou polímeros ligados a enzimas, e pró-fármacos atuando como substratos específicos (FOLKES; WARDMAN, 2001; WARDMAN, 2002).

A HRP apresenta uma ótima estabilidade a 37°C, alta atividade em meio neutro, ausência de toxicidade e facilidade para ser conjugada com anticorpos e polímeros; além de já existirem evidências que sugerem que o IAA não mostra qualquer efeito adverso em humanos e ainda, o fato de não precisar de peróxido de hidrogênio para que a reação ocorra é uma grande vantagem (VEITCH, 2004).

Outro composto possível de ser formado em reações catalisadas por peroxidases e para qual existe larga evidência de citotoxicidade em vários modelos experimentais é o oxoaldeído conhecido como metilglioxal (2-oxopropanal) (KALAPOs, 1999). Em termos químicos, o metilglioxal é o produto de redução do grupo carboxílico do ácido pirúvico e sua biossíntese pode ser atribuída a processos não enzimáticos e/ou enzimáticos. Pode ser formado via fragmentação de vários intermediários glicolíticos, durante peroxidação lipídica, catabolismo de aminoácidos e oxidação de cetonas (KALAPOs, 1999; NEMET, 2004). Como um aldeído, o metilglioxal reage com sítios nucleofílicos em proteínas e ácidos nucleicos, levando à mutação, apoptose e necrose celular (MURATA-KAMIYA et al, 2000; OKADO et al, 1996; THORNALLEY et al, 1999). O metilglioxal tem sido descrito como precursor de produtos de glicação avançada (AGEs), envolvidos na patofisiologia de doenças como diabetes e Alzheimer (STITT et al, 2002). Acredita-se que o metilglioxal exerça uma atividade anti-tumoral *in vivo*, e algumas estratégias tem sido desenvolvidas para promover o aumento dos níveis de metilglioxal em células neoplásicas (KALAPOs, 1999).

O metilglioxal foi demonstrado como produto de oxidação do acetoacetato catalizado por mieloperoxidase (HARRISON; SAED, 1983). Contudo, essa reação requer peróxido de hidrogênio, praticamente impossibilitando a aplicação do acetoacetato na tecnologia do ADEPT.

Determinadas β -dicetonas com grupamento metila são oxidados aerobicamente na presença de peroxidase (HRP), mioglobina e hemina (AUGUSTO; BECHARA, 1980). A 3-metil-2,4-pentanodiona (Me-PD), por exemplo, é oxidada por HRP na presença de oxigênio, tal reação foi comparada com a que ocorre com IAA/HRP/O₂, já que ambas independem da adição de H₂O₂ e têm cinéticas muito parecidas (SOARES; BECHARA, 1982).

1.12. Compostos β -Dicarbonílicos

As β -dicetonas são uma importante classe de compostos orgânicos utilizados na síntese de compostos heterocíclicos; como ligantes de metais de transição e também tem sido estudadas como possíveis agentes anti-virais (GROGAN, 2005). Na natureza, são encontradas como intermediários do metabolismo microbiano (GROGAN, 2002, 2005). A perda de um próton nestes compostos resulta na formação de um dicetonato altamente reativo, capaz de quelar metais (HALL; BRODBELT, 1999). Nos últimos anos, observou-se que algumas enzimas presentes em bactérias são capazes de clivar a ligação C-C entre os grupos carbonilas de β -dicetonas, sugere-se que dois tipos de substratos podem estar sendo clivados em função da natureza dos grupos substituintes (Figura 12):

- **β -dicetonas neutras:** onde R^1 e R^2 são grupos alquil e;
- **β -dicetoácidos:** onde R^2 é um carboxilato em uma das posições em relação a um dos grupos carbonil da dicetona.

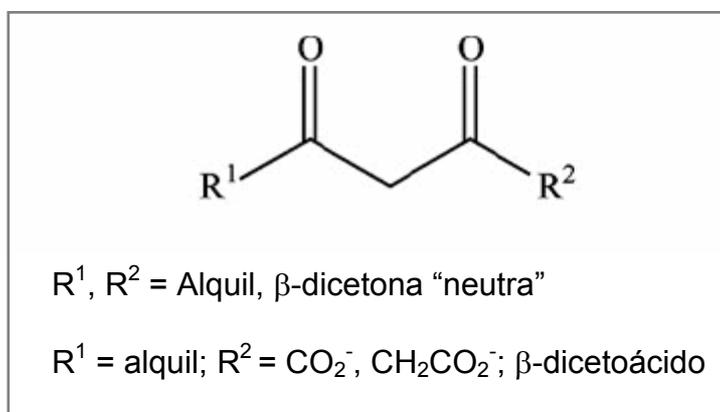


Figura 12. Dois tipos de β -dicetonas clivadas por enzimas (adaptado de GROGAN, 2005)

A Comissão Internacional de Enzimas designou essas enzimas como “ β -dicetona Hidrolases”- E.C. 3.7.1.[Hidrolases (3) que atuam em ligações C-C (7) em substâncias dicetônicas (1)] (GROGAN, 2005).

A hidrólise de acetilpiruvato à piruvato e acetato tem sido descrita como parte da degradação de catecóis por *Pseudomonas* e a enzima responsável foi isolada, parcialmente caracterizada como acetilpiruvato hidrolase (APH) de *Pseudomonas putida*. A Figura 13 mostra a hidrólise do acetilpiruvato por APH e o mecanismo de

ação sugerido (NISHIZUKA et al, 1961) e a provável complexação do acetilpiruvato com íons Mg^{+2} presente na estrutura da enzima (GROGAN, 2005).

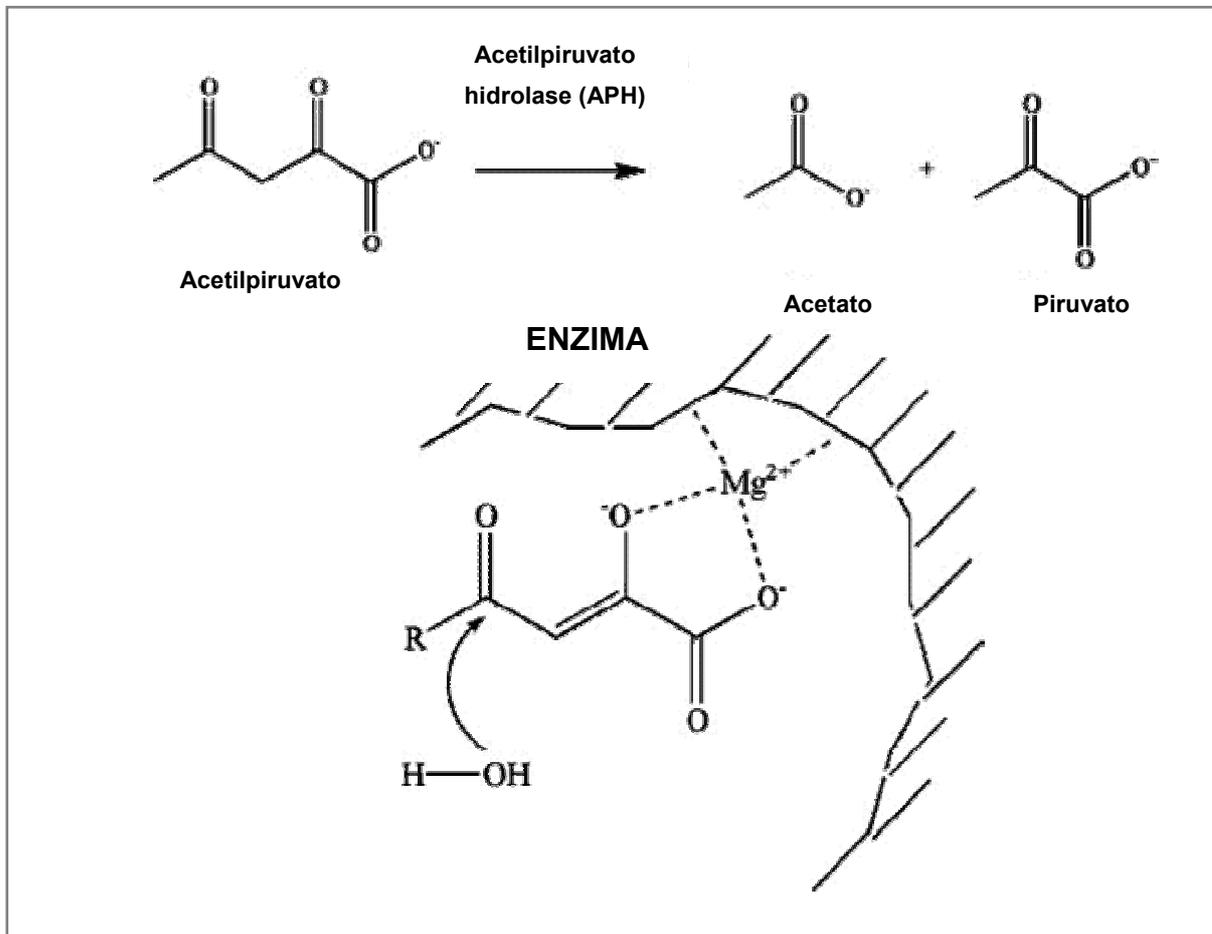


Figura 13. Mecanismo sugerido para hidrólise de acetilpiruvato por APH de *Pseudomonas putida* (adaptado de GROGAN, 2005; POKORNY et al, 1999).

Os estudos mais evidentes de clivagem C-C em β -dicetoácidos iniciaram-se com a fumarilacetoacetato hidrolase (FAH – E.C. 3.7.1.2.) que catalisa a hidrólise de fumarilacetoacetato à fumarato e acetoacetato (Figura 14), constituindo-se em um dos passos do metabolismo da tirosina em mamíferos. A alteração e/ou ausência de genes que codificam a FAH em humanos tem se mostrado o principal fator em tirosinemia tipo I hereditária (GROGAN, 2005).

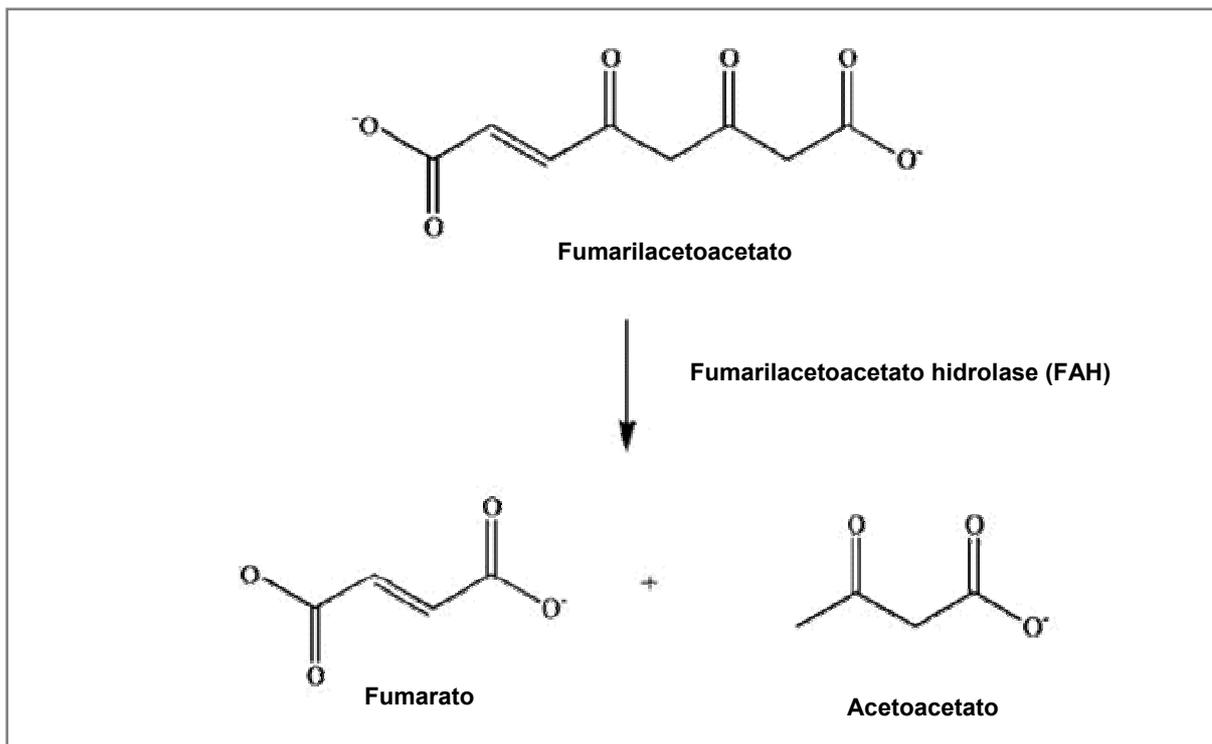


Figura 14. Reação catalisada por FAH (adaptado de GROGAN, 2005)

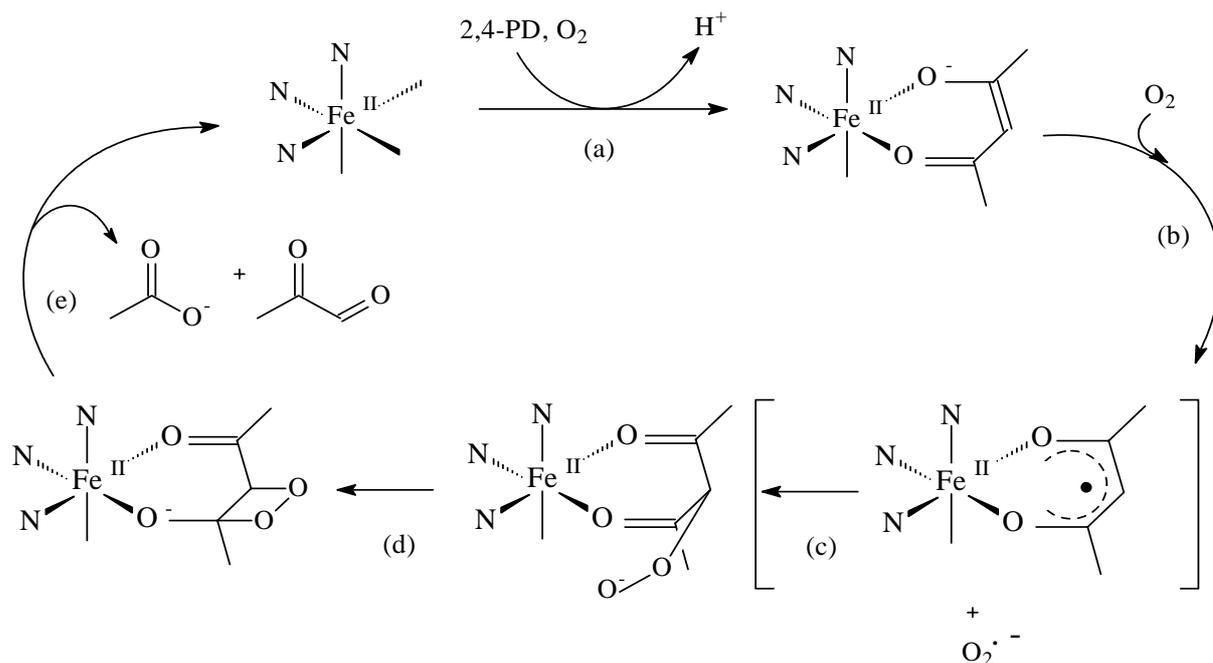
Posteriormente descreveram-se outros substratos para a FAH, incluindo o acetilpiruvato (*in vitro*) e uma série de outras β -dicetonas. O mecanismo de reação sugerido é que a forma enolato do fumarilacetoacetato pode coordenar-se com o íon cálcio bivalente, prendendo o substrato no local do ataque nucleofílico do grupo carbonila alvo (POKORNY et al, 1997).

Sakai et al. (1986) relataram uma linhagem de *Pseudomonas* que degradava um material plástico (polímero de álcool polivinílico – PVA) através de uma oxidase, formando uma polivinilcetona, que posteriormente era clivada por hidrolase a produtos com terminações carboxilato ou metilcetona. A enzima mostrou também clivar uma variedade de alquil-dicetonas, mas não β -dicetonas cíclicas.

Uma enzima análoga, a PDH (2,4-pentanodiona hidrolase) foi isolada na degradação de PVA pela linhagem de *Pseudomonas vesicularis variedade povalolyticus*. PDH foi caracterizada como uma proteína monomérica de massa molecular entre 50 e 75 KDa, usando 2,4-pentanodiona (PD) como substrato. Sua atividade foi inibida por Hg^{+2} , Ag^{+2} e NaF e progressivamente inativada por altas concentrações de NaCl (KAWAGOSHI; FUJITA, 1998).

Em busca de outros microrganismos com potencial para degradar a 2,4-pentanodiona, Straganz et al. isolaram uma bactéria, a *Acinetobacter johnsonii*, capaz de crescer na presença de PD como única fonte de carbono. Quando a PD foi incubada *in vitro* com extrato celular do isolado, observou-se como produtos àqueles da reação de uma β -dicetona hidrolase, acetato e piruvato, sendo que o piruvato derivou do metilglioxal. A enzima foi isolada e caracterizada, a “diketone-cleaving enzyme” (DKe1) demonstrou ser uma metaloenzima tetramérica de 16 KDa por subunidade, que depende de ferro para sua atividade. Tal enzima não requereu qualquer cofator exógeno e tem uma alta atividade entre pH 6,5 e 8,5. Adição de agentes quelantes de metais, como EDTA, KCN e o-fenantrolina levam a uma perda irreversível da atividade enzimática. A atividade da enzima inativada por fenantrolina foi restaurada parcialmente (>30%) pela adição de Fe^{+2} e não pela adição de Fe^{+3} e outros metais (Zn^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2}). A DKe1 purificada contém 0,9 a 1 átomo de ferro por subunidade. A enzima não é específica para PD, catalisa também outros substratos β -dicarbonílicos e β -dicetonas, como a 2-acetilciclohexanona e 1-fenilbutano-1,3-diona (STRAGANZ et al, 2002; STRAGANZ et al, 2003). O gene que codifica a DKe1 foi clonado e mostrou codificar uma proteína de 153 aminoácidos, com pouca homologia com outras enzimas do sistema de dados. Experimentos polarográficos e de ressonância magnética nuclear mostraram que uma molécula de oxigênio molecular foi consumida por cada mol de PD clivada, sendo a enzima considerada uma dioxigenase. No caso da DKe1, o ferro não é necessário só para o posicionamento do substrato, mas também para a reação entre a PD e o oxigênio (GROGAN, 2005).

O mecanismo proposto para a clivagem da PD por DKe1 está no Esquema 4, que mostra a ocorrência de ataque nucleofílico no átomo de carbono da carboxila formando um peroxidato resultante do ataque dos O_2 na forma enolato da PD. Esse ataque nucleofílico forma um dioxetano que por sua vez, se cliva, formando metilglioxal e acetato (GROGAN, 2005).



Esquema 4. Via catalítica proposta de DKe1. Ligação da PD (enolato) ao Fe⁺² coordenado na enzima (a); redução dos dois oxigênios no complexo enzima-substrato (b), com formação de nova ligação C-O (c); ataque nucleofílico no carbono adjacente à carbonila (d); decomposição do intermediário dioxetano em acetato e metilglicoxal (e) (adaptado de STRAGANZ; NIDETZKY, 2006)

A PD é uma molécula pequena, dinâmica e apresenta tautomerismo. Na temperatura ambiente existe em equilíbrio, em duas formas moleculares, a cetônica e a enólica, sendo que a proporção de enol é cerca de 3 vezes maior. Sabe-se que existe influência da temperatura e do solvente nessas formas (MOHACEK-GROSEV et al, 2007). É um produto químico amplamente utilizado em indústrias químicas, tem vários efeitos tóxicos, como tem sido demonstrado em vários estudos; incluindo neurotoxicidade central e possíveis efeitos no sistema imune de mamíferos, bem como toxicidade em diversos organismos aquáticos e microrganismos. Alguns estudos postulam que a PD é biodegradável (STRAGANZ et al, 2003).

A PD pode complexar metais, e isso é utilizado como parte de um sistema de catálise para várias propostas: polimerização de propileno e etileno, oxidação de álcoois a aldeídos e cetonas, oxidação de etil linoleato, preparação de derivados sulfóxidos de penicilina, síntese de nanotubos de carbono, purificação de metais. Acetilacetatos metálicos também são usados como precursores na preparação de filmes de óxidos metálicos (SABOLOVIC et al, 2004).

2. OBJETIVOS

Dentro do panorama delineado, teve-se como objetivos específicos neste trabalho:

- i) Estudar a oxidação da 2,4-pentanodiona (Figura 15) catalisada por HRP na ausência de H_2O_2 . Este estudo incluiu: otimização das condições de reação, determinação de constantes cinéticas (k_M , v_{\max});
- ii) Identificação de produtos de reação entre 2,4-pentanodiona e HRP;
- iii) Utilizar outros substratos estruturalmente semelhantes à 2,4-pentanodiona (Figura 15);
- iv) Fazer alguns estudos comparativos entre substratos aqui estudados e o ácido indol acético e um dos seus metabólitos naturais, o ácido 5-hidroxi-3-indolacético (5-OH-IAA)(Figura 15) e, dessa maneira, avaliar o potencial desses substratos como fonte de ERO via ação catalítica da HRP;
- v) Selecionar os substratos que forem eficientemente oxidados na presença de HRP e na ausência de peróxido de hidrogênio; utilizar esta reação em testes que avaliem citotoxicidade, para ulterior aplicação na técnica ADEPT.

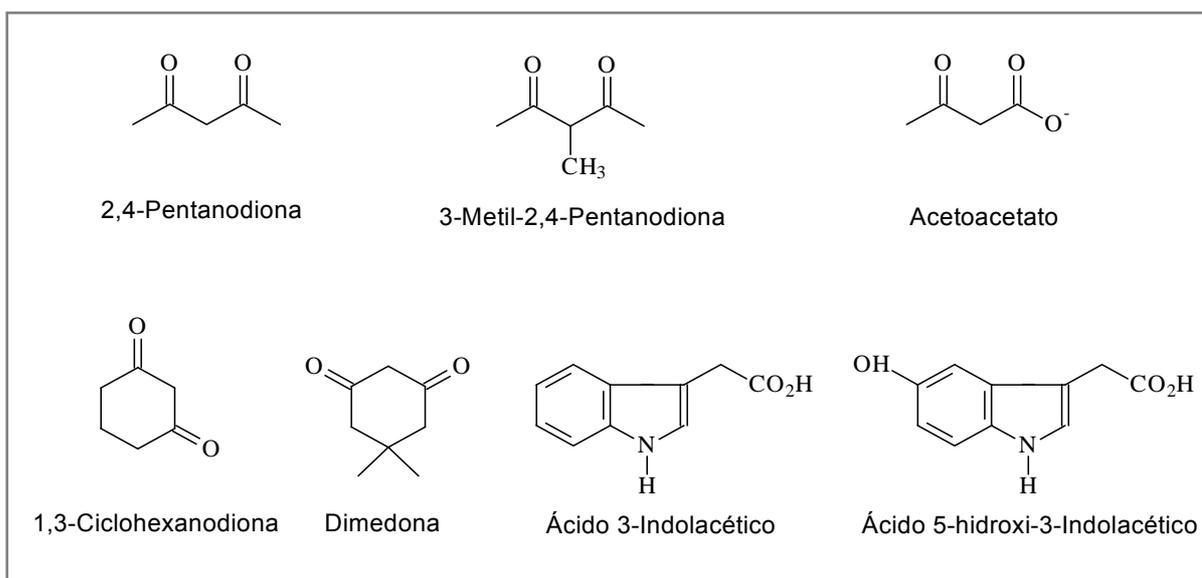


Figura 15. Estrutura química dos substratos estudados

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes e Soluções:

Acetoacetato de lítio, 2,4-pentanodiona, 3-metil-2,4-pentanodiona, ácido 3-indolacético, ácido 5-hidroxi-3-indolacético, 1,3-ciclohexanodiona, citocromo C, mieloperoxidase, 5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona (dimedona), metilglioxal (solução a 40%), cloreto de semicarbazida, luminol, o-fenilenodiamino, catalase (E.C. 1.11.1.6), superóxido dismutase (E.C. 1.15.1.1), peroxidase de raiz forte (E.C. 1.11.1.7). hemina, azul de Trypan, Ficoll-Hypaque 1077, mioglobina de músculo esquelético de eqüinos, 4-hidroxi-benzidrazida foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Metanol grau HPLC da Merck. Todos os demais reagentes utilizados para preparação de tampão e fase móvel foram de grau analítico ou superior. A 2,4-pentanodiona foi destilada antes do uso. Para as medidas de pH foi usado um potenciômetro B-374 da Micronal e padrões de pH 7 e 10 (Aldrich Chem. Co.).

3.2. Preparo das Soluções Estoque:

Tampão PBS-D (Dulbecco) (BABIOR; COHEN, 1981) (10 mmol/L)

Composição	g/litro
NaCl	8,0
KCl	0,2
Na ₂ HPO ₄	1,15
CaCl ₂	0,1
KH ₂ PO ₄	0,2
MgCl ₂ . 6H ₂ O	0,1
H ₂ O qsp.	1,0 L

Dissolveu-se CaCl₂ e MgCl₂ . 6H₂O em 100 mL de água tipo I (milliQ) e todos os outras componentes em aproximadamente 700 mL de água tipo I (milliQ) e misturou-se as duas soluções sob agitação. Ajustou-se o pH para 7,4 com NaOH 5 N e completou-se o volume para 1000 mL.

Para o PBS pH 7,4 usado nas lavagens das separações de células, não foi acrescentado cloreto de cálcio e cloreto de magnésio.

Tampão fosfato de potássio 0,1 mol/L (GOMORI, 1955)

Foram preparadas duas soluções de sais de fosfato:

Solução A: fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) 1 mol/L

Solução B: fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4) 1 mol/L

Para obter o pH desejado, mediu-se o pH da solução B e adicionou-se a solução A até o valor de pH esperado. Para o tampão fosfato de potássio 0,1 mol/L, as soluções A e B foram diluídas (1:10).

Tampão citrato 0,1 mol/L (GOMORI, 1955)

Soluções estoque:

A: solução de ácido cítrico 0,1 mol/L

B: solução de citrato de sódio 0,1 mol/L

Para obter o pH desejado, misturou-se as soluções estoque nas seguintes proporções:

- pH 5,0: 20,5 mL da solução A + 29,5 mL da solução B e posteriormente a mistura foi diluída para 100 mL
- pH 6,0: 9,5 mL da solução A + 41,5 mL da solução B e posteriormente a mistura foi diluída para 100 mL

Tampão 2-amino-2-metil-1,3-propanediol (MAP) 0,2 mol/L (GOMORI, 1955)

Soluções estoque:

A: solução de 2-amino-2-metil-1,3-propanediol 0,2 mol/L (21,03 g/L)

B: HCl 0,2 mol/L

Para obter o pH desejado, misturou-se as soluções estoque nas seguintes proporções:

- pH 9,5: 50 mL da solução A + 5,7 mL da solução B e posteriormente a mistura foi diluída para 200 mL
- pH 10: 50 mL da solução A + 2 mL da solução B e posteriormente a mistura foi diluída para 200 mL

Tampão Tris(hidroximetil)aminometano 0,2 mol/L (GOMORI, 1955)

Soluções estoque:

A: solução de Tris(hidroximetil)aminometano 0,2 mol/L (24,2 g/L)

B: HCl 0,2 mol/L

Para obter o pH desejado, misturou-se as soluções estoque nas seguintes proporções:

- pH 8,0: 50 mL da solução A + 26,8 mL da solução B e posteriormente a mistura foi diluída para 200 mL
- pH 8,5: 50 mL da solução A + 12,2 mL da solução B e posteriormente a mistura foi diluída para 200 mL

Azul de Trypan 0,5%

Dissolveu-se 0,05 g de Azul de Trypan em 10 mL de solução fisiológica, filtrou-se duas vezes e conservou-se a solução em frasco âmbar, na geladeira.

Luminol 10^{-2} mol/L

Dissolveu-se 1,98 mg de luminol sódico em 1 mL de água tipo I (milliQ). Alíquotas de 50 μ L foram mantidas em freezer a -20 °C. A concentração foi determinada espectrofotometricamente conforme o coeficiente de extinção molar:

$$\varepsilon_{347 \text{ nm}} = 7636 \text{ (mol/L)}^{-1} \text{cm}^{-1}, \text{ em água (ALLEN; LOOSE, 1976).}$$

No momento do uso as alíquotas foram diluídas para obter-se a concentração de luminol desejada. Conservou-se ao abrigo da luz.

Peróxido de hidrogênio

Foi preparada a partir do peróxido de hidrogênio 30% pela diluição do volume adequado em água tipo I (milliQ), a concentração foi determinada espectrofotometricamente conforme o seu coeficiente de extinção molar:

$$\varepsilon_{230 \text{ nm}} = 80 \text{ (mol/L)}^{-1} \text{cm}^{-1}, \text{ em água (BRESTEL, 1985).}$$

Hemina

Preparou-se uma solução estoque 8 μ mol/L (2,5 mg/5 mL NaOH 1 mol/L) e diluiu-se para uma solução de trabalho 1/100 com NaOH 1mol/L. Aferiu-se a concentração utilizando o coeficiente de extinção molar:

$$\varepsilon_{385 \text{ nm}} = 5,8 \cdot 10^4 \text{ (mol/L)}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ (GIBSON; ANTONINI, 1963)}$$

Solução estoque de HRP

A massa adequada de HRP foi diluída em água tipo I (milliQ) e a concentração aferida de acordo com o coeficiente de extinção molar:

$$\varepsilon_{403 \text{ nm}} = 1,02 \cdot 10^5 \text{ (mol/L)}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ (OHLSSON; PAUL, 1976)}$$

Solução estoque de mioglobina

Dissolveu-se a massa adequada de mioglobina de músculo esquelético de eqüinos em água tipo I (milliQ) e a concentração aferida de acordo com o coeficiente de extinção molar: $\varepsilon_{555 \text{ nm}} = 12,92 \cdot 10^3 \text{ (mol/L)}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (BOWEN, 1949)

3.3. Determinação da Concentração de Metilglioxal Usando Semicarbazida (BARRENSCHEEN, 1928)

Devido à facilidade com que o metilglioxal pode ser oxidado e transformado em outros produtos, verificou-se a concentração do reagente em estoque para garantir o uso de concentração adequada. Preparou-se uma solução de metilglioxal 1 mmol/L; e em volumes diferentes dessa solução, adicionou-se 67 mmol/L de semicarbazida e PBS pH 7,4 para um volume final de 500 μL . Sabendo-se que o coeficiente de extinção molar do produto formado (metilglioxal-disemicarbazona) em 286 nm é $32 \cdot 10^3 \text{ (mol/L)}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (BARRENSCHEEN, 1928), obteve-se as concentrações reais para os respectivos volumes de metilglioxal adicionados na reação, conforme observa-se na tabela 1.

Tabela 1. Determinação da concentração real do metilglioxal comercial, através da derivatização com semicarbazida

Volume de metilglioxal 1 mmol/L (μL)	Concentrações (mol/L)	
	suposta	real
5	$1 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-5}$
10	$2 \cdot 10^{-5}$	$2,3 \cdot 10^{-5}$
20	$4 \cdot 10^{-5}$	$4,4 \cdot 10^{-5}$
30	$6 \cdot 10^{-5}$	$7,5 \cdot 10^{-5}$
40	$8 \cdot 10^{-5}$	$9,7 \cdot 10^{-5}$
50	$1 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$
100	$2 \cdot 10^{-4}$	$2,3 \cdot 10^{-4}$

3.4. Ensaios de Consumo de Oxigênio

As reações foram monitoradas em oxígrafo “Yellow Spring Oxygen Monitor (YSI 5300A)” acoplado a um computador, onde os dados foram captados e processados no programa ORIGIN. Foi mantida agitação constante e temperatura de 37°C. As concentrações utilizadas de reagentes estão expressas em cada gráfico (ver resultados). O volume final das reações foi de 3 mL, exceto quando especificado, e sempre iniciadas com a adição da solução estoque de HRP ou hemina ou citocromo C ou MPO ou FeCl_3 . Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As velocidades de reação foram determinadas em tempos estabelecidos, sendo que o mesmo intervalo foi utilizado em cada comparação.

3.5. Ensaios Espectrofotométricos

O espectro de absorção da HRP foi monitorado em espectrofotômetro UV/visível “dyode array” Hewlett Packard 8452A e considerados contra um branco de tampão; as reações foram disparadas pela adição dos substratos a serem testados (2,4-pentanodiona, 3-metil-2,4-pentanodiona, dimedona, acetoacetato, ciclohexanodiona, ácido 5-hidroxi-3-indolacético, ácido 3-indolacético). As reações foram realizadas a 37°C e o volume final foi de 1 mL.

Para os experimentos em condições anaeróbicas, foi utilizada uma cubeta selada (“Thunberg cell”) e borbulhou-se nitrogênio por 10 minutos na solução de HRP para que o oxigênio fosse removido. A 2,4-pentanodiona foi adicionada através de um compartimento isolado da cubeta sem contato com o ar.

3.6. Identificação dos Produtos de Oxidação da 2,4-Pentanodiona

Para investigar a formação do metilglioxal durante a oxidação da 2,4-pentanodiona catalisada por HRP, comparou-se o cromatograma em HPLC da mistura da reação, com um padrão de metilglioxal.

A derivatização do metilglioxal puro e da mistura da reação para análise em HPLC foi realizada através do método do o-fenilenodiamino (FRIDOVICH, 2000; OHMORI et al, 1987; OKADO-MATSUMOTO). Ácido perclórico 0,5 mol/L (0,9 mL) foi adicionado à 0,1 mL da mistura da reação ou solução estoque de metilglioxal. Depois, o-fenilenodiamino 1% (0,1 mL) foi adicionado e a reação incubada no escuro, a temperatura ambiente, durante uma hora. Finalmente, 20 µL dessa mistura foi diretamente injetada no sistema de HPLC.

As análises foram realizadas em uma coluna de fase reversa Luna C18 (25 x 4.6 mm, 5 µm usando o Waters 2690 Separation Module acoplado a um detector UV-VIS Detector Waters 996 em 315 nm. A fase móvel foi: (A) solução de ácido trifluoroacético 0,2% em água/metanol 1:1 (B) metanol. Gradiente de fase móvel utilizado: 0-2 minutos 100% A; 2-15 minutos de 100% a 0% de A. 16-17 minutos de 0% a 100% de A. Fluxo de 1 mL/min.

A identificação da formação de ácido pirúvico foi feita pela adição de cloreto de cálcio após a reação. A formação de um precipitado branco revelou a presença de piruvato de cálcio (GROGAN, 2005).

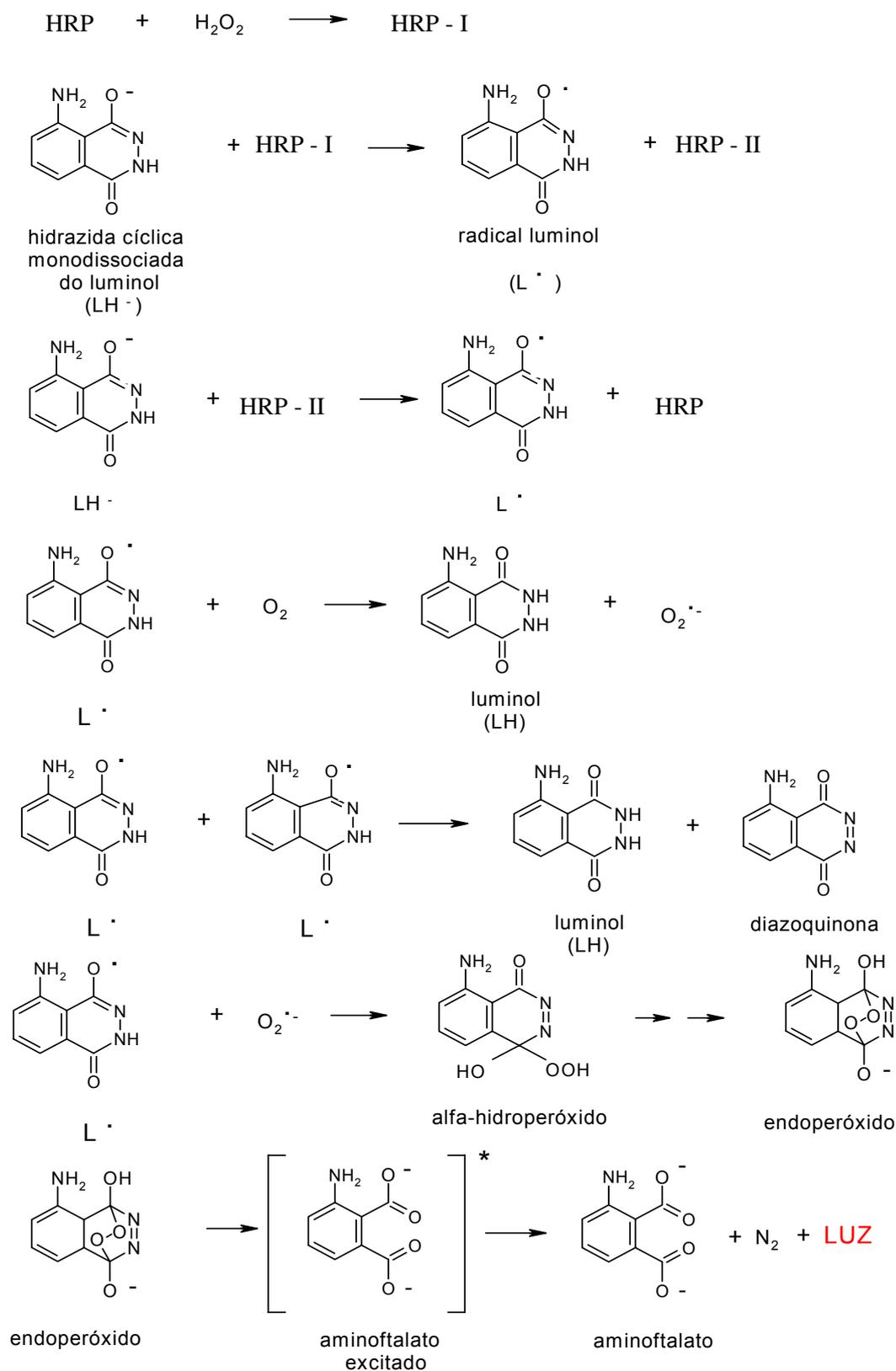
3.7. Ensaios Quimiluminescentes para Avaliação da Produção de ERO

A produção de ERO foi avaliada por ensaio quimiluminescente dependente de luminol; a quimiluminescência foi medida em um luminômetro BIO Orbit 1251 (Turku, Finland) por 5 ou 10 minutos e a integral de emissão de luz usada como parâmetro

analítico. As reações foram realizadas a 25 °C, em um volume final de 1 mL, e as concentrações dos reagentes utilizados estão expressas nas figuras.

A oxidação do luminol em meio aquoso, gerando quimiluminescência, pode ser obtida por várias ERO (peróxido de hidrogênio, radical superóxido, ácido hipocloroso e oxigênio singlete), em especial na presença de catalisadores como mieloperoxidase, peroxidase de raiz forte (HRP), catalase, xantina oxidase; metaloproteínas como citocromo C, haptoglobulina; e íons inorgânicos como ânion persulfato, cátions de Fe^{+3} , Cu^{+3} e Cu^{+2} e seus complexos (DODEIGNE et al, 2000).

Em meio tamponado e na presença de enzimas como HRP ou MPO e H_2O_2 , o monoânion luminol (LH^-) é oxidado, formando o radical luminol (L^\cdot); este, na presença de oxigênio regenera luminol e forma radical superóxido. O radical luminol pode sofrer também recombinação espontânea produzindo luminol e a diazoquinona correspondente. Um alfa-hidroperóxido é gerado pela reação entre $\text{O}_2^{\cdot -}$ e o radical luminol, com posterior adição intramolecular e formação de um endoperóxido. Após liberação do N_2 , forma-se o aminoftalato no estado eletronicamente excitado que, ao decair para o estado fundamental, emite luz fluorescente (Esquema 5) (BRIHEIM et al, 1984; DAHLGREN; STENDAHL, 1983; DODEIGNE et al, 2000; MERENY et al, 1990; MIYASAWA et al, 1994; XIAO et al, 2000). O alfa-hidroperóxido pode também ser formado pela reação entre a diazoquinona e o $\text{O}_2^{\cdot -}$ se este estiver presente no sistema (XIAO et al, 2000).



Esquema 5. Mecanismo de oxidação do luminol. Modificado de DODEIGNE et al, 2000; FAULKNER; FRIDOVICH, 1993; MERENY et al, 1990; MIYASAWA et al, 1994; XIAO et al, 2000.

3.8. Separação de Leucócitos Humanos por Gradiente de Densidade em Ficcol – Hypaque® (ENGLISH; ANDERSEN, 1974)

Foi preparada uma mistura de 6 mL de sangue total em heparina, com 3 mL de PBS pH 7,4.

Em tubos plásticos cônicos de centrífuga de 15 mL, adicionou-se 3 mL de Hystopaque® – 1077. Cuidadosamente colocou-se 3 mL do sangue total diluído como descrito acima sobre o Hystopaque® 1077. Centrifugou-se a 700 x g (raio = 8 cm) por 30 minutos a temperatura ambiente; após a centrifugação, removeu-se com cuidado os tubos da centrífuga.

Neste procedimento, observa-se a presença de uma camada opaca, composta por leucócitos totais. Aspirou-se e descartou-se o líquido até cerca de 0,5 cm da camada e as células foram transferidas para um tubo devidamente etiquetado. Lavou-se as células separadas com tampão PBS pH 7,4 duas vezes e, para fazer a contagem, ressuspendeu-se em 2 mL de PBS - D pH 7,4. As células foram contadas em câmara de Neubauer.

Para a separação de mononucleares, utilizou-se também o Hystopaque® 1119, que foi adicionado antes do Hystopaque® 1077. Após a centrifugação, recuperou-se a camada superior de células, que correspondem aos mononucleares. O procedimento de lavagem e contagem de células foi o mesmo descrito anteriormente.

3.9. Ensaio de Citotoxicidade

Foi realizado através do teste de exclusão pelo Azul de Trypan, onde as células viáveis não incorporam o corante, apresentando-se brilhantes quando observadas em microscópio óptico, em câmara de Neubauer. Os leucócitos (1×10^6 células/mL) foram incubados em PBS-D em várias concentrações dos substratos em teste, na presença ou ausência de HRP 2 $\mu\text{mol/L}$ por uma hora, a 37°C. Após incubação essa suspensão foi misturada com uma solução de azul de Trypan 0,5%, na proporção 1:1, por 5 minutos. As células foram observadas em microscópio e contadas como coradas ou não coradas em câmara de Neubauer, e as células

mortas foram calculadas em porcentagem (XU et al, 2005). Utilizamos como controle o mesmo número células ressuspensas em PBS-D.

Foram feitas lâminas em centrífuga Cytospin 248 - Fanem para observação das células após o tempo de incubação. As lâminas foram coradas com corante hematológico MayGrunwald-Giemsa e a morfologia das células observada em microscópio óptico comum.

3.10. Ensaaios com Linhagem Celular de Hepatoma Humano (HepG2):

As células HepG2 são muito utilizadas em estudos de citotoxicidade, pois apesar de serem tumorais, têm alta capacidade de metabolização, devido à presença de diversas enzimas que compõem a fase I (ativação) e fase II (detoxificação) do metabolismo de xenobióticos. Através desse modelo experimental, é possível refletir melhor o metabolismo de compostos *in vivo*, do que em células metabolicamente incompetentes (LEITE, S., 2006). No presente trabalho, utilizou-se as células HepG2 para detectar a formação intracelular de ERO através de detecção por teste de fluorescência.

3.10.1. Cultura Celular:

As células HepG2 (American Type Culture Collection, nº HB 8065) foram mantidas em meio MEM (Minimum Essential Medium Eagle – Sigma Aldrich), suplementado com soro fetal a 10%, penicilina G 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL em garrafas próprias para cultura, a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de O₂, por tempo suficiente para a obtenção de número de células necessárias para os ensaios. As células vivas aderem à garrafa de cultura e para destacá-las e poder fazer sua recuperação para a utilização em testes, utilizou-se uma solução de tripsina e força mecânica. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias para que não houvesse esgotamento de nutrientes.

3.10.2. Geração de ERO nas células:

A geração de ERO foi monitorada através o uso de uma sonda fluorescente, a 2,7'- diclorofluoresceína (DCF). As células HepG2 foram removidas do meio de

cultura através de centrifugação e ressuspensas em tampão PBS pH 7,4 contendo diacetato de 2,7'- diclorofluoresceína (DCFH-DA – Molecular Probes, Invitrogen) em concentração final de 10 $\mu\text{mol/L}$. Após Incubação a 37°C por uma hora, as células foram lavadas e ressuspensas em tampão PBS pH 7,4. As células ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram então incubadas com HRP 2 $\mu\text{mol/L}$ e PD em várias concentrações e monitorou-se a fluorescência em um espectrofluorímetro Hitachi 3000, utilizando-se os comprimentos de onda de 495 nm para excitação e 527 nm para emissão. A linha de base foi determinada com células e tampão e o controle positivo realizado com adição de t-butil-hidroperóxido 250 $\mu\text{mol/L}$ às células.

O diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) é capaz de difundir através de membranas celulares e subsequentemente é deacetilado por esterases intracelulares, formando um produto não-fluorescente, a dihidroclorofluoresceína (DCFH); esta última, quando oxidada por ERO (preferencialmente peróxidos, hidroperóxidos e NO^\bullet), passa para a forma altamente fluorescente diclorofluoresceína (DCF) (Figura 16).

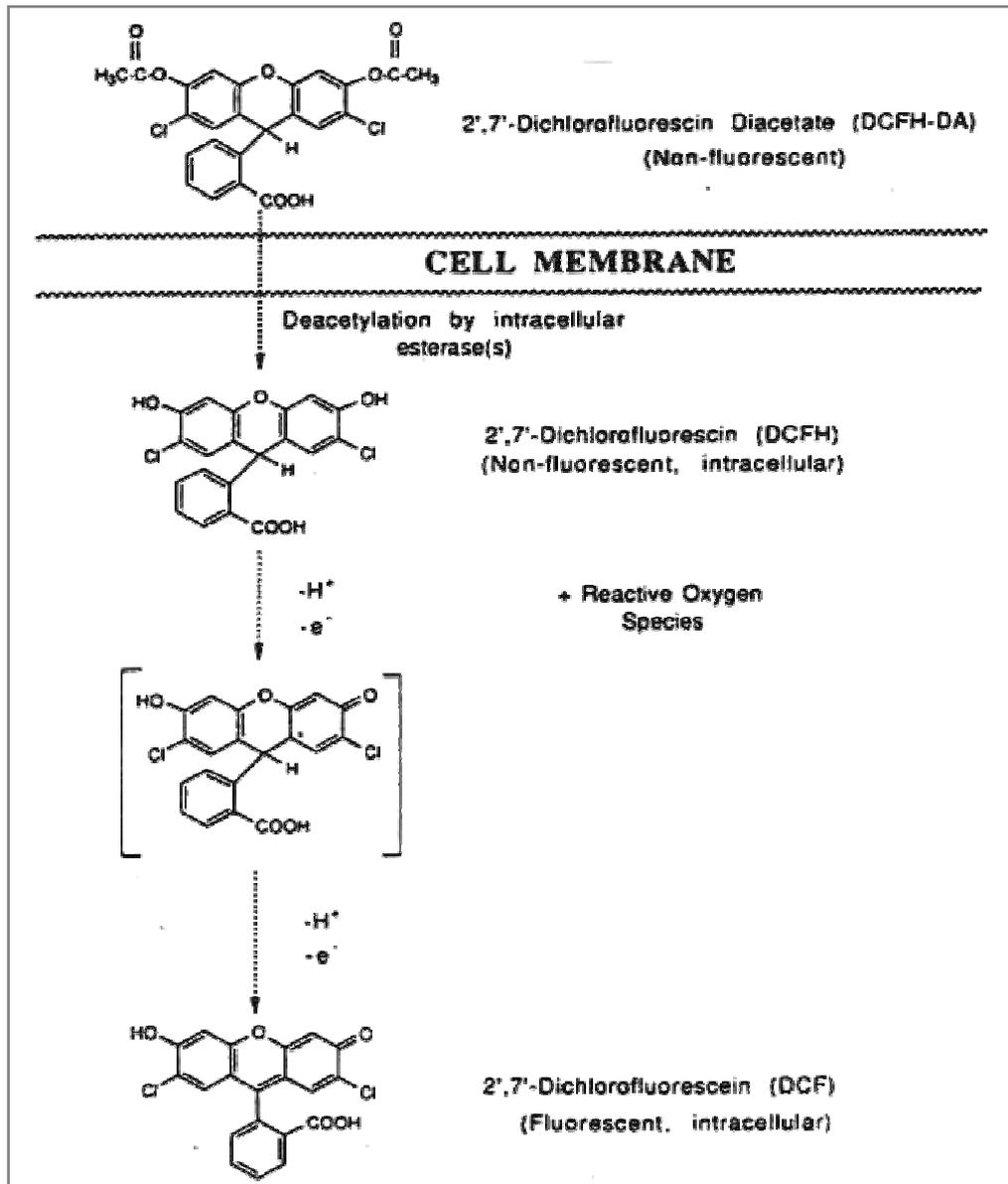


Figura 16. Mecanismo de detecção de ERO intracelular pelo uso de DCFH-DA (adaptado de LEBEL et al, 1992).

3.11. Análise Estatística:

A comparação entre os diferentes substratos e a presença ou ausência da enzima foi feita por análise estatística. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e as análises estatísticas realizadas pelo teste ANOVA (análise de variância), onde foi estabelecido o nível de significância de $p < 0,05$. O número de experimentos (n) está representado em cada figura.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo de Consumo de Oxigênio nas Reações de Oxidação de Compostos β -Dicarbonílicos (PD, Me-PD, AcAc, CH e DM), IAA e 5-OH-IAA Catalisadas pela HRP na Ausência de H_2O_2

A HRP é uma enzima que depende de peróxidos orgânicos ou inorgânicos para oxidar seus substratos, na maioria das reações. Mas existem relatos na literatura de alguns substratos que são eficientemente oxidados pela HRP na ausência de peróxido, como por exemplo, IAA, NADH e diidroxifumarato (KRYLOV, 1998).

Nestes casos, uma das propostas é que a enzima esteja atuando como uma oxidase, sendo levada à sua forma ferrosa, a qual reage rapidamente com o oxigênio molecular dando origem ao composto III (HRP-III) (DUNFORD, 1999).

Neste trabalho, observou-se que as β -dicetonas 2,4-pentanodiona (PD) e metil-2,4-pentanodiona (Me-PD) também se comportam como alguns dos compostos acima relacionados, ou seja, são eficientemente oxidados pela HRP na ausência de peróxido. Verificou-se nos estudos de consumo de oxigênio que entre os compostos selecionados, somente a PD, Me-PD e IAA são facilmente oxidados em reação catalisada pela HRP, na ausência de peróxido de hidrogênio.

A figura 17 mostra o consumo de oxigênio molecular dissolvido no meio de reação, quando HRP é adicionada aos substratos investigados. A velocidade de reação foi cerca de 4,5 vezes maior quando utilizou-se Me-PD como substrato, em relação à PD. Para o IAA, já existem relatos em literatura sobre o consumo de oxigênio nestas condições (PIRES de MELO et al, 1992), e sua velocidade de consumo de oxigênio em relação à PD foi 2,5 vezes maior.

Observou-se ainda que existe uma considerável diferença na oxidação do IAA e do seu metabólito natural ácido 5-hidroxi-3-indolacético (5-OH-IAA); outros estudos já haviam comparado vários derivados de IAA em relação à oxidação por HRP, como por exemplo: 2-metil-IAA, 5-flúor-IAA, 1-metil-IAA, 6-cloro-IAA, 5-cloro-IAA, entre outros (ROSSITER et al, 2002).

Para o 5-OH-IAA não foi encontrada informações desta reação na literatura. Observou-se que o 5-OH-IAA sofre alterações de coloração quando solubilizado em etanol (como se procedeu para o IAA). Foi também observado alterações espectrais do 5-OH-IAA, minutos após a solubilização.

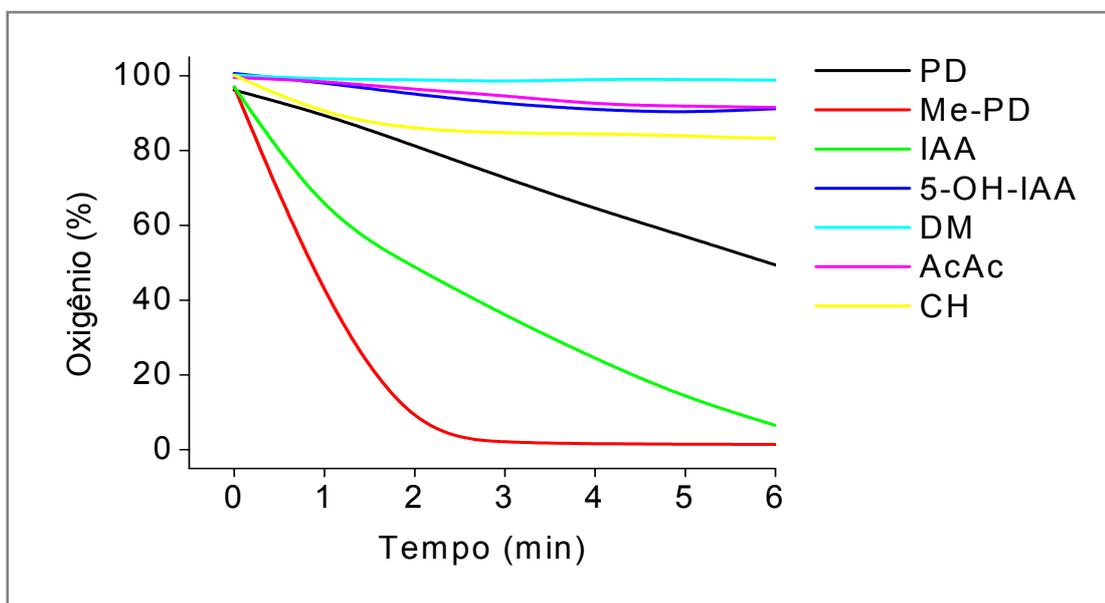


Figura 17. Consumo de oxigênio na oxidação de 2,4-pentanodiona, metil-2,4-pentanodiona, ácido 3-indolacético, ácido 5-hidroxi-3-indolacético, dimedona, acetoacetato e 1,3-ciclohexanodiona. Condições da reação: HRP 0,5 $\mu\text{mol/L}$, compostos testados 3 mmol/L, tampão fosfato 100 mmol/L, pH 7,4, a 37°C. Gráfico representativo de ensaios realizados em triplicata.

De acordo com esses resultados (Figura 16), prosseguiu-se os estudos sobre a PD e a Me-PD, que foram oxidadas com eficiência na reação catalisada pela HRP. Para o IAA muitos dados já estão disponíveis na literatura (DE MELO et al, 2004; KIM et al, 2006; PIRES de MELO et al, 1992, 1998); porém, alguns ensaios foram também realizados com o IAA para efeito comparativo.

A oxidação dos compostos foi realizada em tampões com diferentes pH e observou-se que existe variação na velocidade da reação de acordo com o pH do meio (Figura 17); as reações tendem a ser mais eficientes em pH em torno de 8,5 para PD e de 9,5 para Me-PD, sendo que para a PD, uma alcalinização superior à essa reduz a eficiência da oxidação. Soares e Bechara (1982), já haviam observado um efeito drástico no consumo de oxigênio na reação de Me-PD/HRP quando o pH variava de 7 para 8.

Já o IAA teve eficiência máxima em valores extremos de pH de 5 e 10. A alteração do pH do meio, como esperado, altera o equilíbrio cetona-enólico dos substratos estudados, influenciando o mecanismo da reação de oxidação destes

substratos pela HRP. Os processos que consomem O_2 , catalisados por peroxidase, são denominados de reações peroxidase-oxidase. Para as reações de oxidação do IAA catalisada pela HRP, duas vias são postuladas, dependendo das condições do meio, levando à formação de radicais diferentes que iniciam a reação (KRYLOV, 1998; TAFAZOLI; O'BRIEN, 2004). Em pH elevado, prevalece a via peroxidásica, há formação de um hidroperóxido do substrato, da HRP-I e HRP-II. Em meio ácido, prevalece a via oxidásica, que envolve a formação da HRP na forma ferrosa e subsequente produção de HRP-III e $O_2^{\bullet -}$. O sistema IAA/HRP/ O_2 não envolve HRP-III em meio neutro, acredita-se que nessa situação o IAA seja convertido ao seu radical cátion indolil (GAZARIAN, 1996; KRYLOV, 1998).

De acordo com estudos realizados por Tafazoli e O'Brien (2004), em pH 6, a reação IAA/HRP/ O_2 forma o radical escatol que reage com O_2 molecular formando um radical peroxil, enquanto em pH 7,4 também foi detectado o aparecimento do radical indolil; a reação de consumo de O_2 foi bem mais eficiente em pH 6 do que em pH 7,4, assim como observou-se nos nossos experimentos (Figura 18) .

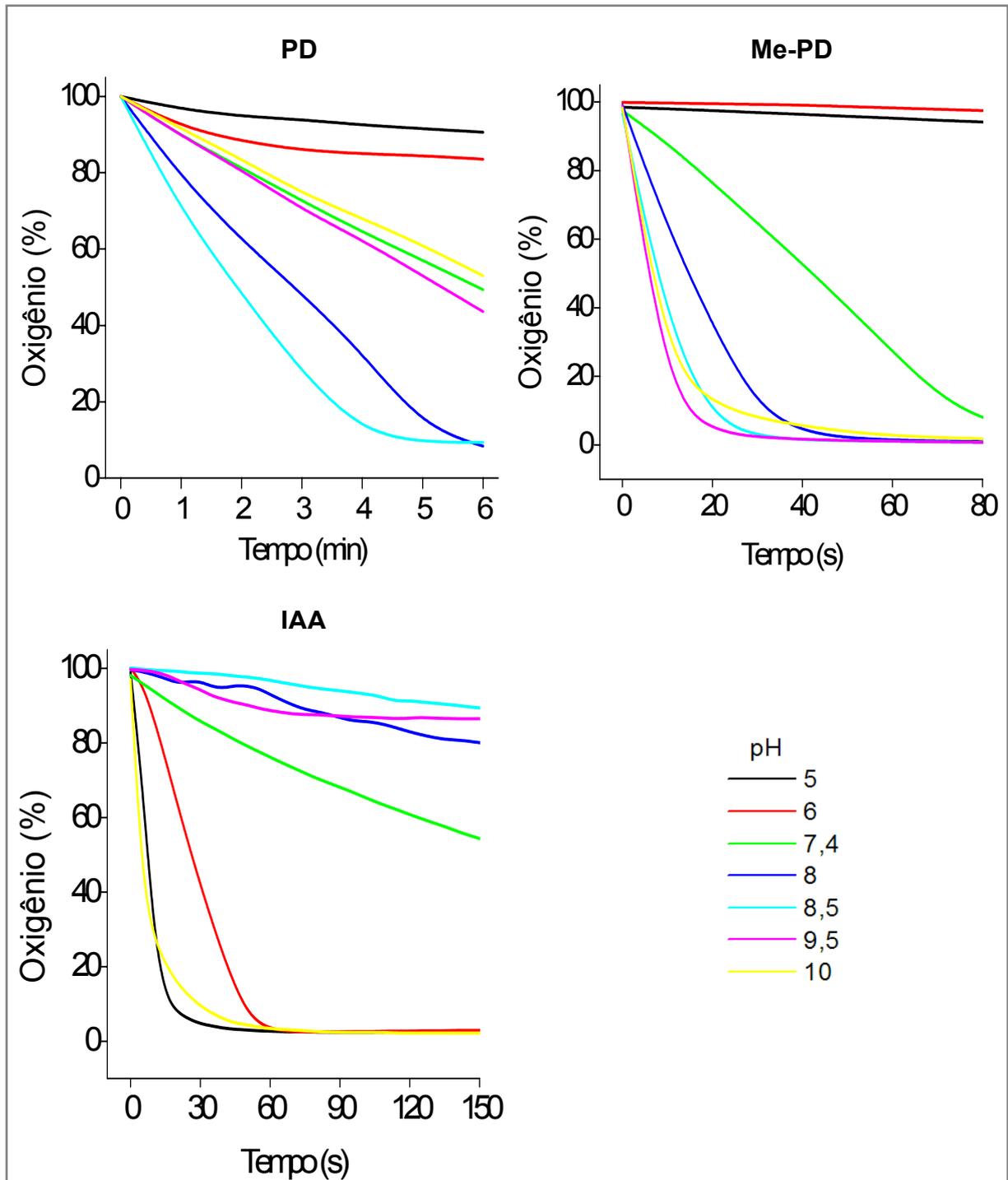


Figura 18. Efeito do pH do meio reacional na oxidação de PD, Me-PD e IAA. Condições da reação: HRP 0,5 $\mu\text{mol/L}$, PD, Me-PD e IAA 3 mmol/L em tampões com vários pH (tampão citrato 100 mmol/L pH 5 e 6, tampão fosfato 100 mmol/L pH 7,4, tampão Tris-HCl 200 mmol/L pH 8 e 8,5, tampão MAP 200 mmol/L pH 9,5 e 10), a 37°C. Gráfico representativo de ensaios realizados em triplicata.

4.2. Cinética das Reações de Oxidação de Compostos β -Dicarbonílicos (PD e Me-PD) e IAA Catalisadas pela HRP na Ausência de H_2O_2

Verificou-se que a concentração da PD, bem como a concentração da enzima, tem influência direta na velocidade de oxidação, como pode ser observado nas figuras 19 e 20, respectivamente. A figura 19 representa a velocidade de consumo de oxigênio em função da concentração de substrato utilizado, e, através dela, foi possível calcular a constante de Michaelis (k_M) para a PD, que foi de $48 \pm 7,5$ mmol/L e a velocidade máxima de consumo de oxigênio que foi de $1,8 \pm 0,09$ μmol de O_2/s . A curva foi plotada pelo programa gráfico Origin, a partir de velocidades calculadas de reações de consumo de oxigênio onde variou-se concentrações de substrato.

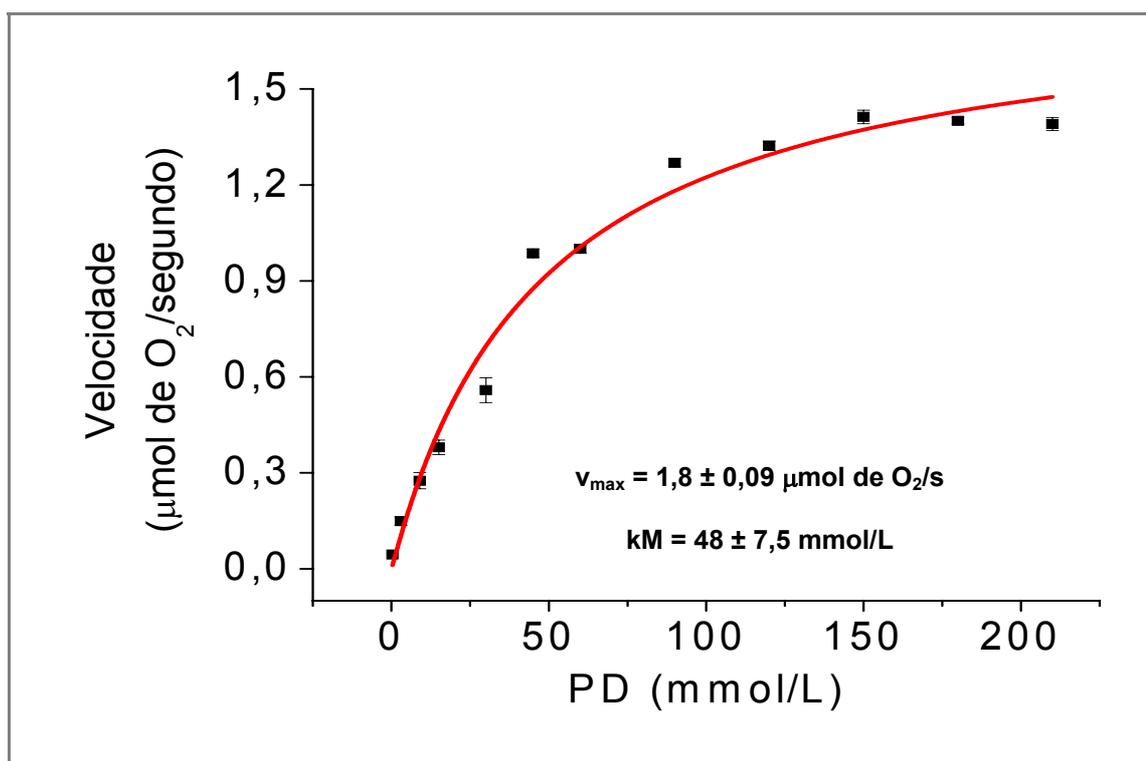


Figura 19. Velocidade de consumo de oxigênio na oxidação da PD catalisada por HRP. Condições da reação: PD em várias concentrações, HRP $0,5$ $\mu\text{mol/L}$, tampão fosfato 100 mmol/L, pH $7,4$, a 37°C . Média \pm desvio padrão de ensaios realizados em triplicata.

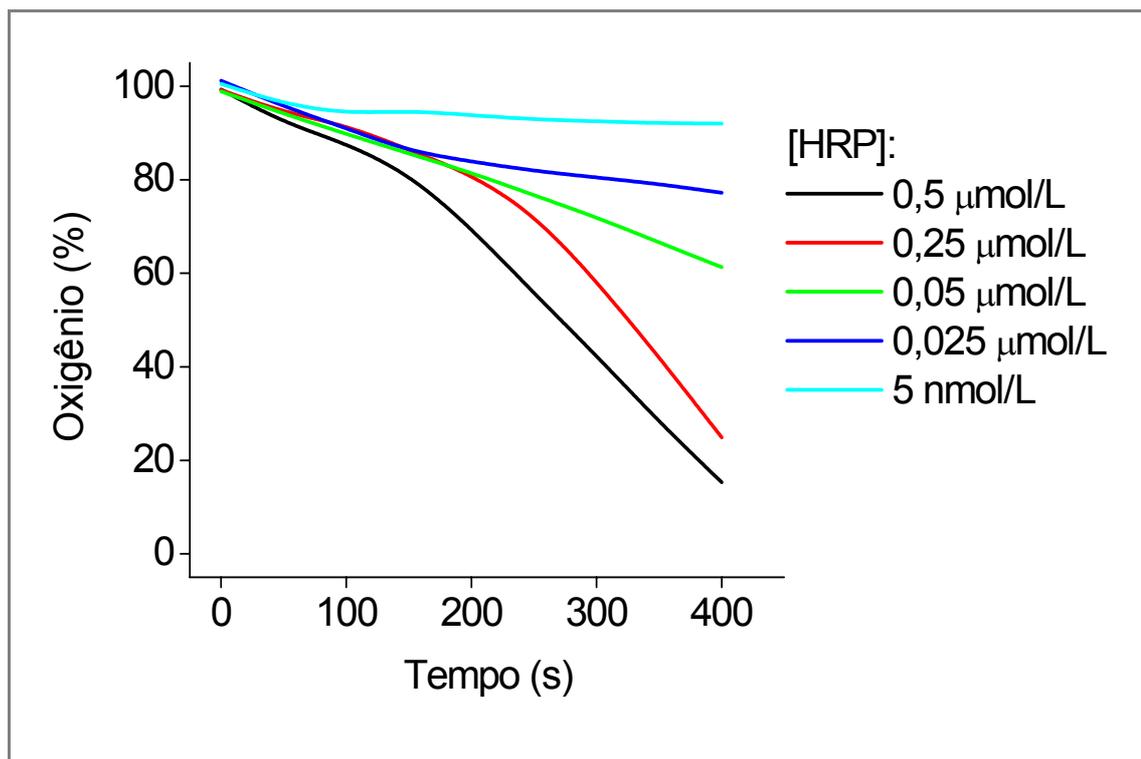


Figura 20. Influência da concentração de HRP na oxidação da PD. Condições da reação: HRP em várias concentrações (especificadas na figura), PD 3 mmol/L, tampão fosfato 100 mmol/L, pH 7,4, a 37°C. Gráfico representativo de ensaios realizados em triplicata.

A oxidação da Me-PD seguiu os mesmos padrões da PD em relação à concentração do substrato, mas atingindo uma velocidade de consumo de O_2 muito superior, como pode ser observado na figura 21. A velocidade máxima de reação neste caso foi de $4,4 \pm 0,8 \mu\text{mol de } O_2/\text{s}$ e a constante de Michaelis (K_M) para a Me-PD foi de $0,22 \pm 0,09 \mu\text{mol/L}$, calculados pelo programa Origin, da mesma maneira descrita para a Figura 19.

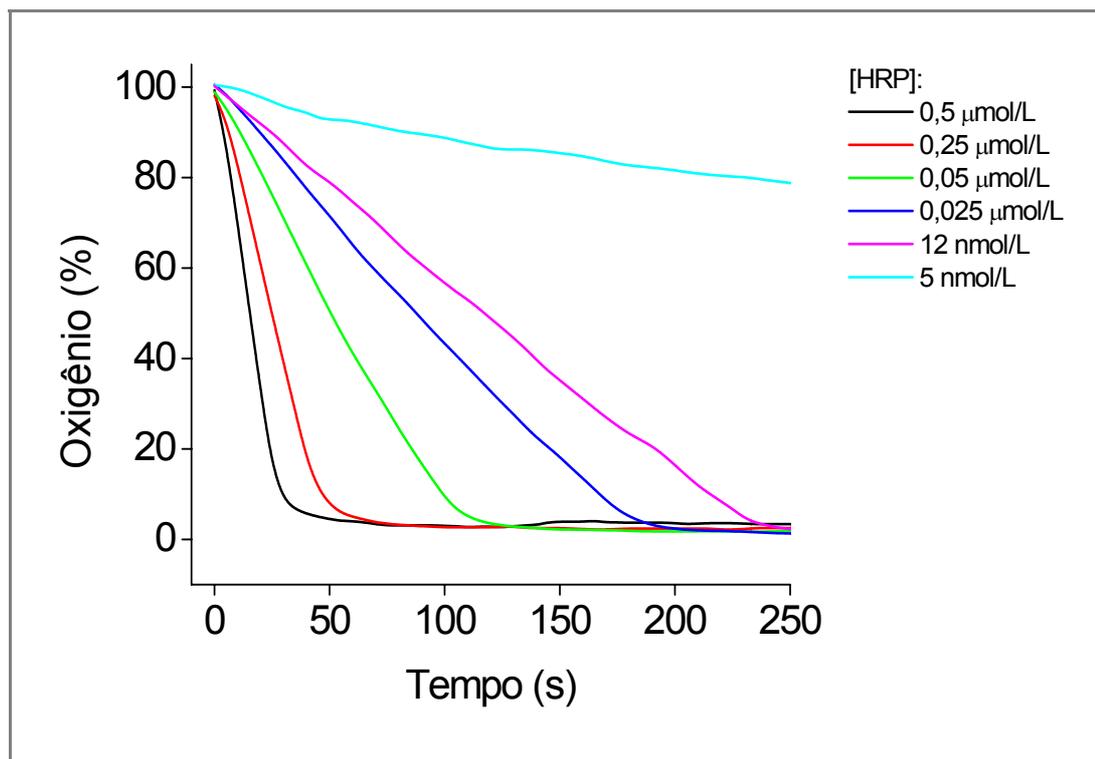


Figura 21. Influência da concentração de HRP na oxidação da Me-PD. Condições da reação: HRP em várias concentrações (especificadas na figura), Me-PD 3 mmol/L, tampão fosfato 100 mmol/L, pH 7,4, a 37°C. Gráfico representativo de ensaios realizados em triplicata.

Para o IAA também foi observada variação de velocidade da reação conforme o aumento da concentração do substrato, como pode ser observado na figura 22; observa-se que o valor da k_M para o IAA ($2,6 \pm 0,85$ mmol/L) é bem menor que o k_M da PD, nas mesmas condições de reação. Contudo, a velocidade máxima atingida nesse caso ($1,8 \pm 0,19$ μmol de O_2/s) é praticamente a mesma daquela observada para a PD. Em concentrações saturantes de substrato a velocidade é praticamente a mesma, mas o valor de k_M para o IAA é menor, o que mostra sua maior adequação à HRP, em relação à PD. Já a Me-PD, como pode ser observado na figura 20 e nos dados retirados desta, foi o substrato oxidado com maior velocidade pela HRP e também o que demonstrou maior adequação à HRP, já que a k_M ($0,22 \pm 0,09$ $\mu\text{mol/L}$) foi bastante inferior tanto à da PD como do IAA.

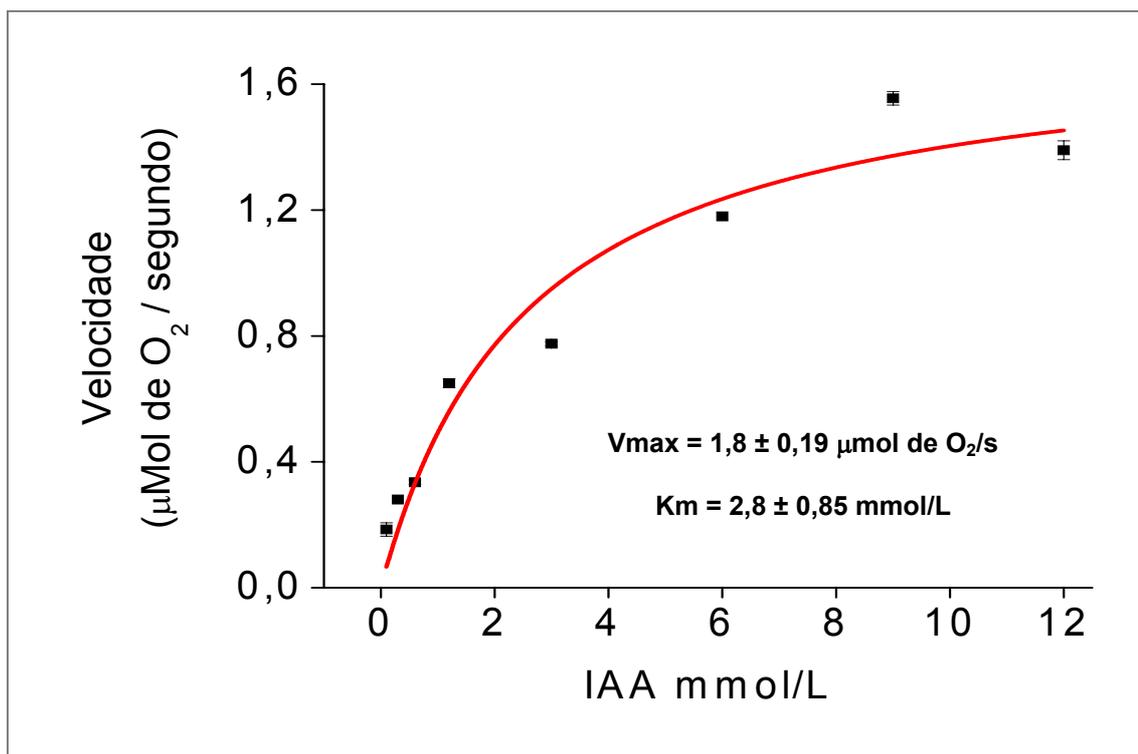


Figura 22. Velocidade de consumo de oxigênio na oxidação do IAA catalisada por HRP. Condições da reação: IAA em várias concentrações, HRP 0,5 µmol/L, tampão fosfato 100 mmol/L pH 7,4, a 37°C. Média ± desvio padrão de ensaios realizados em triplicata.

Visto ser a HRP uma enzima que catalisa reações de diversos substratos, geralmente na presença de peróxidos ou hidroperóxidos orgânicos, realizaram-se também algumas reações na presença de peróxido de hidrogênio, e observou-se que na concentração de H₂O₂ de 1×10^{-4} mol/L e 1×10^{-5} mol/L, a velocidade da reação aumenta significativamente para PD, enquanto que para Me-PD e IAA o aumento de velocidade é mais sutil (Figura 23). Em altas concentrações de H₂O₂, a HRP pode ser inativada (RYAN et al, 1994), fato comprovado pela diminuição da eficiência da reação de consumo de oxigênio quando se adicionou H₂O₂ na concentração de 1mmol/L (Figura 23).

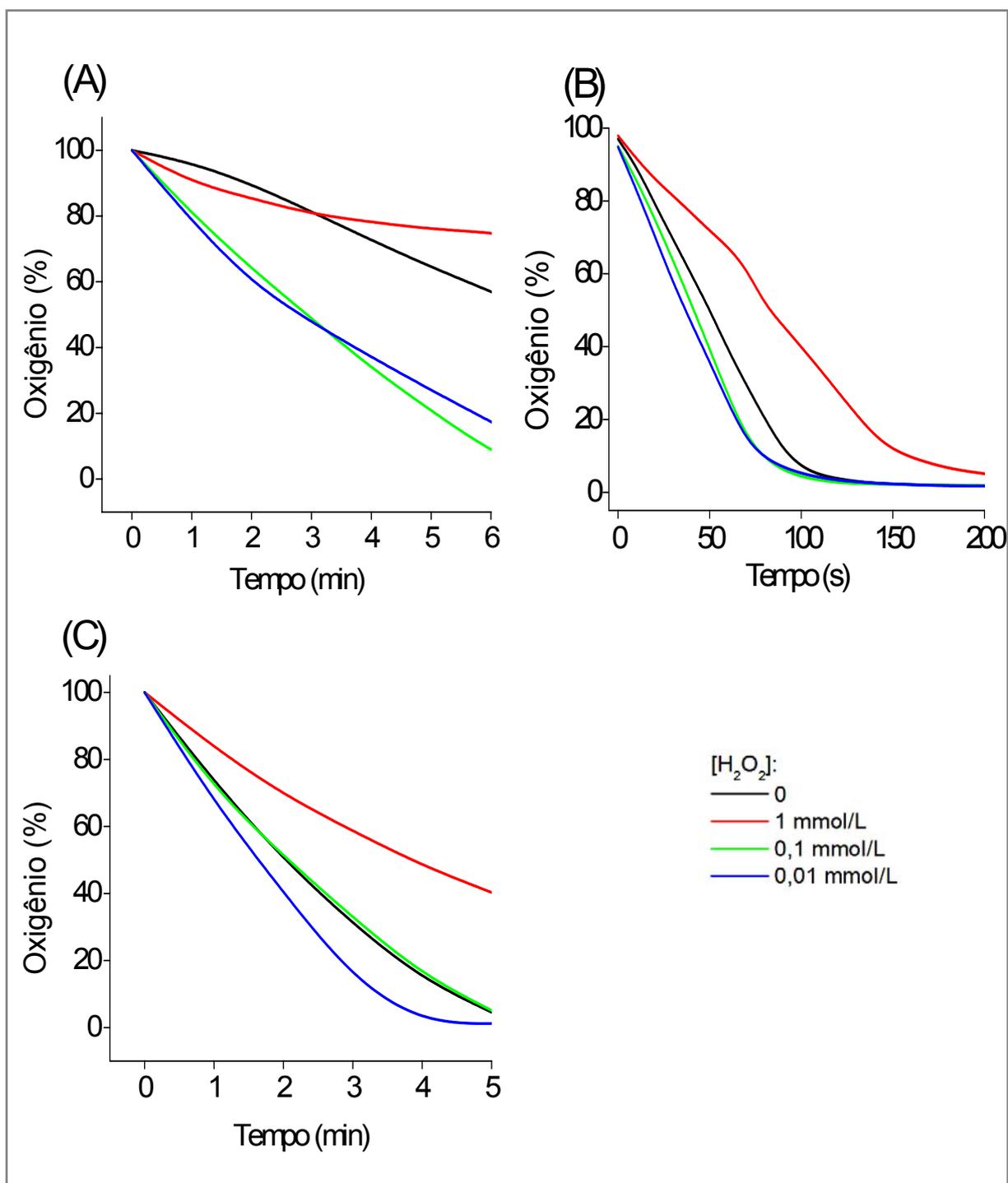


Figura 23. Consumo de oxigênio provocado por oxidação PD (A), Me-PD (B) e IAA (C) pela HRP, na ausência e na presença de H₂O₂. Condições da reação: HRP 0,5 μmol/L, PD, Me-PD ou IAA 3 mmol/L, tampão fosfato 100 mmol/L pH 7,4, a 37°C e H₂O₂ em várias concentrações (descritas na figura). Gráfico representativo de ensaios realizados em triplicata.

4.3. Ciclo Catalítico da HRP na Reação de Oxidação da PD na Ausência de H₂O₂

Para investigar o ciclo catalítico da HRP durante a reação, observou-se a mudança espectral da HRP na região do UV-Vis durante o curso da reação com a PD. A figura 24-A mostra que a enzima nativa foi convertida à sua forma redox composto III (HRP-III) ou oxiperoxidase, que apresenta como característica principal a Banda Soret a 418 nm e duas bandas no visível, em aproximadamente 545 e 580 nm (BAADER et al, 1985; XIMENES et al, 2001). Tal mudança espectral foi observada somente após a adição do substrato, a PD. Observou-se ainda que a adição da catalase não interferiu na formação do composto III, mas acelerou a volta da enzima à sua forma nativa, como pode ser observado quando compara-se as posições das bandas de absorção em relação aos tempos indicados (Figura 24-B).

A adição de SOD provocou o aparecimento da forma redox composto II, com banda Soret a 418 nm e duas bandas no visível em aproximadamente 525 e 545 nm (XIMENES et al, 2001); além disso, a reação é acelerada em relação à reação na ausência de SOD, com retorno muito mais rápido da enzima à forma nativa (Figura 24-C). A formação de HRP-III também não é observada na reação de oxidação do IAA por HRP quando SOD está presente (GAZARIAN, 1996).

Diferente do IAA, para a PD observou-se claramente a formação de HRP-III em meio neutro; e como este pode ser formado por três vias principais, já descritas anteriormente (Esquema 1), procurou-se explorar cada uma delas para esclarecer as vias pelas quais o composto III estava sendo formado, na reação de oxidação da PD catalisada pela HRP.

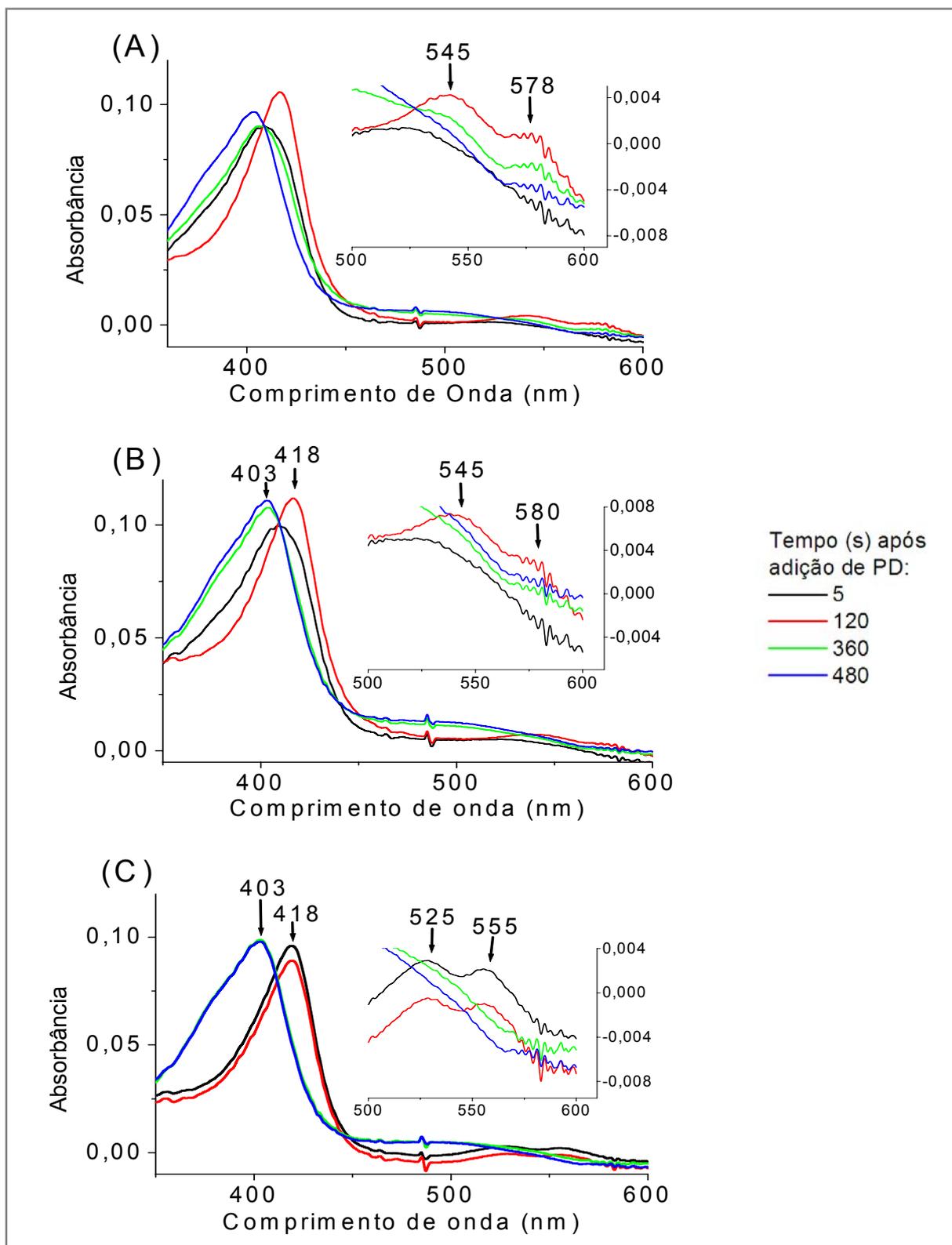


Figura 24. Variação espectral da HRP durante oxidação da PD. Condições da reação: (A) HRP 1 μmol/L, PD 3 mmol/L, tampão fosfato 100 mmol/L pH 7,4 , a 37°C; (B) o mesmo de (A) com adição de catalase, 20 μg/mL. (C) o mesmo de (A) com adição de SOD, 20 μg/mL. Gráfico representativo de ensaios realizados em triplicata.

A formação de HRP-III não estaria ocorrendo através de excesso de H_2O_2 , já que a adição de catalase no meio não impediu sua formação (Figura 24-B).

A aceleração da alteração espectral quando a SOD está presente no meio de reação, corroborou com o aumento na velocidade de consumo de oxigênio, como pode ser observado na figura 25, que mostra ser a formação da HRP-II e/ou HRP-III (Banda Soret em 418 nm) concomitante ao consumo de oxigênio, em condições experimentais idênticas. No ensaio da figura 25-A, a HRP em tampão foi utilizada como branco de reação e o comprimento de onda de 418 nm foi fixado para que através da absorbância fosse registrado o tempo de ida da enzima à composto II e/ou III e sua volta à forma nativa.

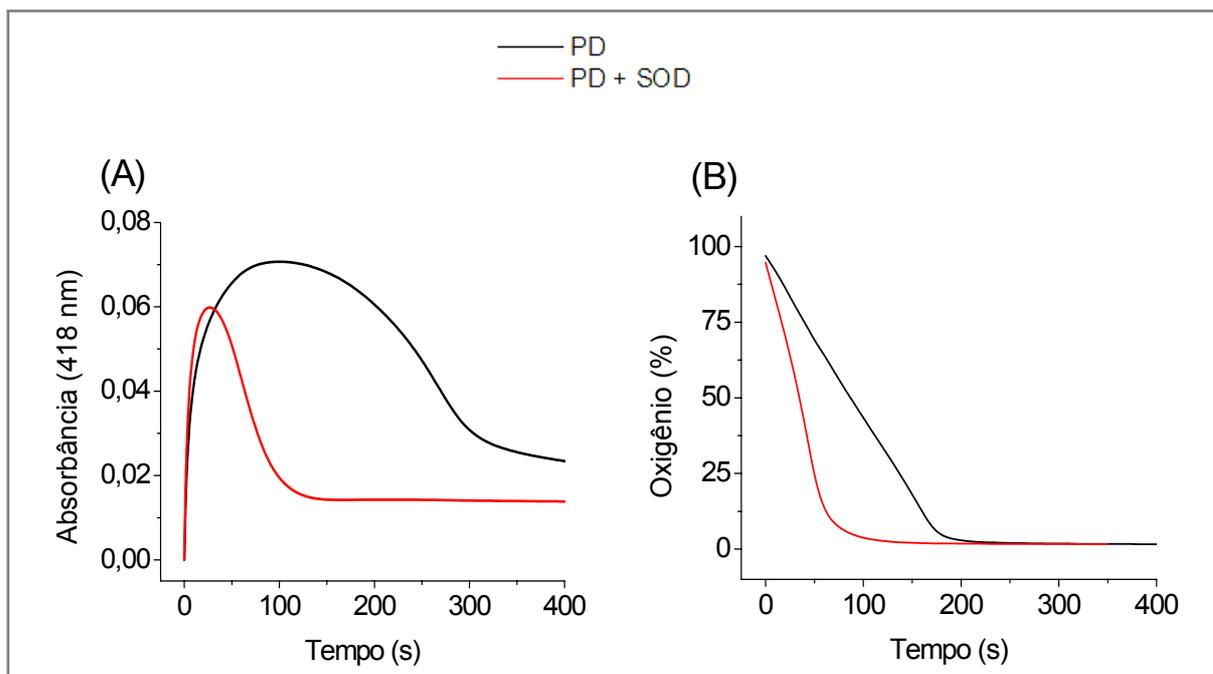


Figura 25. Efeito da presença da SOD no ciclo da HRP e no consumo de oxigênio pela reação PD/HRP. (A) Variação da absorbância da HRP a 418 nm e (B) consumo de oxigênio. Condições da reação: HRP 1 $\mu\text{mol/L}$, PD 3 mmol/L , tampão fosfato 100 mmol/L , pH 7,4, a 37°C; SOD 20 $\mu\text{g/mL}$, quando presente. Gráfico representativo de ensaios realizados em triplicata.

Quando ocorre uma oxidação direta do substrato pela enzima na forma nativa, é possível a formação de HRP na forma ferrosa, que é reduzida e muito instável, e reage rapidamente com O_2 formando HRP-III (DUNFORD, 1999). Uma

vez que a HRP é capaz de catalisar a oxidação da PD na ausência de peróxido de hidrogênio e com a observação da formação de composto III, realizou-se um experimento com a finalidade de verificar se tal efeito envolvia a forma reduzida da enzima (forma ferrosa). Para tal, foi utilizada uma cubeta selada (Thunberg cell) contendo HRP e tampão fosfato, nessa mistura foi borbulhado nitrogênio para forçar a saída de ar; a partir disso, misturou-se a PD que se encontrava em um compartimento isolado da cubeta.

Como se observa na figura 26-A, não houve mudança espectral da HRP nessas condições, ou seja, sem qualquer envolvimento da forma reduzida da enzima (ferrosa), a qual apresentaria Banda Soret em 440 nm (SMULEVICH et al, 1997). Entretanto, ao permitir a entrada de ar na cubeta, visualizou-se a formação de composto III (Figura 26-B); neste experimento ficou bem evidente a dependência do oxigênio para que a reação de oxidação da PD catalisada pela HRP se inicie.

Portanto, por exclusão, acredita-se que a formação de HRP-III ocorra através da reação da HRP nativa com $O_2^{\bullet-}$ (reação 6, Esquema 1), fato comprovado quando adicionou-se superóxido dismutase no meio de reação, que provoca a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e a enzima seguiu o seu ciclo clássico (HRP-I e HRP-II) (Figura 24-C).

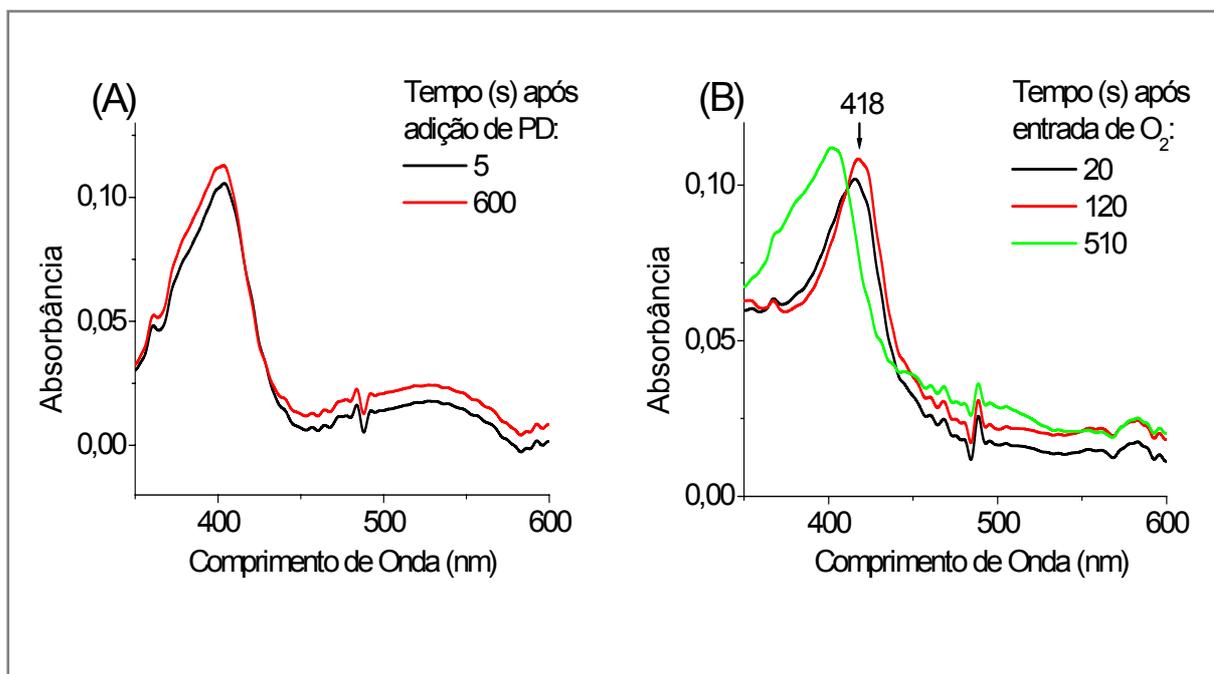


Figura 26. Efeito do oxigênio na oxidação da PD catalisada por HRP. Condições da reação: (A) Tampão fosfato 100 mmol/L borbulhado com nitrogênio, contendo PD 3 mmol/L e HRP 1 μ mol/L. (B) Após introdução de ar no meio de reação. Gráfico representativo de ensaios realizados em triplicata.

Observou-se ainda que a adição de catalase, além de não evitar a formação de composto III, também não interferiu na reação de consumo de O₂ da mistura PD/HRP (Figura 27), corroborando com a idéia de que a formação de HRP-III não poderia ocorrer através de excesso de H₂O₂.

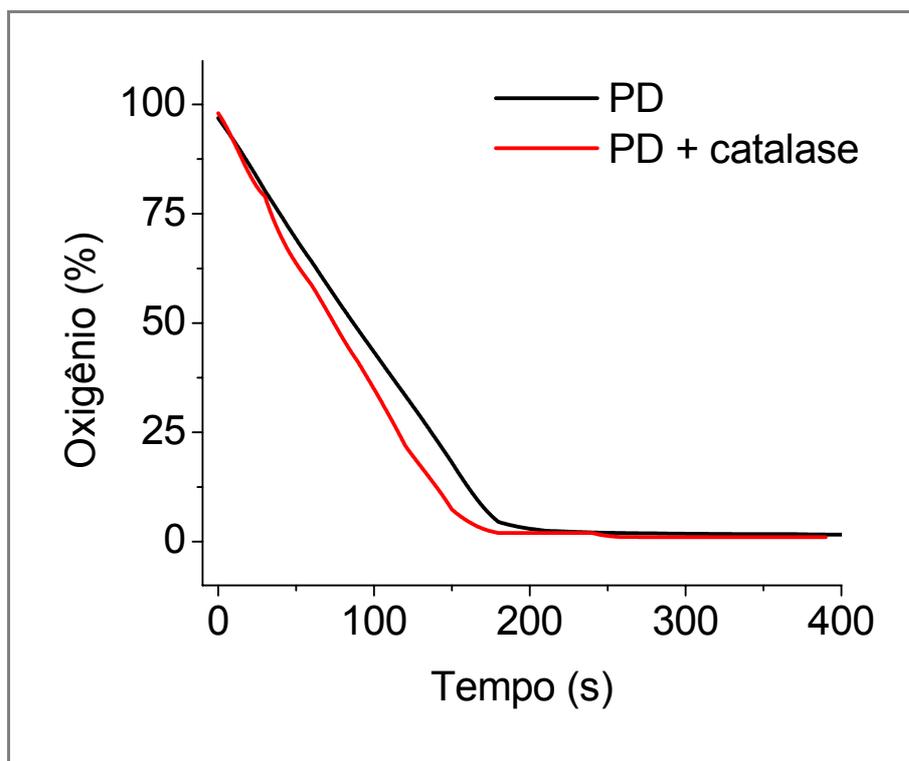


Figura 27. Efeito da catalase no consumo de oxigênio da reação PD/HRP. Condições da reação: HRP 1 $\mu\text{mol/L}$, PD 3 mmol/L , tampão fosfato 100 mmol/L , pH 7,4, a 37°C; catalase 20 $\mu\text{g/mL}$, quando presente. Gráfico representativo de ensaios realizados em triplicata.

A figura 28 comprovou os resultados obtidos em relação ao comportamento da reação monitorada pelo consumo de oxigênio e o pH do meio de reação; como pode ser visto, a reação de oxidação da PD não ocorreu em pH 6, pois não observou-se mudança espectral da HRP (Figura 28-A), bem como consumo de oxigênio (Figura 18). Em pH 7,4 ocorreu tanto o consumo de oxigênio (Figuras 18) como a alteração espectral da HRP (Figuras 28-B) e, por fim, em pH 8,5, tanto o consumo de oxigênio foi mais rápido, como o ciclo da HRP (Figuras 18 e 28-C, respectivamente). Esses dados também reforçam que existe forte correlação entre a variação espectral das formas redox da enzima e o consumo de O_2 do meio reacional, permitindo assim investigar o mecanismo de reação.

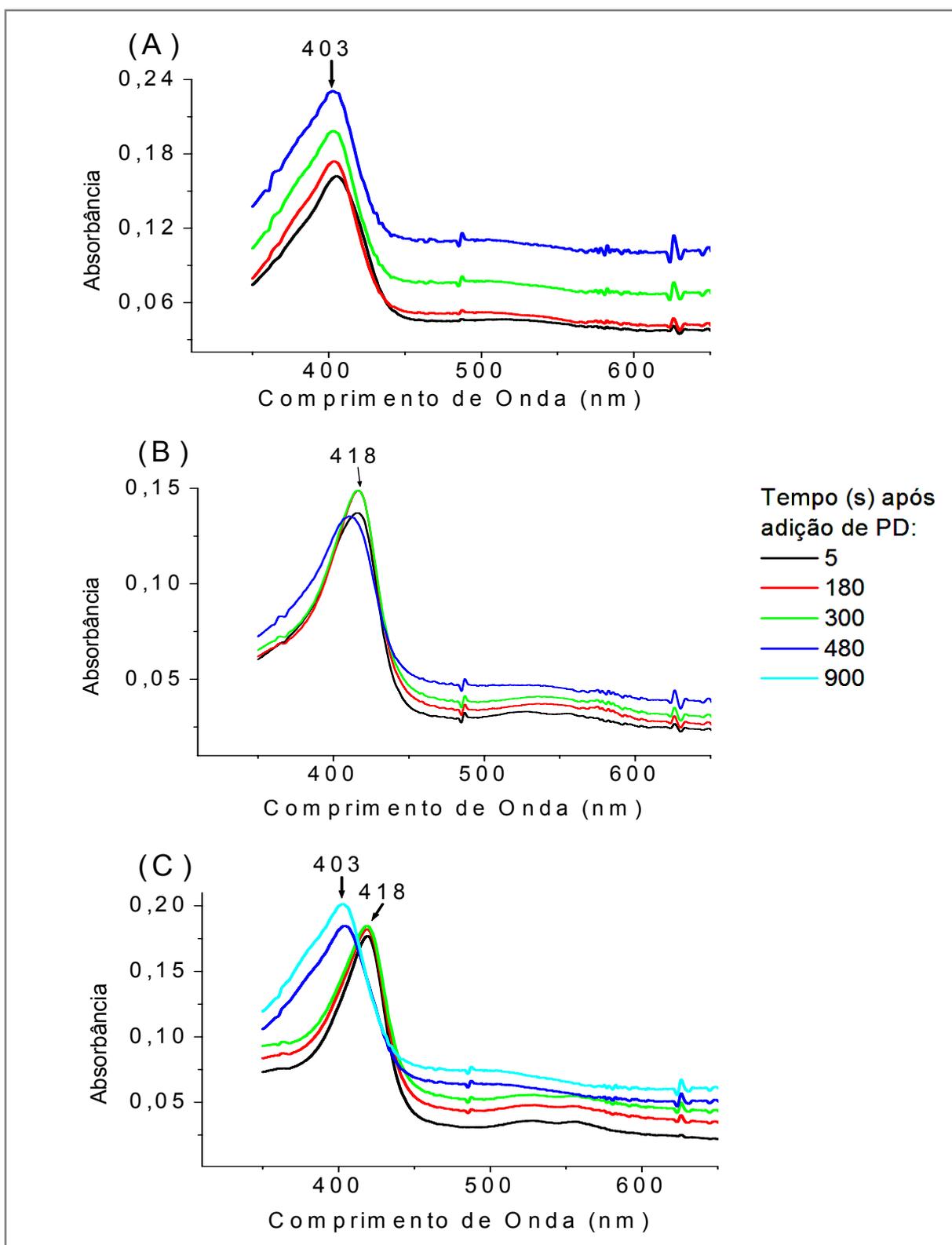


Figura 28. Efeito do pH na oxidação da PD catalisada por HRP. (A) Tampão citrato pH 6 (B) Tampão fosfato pH 7,4. (C) Tampão Tris HCl pH 8,5; todos contendo PD 3 mmol/L e HRP 1 μ mol/L. Gráfico representativo de ensaios realizados em triplicata.

4.4. Produtos de Reação da Oxidação da PD Catalisada pela HRP

É bem conhecido que o acetoacetato (AcAc) é oxidado pela HRP ou MPO na presença de H_2O_2 , formando metilglioxal (MG) como um dos produtos de reação (KALAPOs, 1999). A partir da semelhança estrutural entre o AcAc e a PD, realizou-se um experimento para identificar o produto da oxidação da PD por HRP, que provavelmente também seria o MG.

Primeiramente padronizou-se um método de derivatização do MG pelo o-fenilenodiamino (ver materiais e métodos), para sua detecção em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O MG disponível no comércio (Sigma) teve sua concentração determinada através de derivatização com cloreto de semicarbazida (Tabela 1). Após a padronização da técnica de HPLC, submeteu-se a mistura de reação da oxidação da PD catalisada pela HRP à HPLC. A figura 29 mostra o cromatograma representando o pico relativo ao MG padrão e à mistura de reação, aos 7 minutos do início do processo de detecção.

Também observou-se que ocorre a formação de ácido pirúvico, através da adição de cloreto de cálcio na mistura da reação e subsequente formação de um sal branco insolúvel, correspondente ao piruvato de cálcio. O ácido pirúvico é um produto da autooxidação do metilglioxal (KALAPOs, 1999), como pode ser observado no esquema proposto (Esquema 6). Utilizou-se como controle da reação a PD e o MG, e nenhum destes apresentaram qualquer reação com cloreto de cálcio. A produção de metilglioxal na reação não acompanhou a estequiometria, provavelmente devido à sua rápida transformação em ácido pirúvico.

A detecção de MG e piruvato como produtos da reação de oxidação da PD catalisada por HRP está de acordo com o que foi encontrado por Straganz et al. (2002) em trabalhos onde estudava-se a clivagem da PD catalisada pela enzima DKe1 extraída de linhagens bacterianas de *Acinetobacter johnsonii*. Tal fato reforça os resultados obtidos e mostra similaridade no poder catalítico entre a HRP e tais enzimas, frente à oxidação da PD.

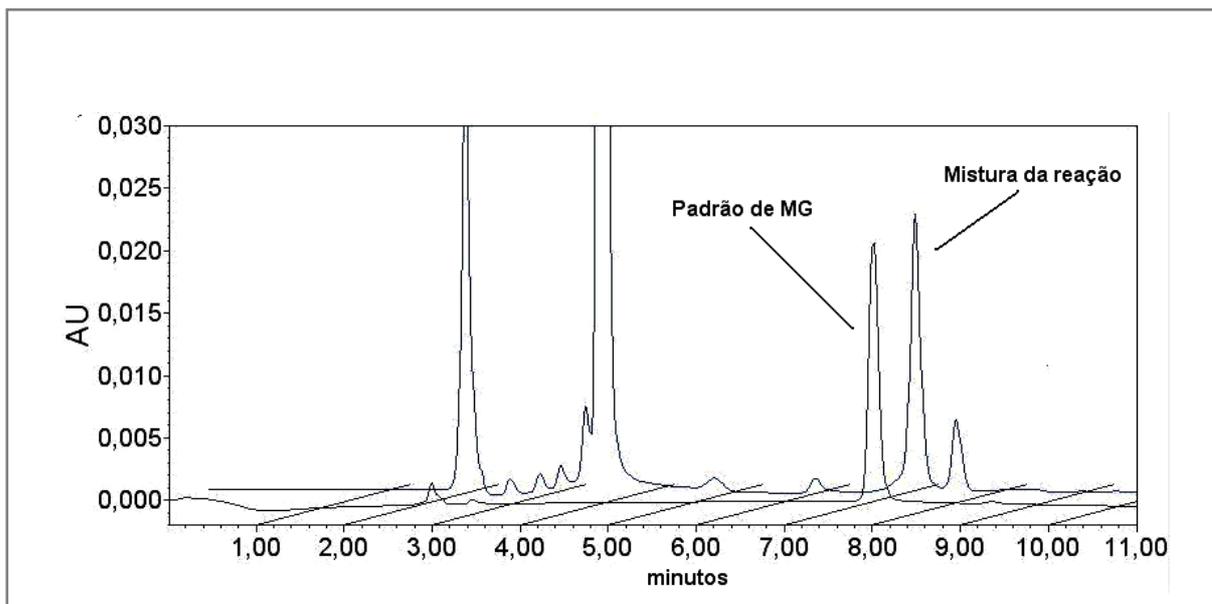
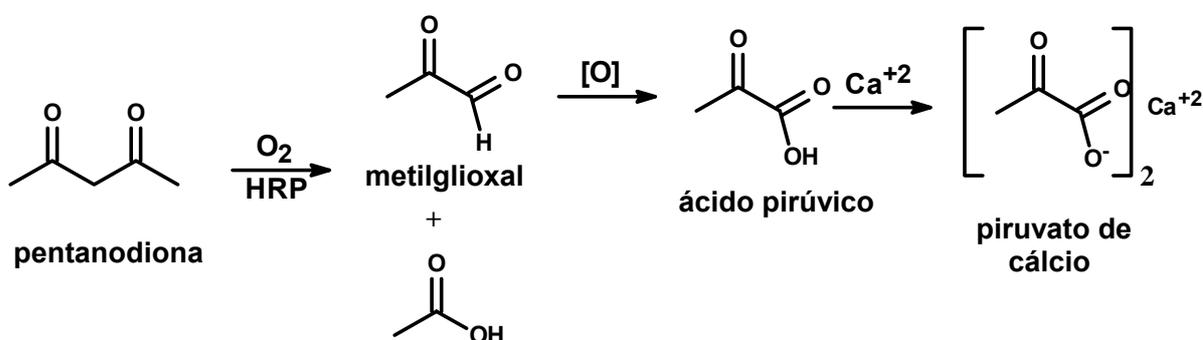


Figura 29. Perfil cromatográfico do produto da reação da PD após oxidação catalisada pela HRP e MG puro (ver materiais e métodos para maiores detalhes)



Esquema 6. Via proposta para a produção de metilglioxal e ácido pirúvico pela oxidação da PD catalisada por HRP (RODRIGUES et al, 2006)

Para detectar a possível formação de ERO durante o processo de oxidação da PD catalisada pela HRP, utilizou-se a quimiluminescência dependente de luminol. Neste procedimento, a PD foi incubada com luminol (sonda quimiluminescente), em tampão fosfato 100 mmol/L pH 7,4 e a reação foi disparada com a adição de HRP. A figura 30 mostra que ocorreu formação de ERO durante a reação, e que estas foram capazes de oxidar eficientemente o luminol, produzindo luz. Observou-se também que tal resposta foi totalmente dependente da concentração da enzima. Através da

adição de catalase, observou-se supressão da emissão de luz, mostrando assim, que H_2O_2 está sendo formado durante a reação de oxidação da PD. A adição de SOD também interfere significativamente na emissão de luz, dando indícios de confirmando a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ na reação PD/HRP/ O_2 .

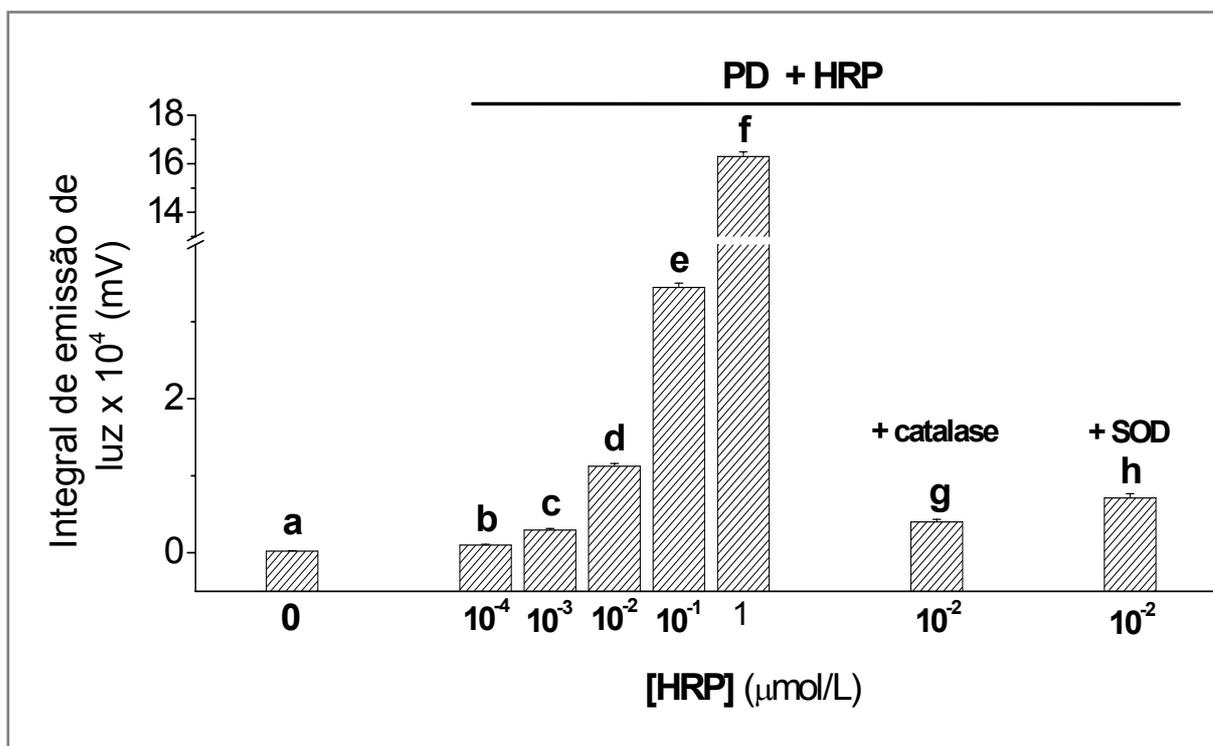


Figura 30. Produção de ERO durante oxidação da PD catalisada por HRP. Condições da reação: luminol 0.1 mmol/L, PD 1 mmol/L, tampão fosfato 100 mmol/L (pH 7.4). Quando presente, a concentração de catalase e SOD foi de 20 $\mu\text{g/mL}$. Reação foi monitorada por 10 minutos. Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n = 5$)

Fixando-se a concentração da enzima, observou-se que a produção de ERO respondeu à alteração na concentração do substrato (PD), como pode ser observado na figura 31. Nessa mesma figura, observa-se que a hemina, na mesma concentração utilizada de HRP, não tem a capacidade de oxidar a PD, nem mesmo em altas concentrações do substrato.

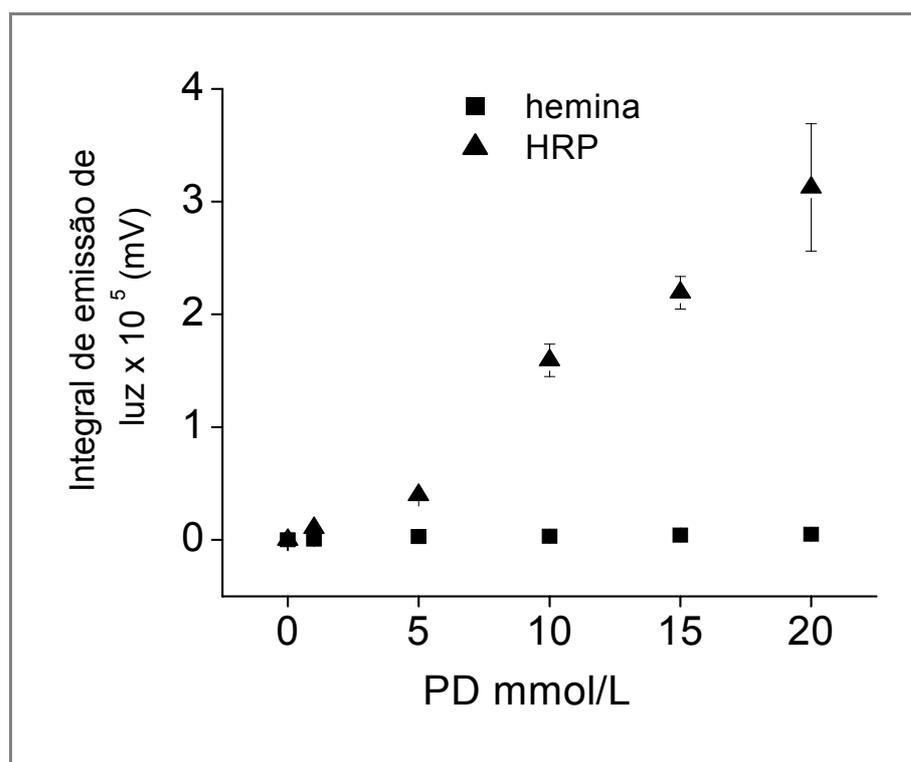


Figura 31. Produção de ERO durante oxidação da PD catalisada por HRP. Condições da reação: luminol 0.1 mmol/L, PD em várias concentrações, HRP ou hemina 1 $\mu\text{mol/L}$, tampão fosfato 100 mmol/L (pH 7.4). Reação monitorada por 5 minutos. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de ensaios realizados em triplicata.

A variação no pH para reação HRP/PD alterou significativamente a emissão de luz (Figura 32). Em outros experimentos, como o estudo do ciclo da HRP (Figura 28) e de consumo de oxigênio da reação (Figura 18), notou-se alterações em função da mudança no pH do meio reacional. Vários oxidantes, entre eles as ERO, podem atuar na oxidação do luminol, sendo que o peróxido de hidrogênio é o mais comum e requer catalisadores como, por exemplo, peroxidases, hemina e vários íons metálicos de transição. Em meio alcalino (geralmente pH 9-11), a oxidação do luminol é favorecida e conseqüentemente, ocorre uma maior eficiência na emissão de luz (NIEMAN, 1991); sendo assim, o resultado observado na figura 32 não deve estar obrigatoriamente relacionado a uma maior geração de ERO quando se realiza a reação entre PD/HRP nessas condições de pH.

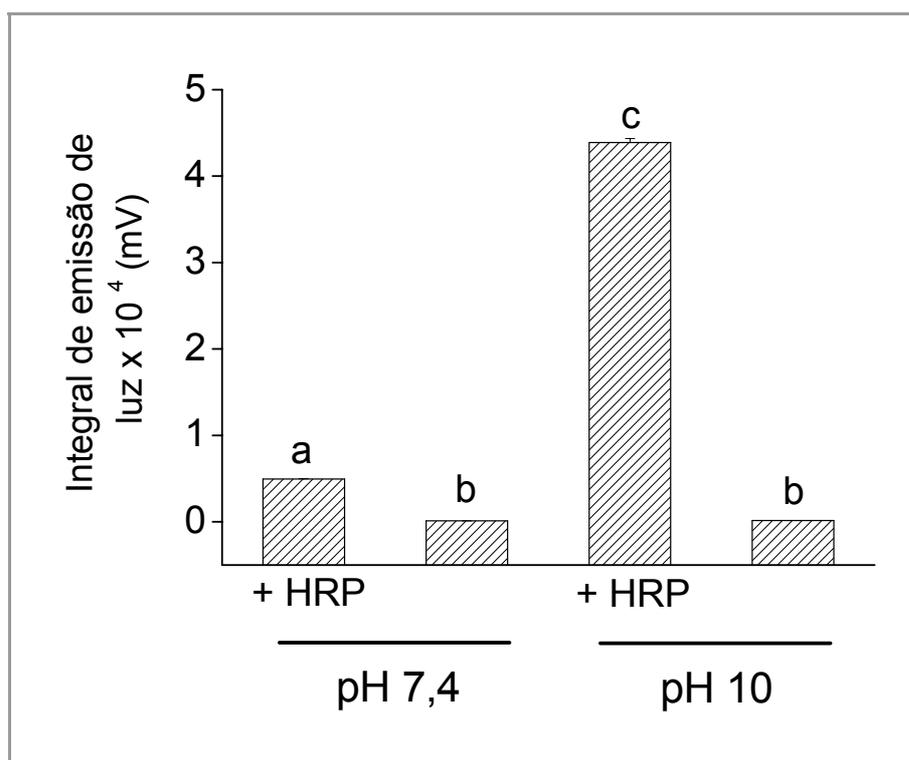


Figura 32. Produção de ERO durante oxidação da PD catalisada por HRP. Condições da reação:: luminol 0.1 mmol/L, PD 1 mmol/L, HRP 1 nmol/L quando presente, tampão fosfato 100 mmol/L pH 7.4 ou tampão MAP 200 mmol/L pH 10. Reação monitorada por 5 minutos. Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n = 3$).

Por meio de ensaios de fluorescência de diclorofluoresceína (DCF) realizados com as células HepG2, observou-se que a reação PD/HRP/O₂ produz ERO com eficiência, e que estas são capazes de permear a membrana da célula. Como pode ser visto na figura 33, a formação de ERO respondeu de maneira dose-dependente à variação na concentração de PD.

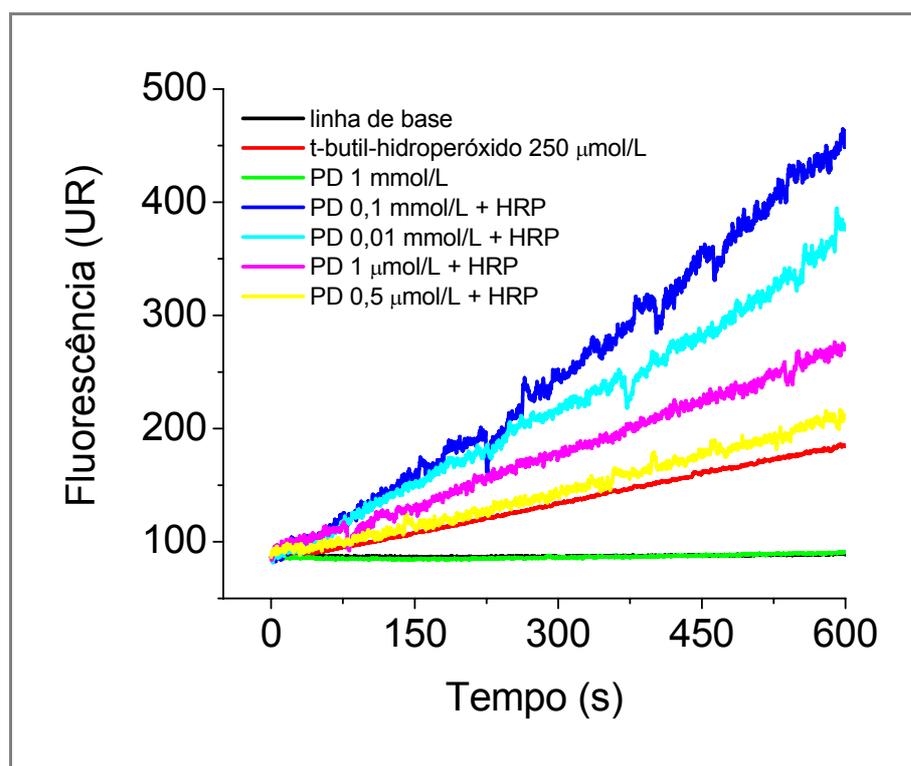


Figura 33. Efeito da reação PD/HRP/O₂ na indução de formação de ERO em células HepG2. Condições da reação: 10⁶ células/mL marcadas com DCFH-DA, HRP 2 µmol/L, PD e t-butil-hidroperóxido em concentrações descritas na figura. A linha de base representa a emissão de fluorescência somente das células marcadas em tampão PBS, pH 7,4. Gráfico representativo de ensaios realizados em triplicata.

4.5. Citotoxicidade da Reação de Oxidação da PD Catalisada pela HRP

Devido à PD ter um comportamento semelhante ao IAA frente à enzima HRP, foram realizados testes para citotoxicidade utilizando a PD e HRP, visto ser o IAA e HRP alvos de estudos para aplicação de terapias anti-tumorais direcionadas, como por exemplo, na técnica ADEPT (DE MELO et al, 2004; FOLKES; WARDMAN, 2001; ROOSEBOOM et al, 2004; WARDMAN, 2002). Para tal estudo, utilizou-se leucócitos totais obtidos de sangue de doadores saudáveis que depois de separados foram incubados com PD na presença ou na ausência da HRP, em sistema aberto, com livre difusão de oxigênio. A adição do corante supra vital Azul de Trypan, permite a visualização de células viáveis ou não viáveis, onde as viáveis apresentam-se brilhantes, não coradas. Através da contagem de células coradas e não coradas pode-se calcular a porcentagem de células não viáveis e assim avaliar a citotoxicidade. O MG também foi incluído neste teste, pois foi detectado como produto de reação entre PD e HRP, e é sabidamente citotóxico (KALAIPOS, 1999).

Observou-se que a própria PD tem efeito citotóxico, mas na presença da HRP aumentou a citotoxicidade de 6 a 8 vezes (Figura 34), dependendo da concentração utilizada. É ainda importante mencionar que uma concentração molar 10 vezes maior de MG causou efeito citotóxico menor que o sistema HRP/PD 1 mM. A Me-PD e o IAA também foram submetidos a esse teste, porém, como pode ser observado, apresentaram uma eficiência menor que a PD para o dano celular. Esse experimento foi repetido utilizando-se um fluxo direto de oxigênio sobre o sistema e também, em outro ensaio, substituindo-se o tampão PBS por tampão fosfato, e ainda, utilizando-se somente mononucleares; os resultados obtidos foram semelhantes aos apresentados aqui (Figura 34).

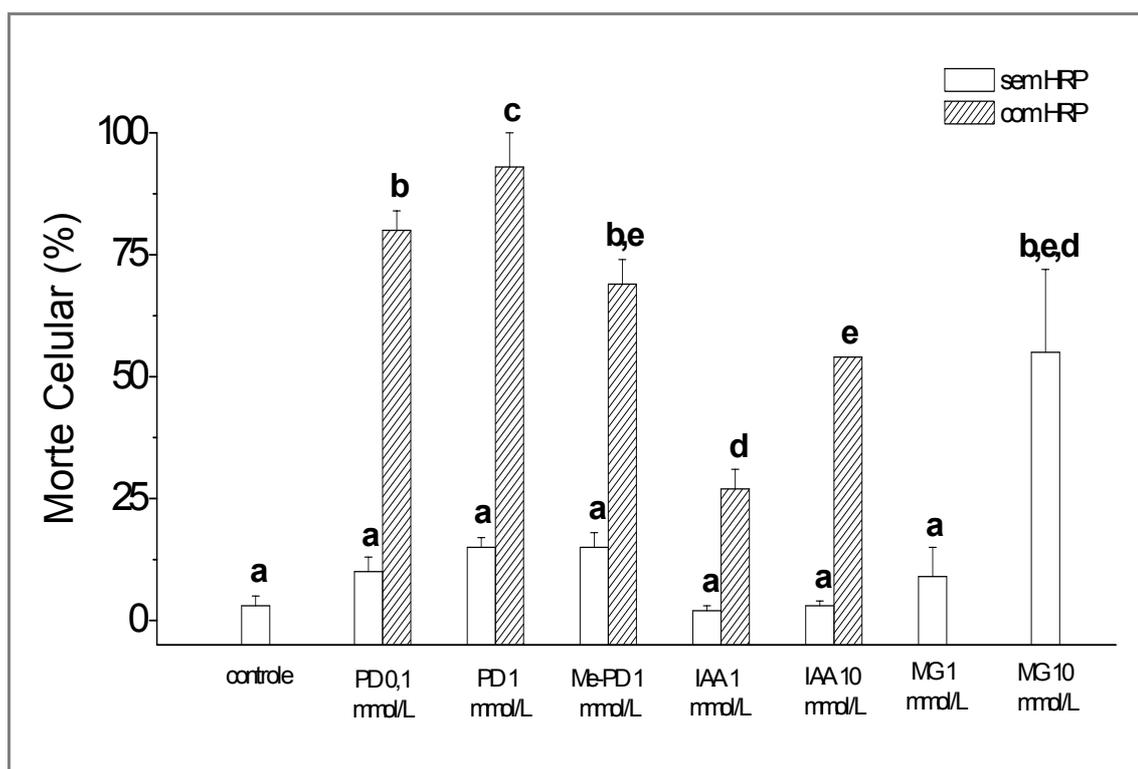


Figura 34. Efeito citotóxico de compostos em estudo na ausência e na presença de HRP. Condições do teste: 1×10^6 leucócitos/mL, HRP 2 μ mol/L (quando presente); PD, Me-PD e IAA em concentrações expressas na figura. As incubações foram realizadas em tampão fosfato 100 mmol/L pH 7,4; a 37°C. Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n=3$)

A observação de uma maior morte celular quando submeteu-se as células à reação PD/HRP em relação a adição de MG puro, induz ao fato de que a morte celular estaria ocorrendo predominantemente através da ação de ERO e não da geração de MG, apesar deste último ser comprovadamente citotóxico.

As lâminas confeccionadas em citocentrífuga demonstraram que alterações celulares são evidentes após o período de incubação das células com PD/HRP. Observa-se na figura 35 que as células da reação controle (somente 10^6 mononucleares em tampão) apresentam-se íntegras, com núcleo e citoplasma bem definido (Figura 35-A); com adição de PD, as células adquiriram basofilia citoplasmática bem característica (Figura 35-B); e submetendo-se os mononucleares à reação PD/HRP, observou-se destruição de citoplasma, bem como afrouxamento de cromatina nuclear (Figura 35-C), e em maior concentração de PD a destruição celular ficou muito mais evidente (Figura 35 -D).

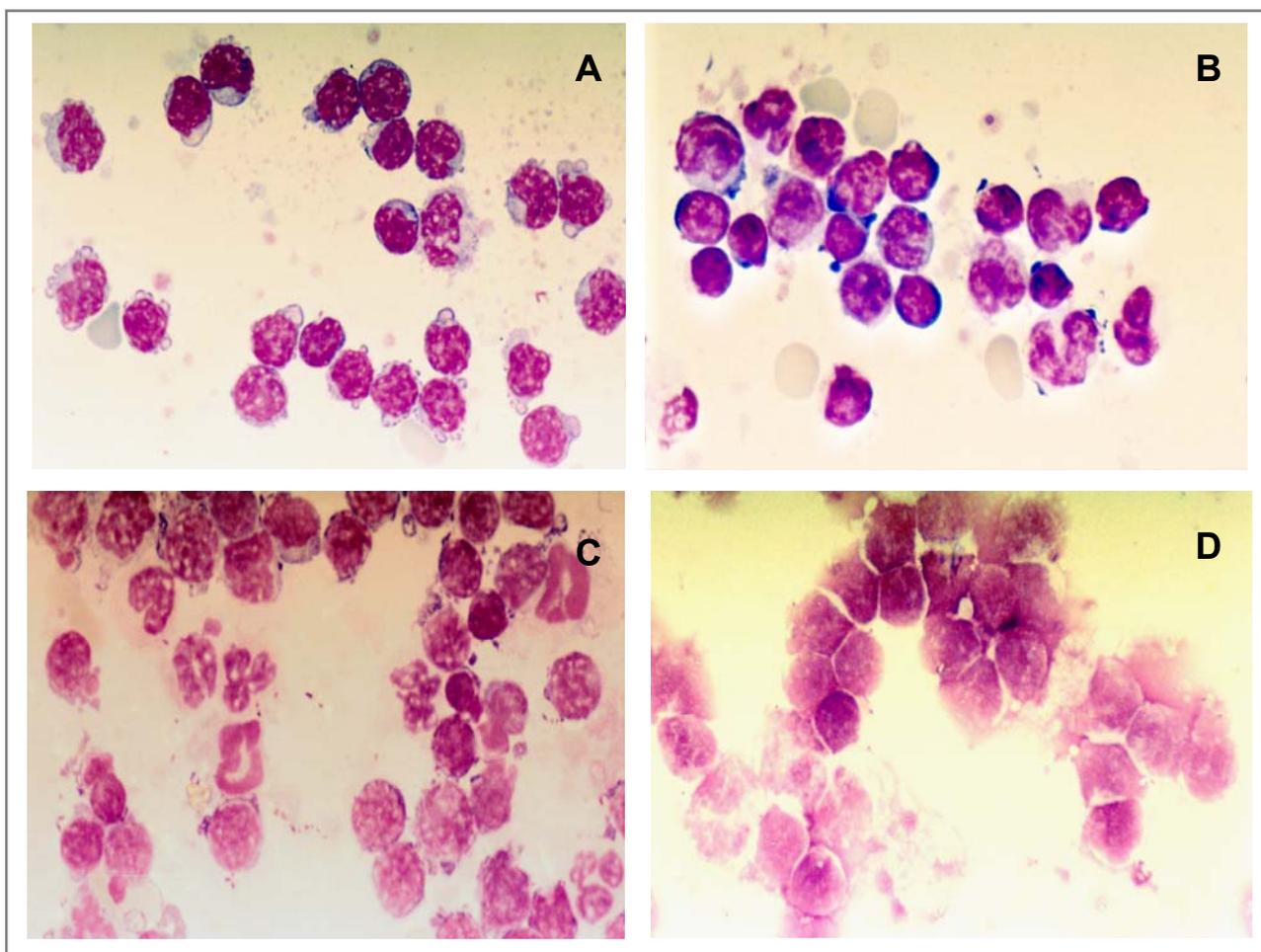


Figura 35. Lâminas preparadas em citocentrífuga com mononucleares submetidos à reação PD/HRP/O₂. **A** – reação controle (1×10^6 células incubadas em tampão); **B** – 1×10^6 células incubadas com PD 1 mmol/L; **C** – 1×10^6 células incubadas com PD 1 mmol/L + HRP 2 μ mol/L; **D** - 1×10^6 células incubadas com PD 10 mmol/L + HRP 2 μ mol/L. Fotos representativas de experimentos realizados em triplicata.

Para eliminar a hipótese de morte pela anóxia celular, realizou-se um experimento em oxígrafo em um sistema totalmente aberto (semelhante à maneira como as células foram incubadas nos testes de citotoxicidade). Tal experimento não apresentou consumo de oxigênio no sistema polarográfico (Figura 36), mostrando ser a velocidade de difusão do oxigênio do ar o suficiente para as células não morrerem por anóxia.

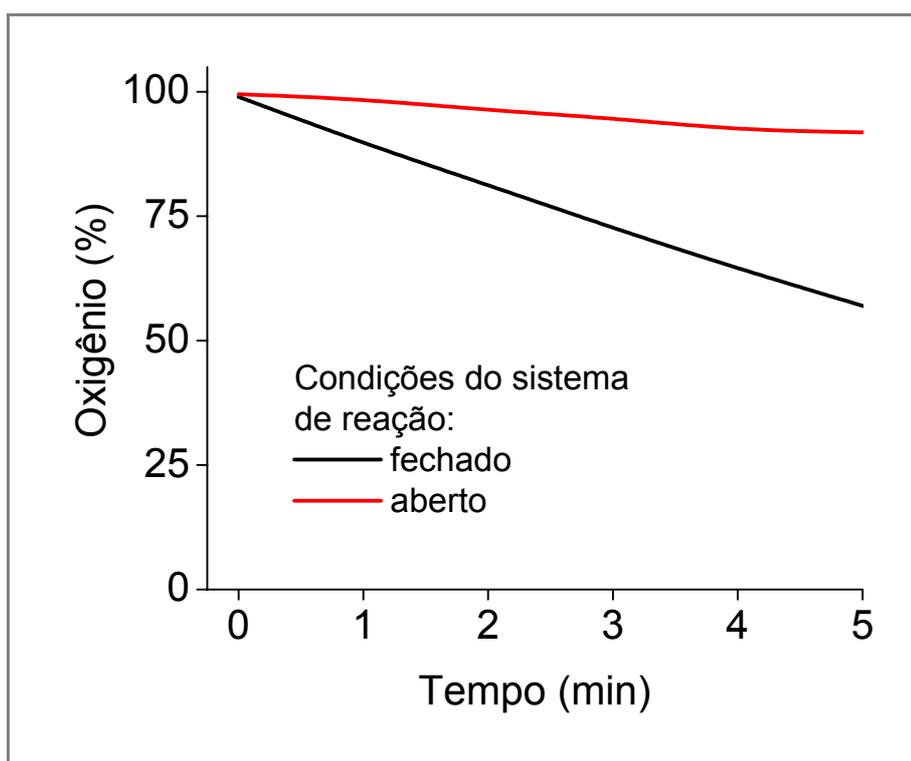


Figura 36. Efeito da difusão de ar no consumo de oxigênio da reação PD/HRP. Condições da reação: HRP 0,5 $\mu\text{mol/L}$, PD 3 mmol/L , tampão fosfato 100 mmol/L , pH 7,4, a 37°C. Gráfico representativo de ensaios realizados em triplicata.

4.6. Ciclo Catalítico da HRP nas Reações de Oxidação da Me-PD, DM, AcAc, CH, DM, IAA e 5-OH-IAA na Ausência ou Presença de H₂O₂

Para a Me-PD, também foram encontrados resultados interessantes em relação à alteração espectral da HRP; como pode ser observado na figura 37, há indicativo da formação de uma mistura de HRP-II e HRP-III, observou-se também, como já visto nos estudos de consumo de oxigênio (Figura 16), que para a Me-PD a reação é mais rápida em relação à PD. Neste caso, tem-se a indicação que a adição de SOD e catalase retarda a volta da enzima à sua forma nativa.

O efeito do pH também condiz com os resultados de consumo de oxigênio, em pH 8,5 a reação Me-PD/HRP é acelerada e em pH 6 provavelmente não ocorre, como se observa na figura 38.

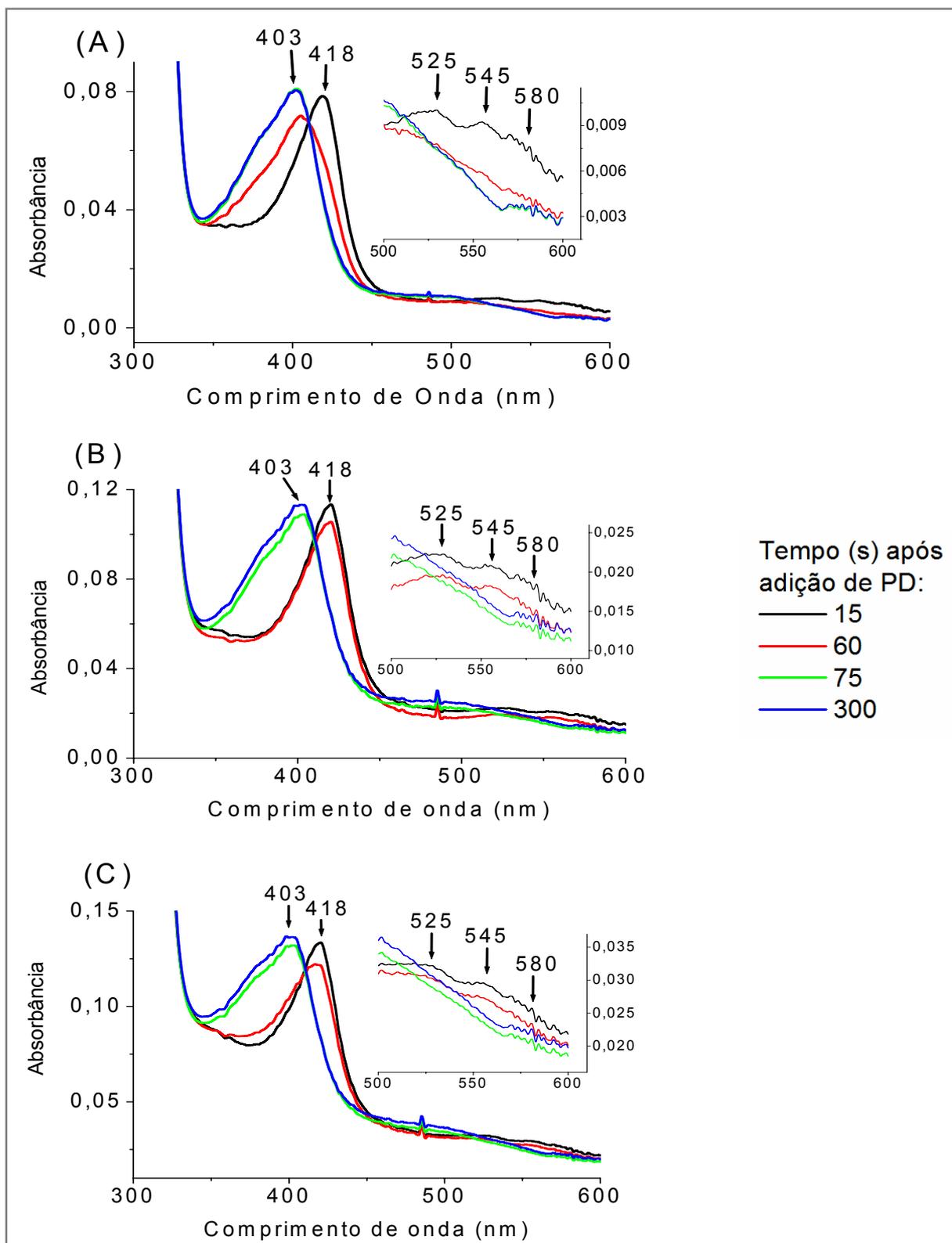


Figura 37. Alteração espectral da HRP durante oxidação da Me-PD. Condições da reação: (A) HRP 1 µmol/L, Me-PD 3 mmol/L, tampão fosfato 100 mmol/L, pH 7,4, a 37°C; (B) o mesmo meio de (A), com adição de catalase 20 µg/mL; (C) o mesmo meio de (A), com adição de superóxido dismutase 20 µg/mL. Gráfico representativo de ensaios realizados em triplicata.

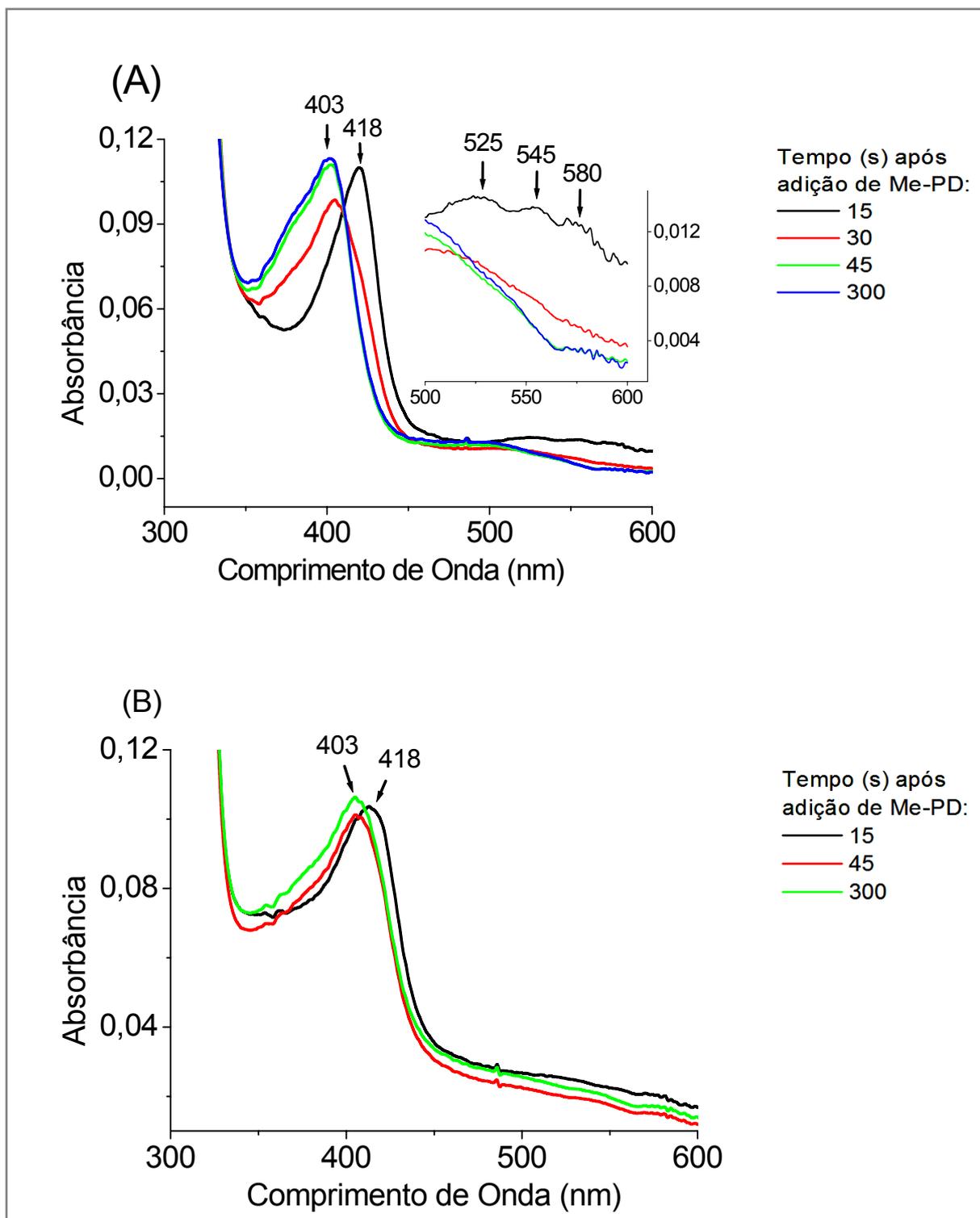


Figura 38. Alteração espectral da HRP durante oxidação da Me-PD. Condições da reação: HRP 1 $\mu\text{mol/L}$, Me-PD 3 mmol/L , tampão fosfato 100 mmol/L ; (A) pH 8,5. e (B) pH 6,0; a 37°C. Gráfico representativo de ensaios realizados em triplicata.

O mesmo observou-se para a alteração espectral da HRP em relação a reação com o IAA (Figura 39). Há formação de uma mistura de HRP-II e HRP-III, a reação é mais rápida em relação a PD e em pH 5, como já observado em consumo de oxigênio (Figura 17), a reação é favorecida.

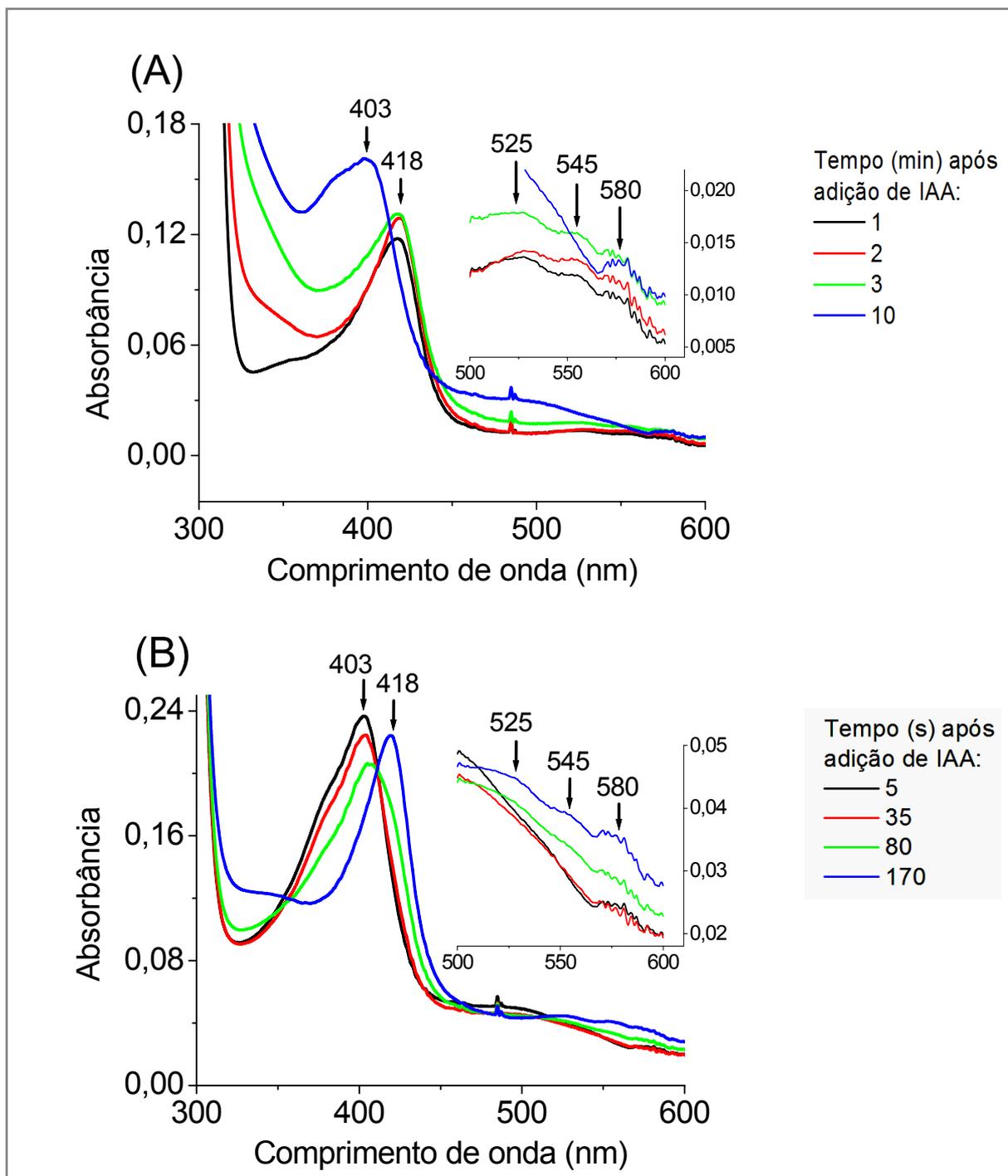


Figura 39. Alteração espectral da HRP durante oxidação do IAA. Condições da reação: HRP 1 $\mu\text{mol/L}$, IAA 3 mmol/L , tampão fosfato 100 mmol/L pH 7,4 (A); ou pH 5 (B). (Ver materiais e métodos para maiores detalhes). Gráfico representativo de ensaios realizados em triplicata.

Em relação aos outros compostos estudados, dimedona (DM) e ácido 5-OH-3-indolacético, não foi observada qualquer mudança espectral da HRP quando utilizados como substratos, nem mesmo na presença de H_2O_2 , como pode ser observado na figura 40.

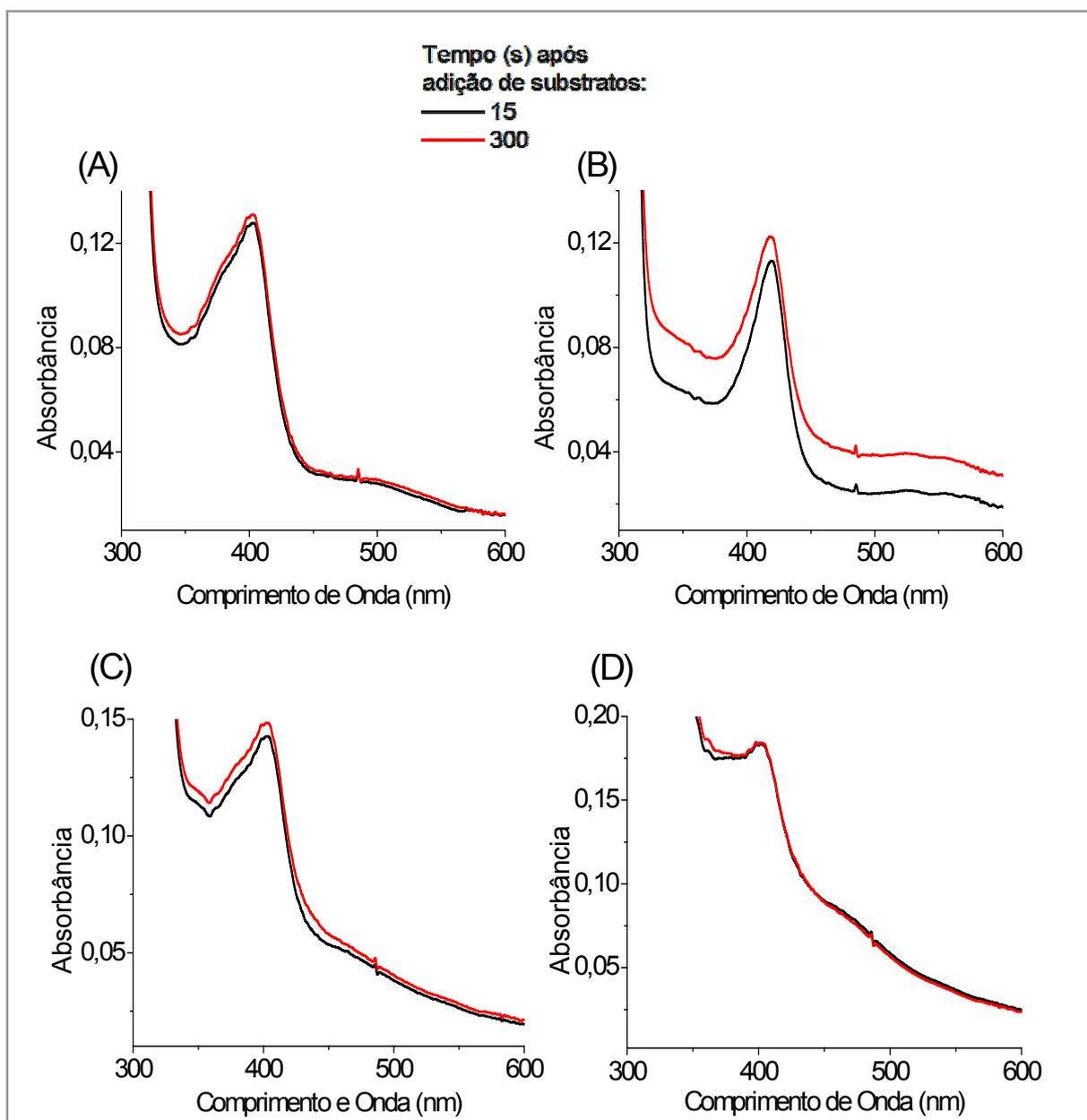


Figura 40. Alteração espectral da HRP durante oxidação da DM e 5-OH-IAA. Condições da reação: : (A) HRP 1 $\mu\text{mol/L}$, DM 3 mmol/L, tampão fosfato 100 mmol/L pH 7,4; (B) o mesmo de (A), com a adição de H_2O_2 0,1 mmol/L; (C) HRP 1 μM , 5-OH-IAA 3 mmol/L, tampão fosfato 100 mmol/L pH 7,4; (D) o mesmo de (C), com a adição de mais H_2O_2 0,1 mmol/L. Gráfico representativo de ensaios realizados em triplicata.

Apenas o acetoacetato (AcAc), na presença de peróxido de hidrogênio, alterou o espectro de absorção da HRP, havendo formação de composto II e III; na ausência de peróxido a reação não ocorreu (Figura 41).

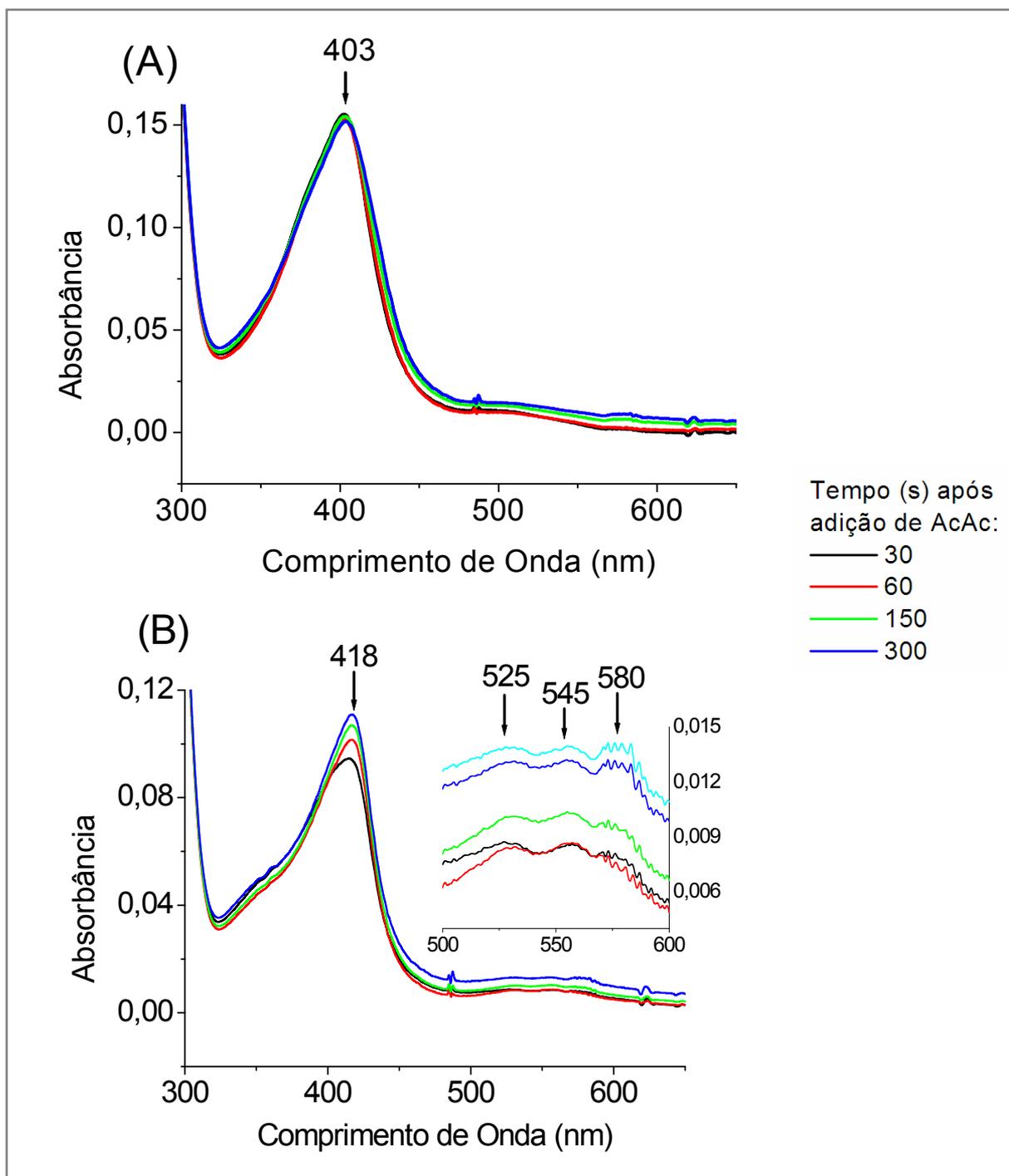


Figura 41. Variação espectral da HRP durante oxidação do AcAc. Condições da reação: (A) HRP 1 $\mu\text{mol/L}$, AcAc 3 mmol/L, tampão fosfato 100 mmol/L pH 7,4. (B) Com adição de H_2O_2 1 $\times 10^{-4}$ mol/L. Gráfico representativo de ensaios realizados em triplicata.

Reforçando o resultado anterior, observa-se na figura 42 que o AcAc não provocou consumo de oxigênio na reação, mesmo na presença de H_2O_2 ; e o mesmo aconteceu com a DM, ciclohexanodiona (CH) e 5-OH-IAA .

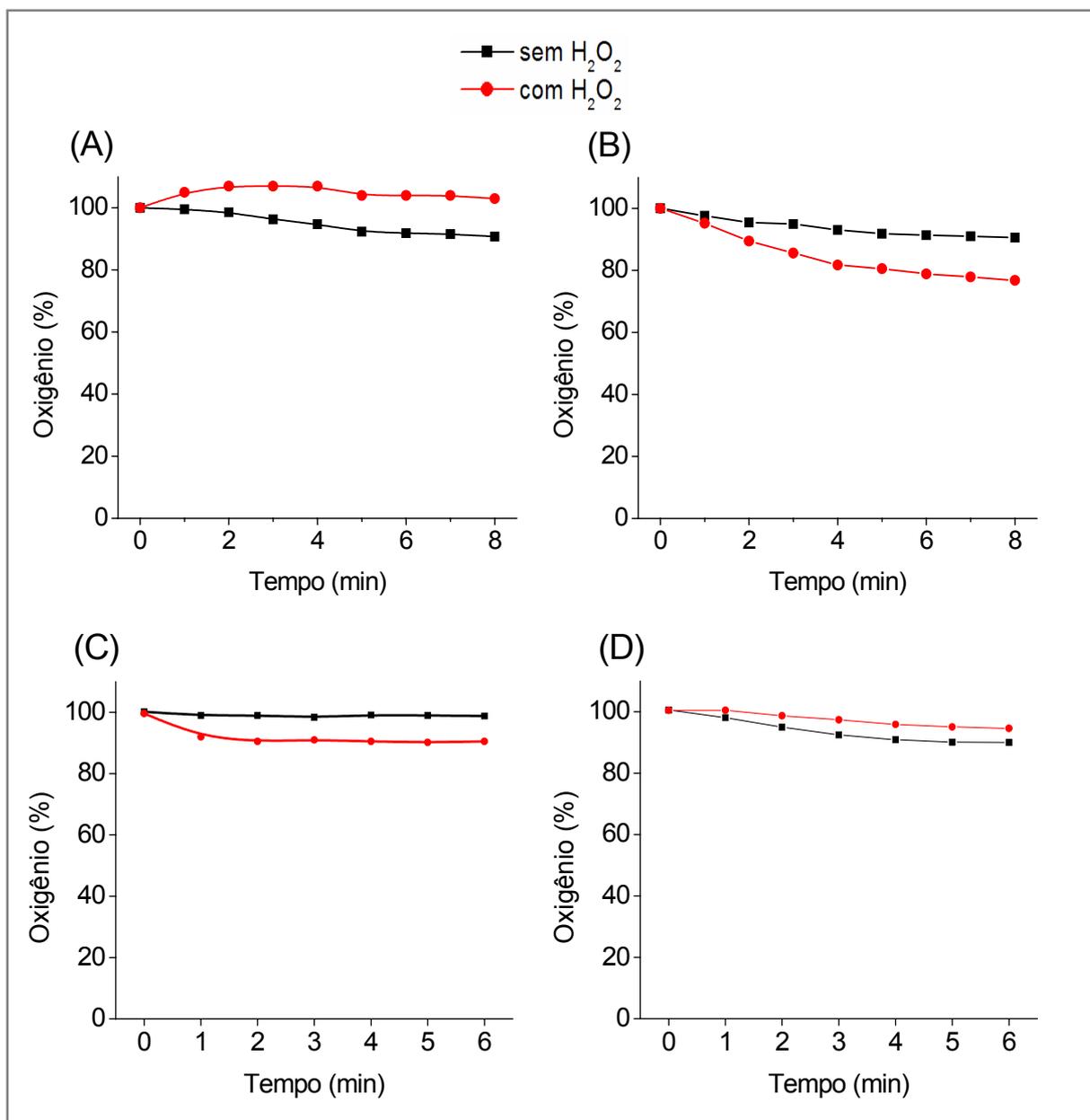


Figura 42. Ausência de consumo de oxigênio dos sistemas HRP/substrato: AcAc (A), CH (B), DM (C) e 5-OH-IAA (D). Condições da reação: CH, DM ou 5-OH-IAA 3 mmol/L, HRP 0,5 μ mol/L, tampão fosfato de potássio 0,1 mol/L pH 7,4, a 37°C, na ausência ou presença de H_2O_2 0,1 mmol/L. Gráficos representativos de ensaios realizados em em triplicata.

4.7. Produção de ERO Durante Reações de Oxidação de Compostos β -Dicarbonílicos (PD, Me-PD, AcAc, CH e DM), IAA e 5-OH-IAA Catalisadas pela HRP na Ausência de H_2O_2

Na figura 43 observa-se que a reação PD/HRP produziu ERO com grande intensidade, mas a Me-PD, apesar de apresentar uma reação de consumo de oxigênio muito mais rápida em relação a PD, na presença de HRP (Figura 16), não produziu ERO em quantidade suficiente a ponto de oxidar eficientemente o luminol e proporcionar quimiluminescência tão significativa como a PD nesse ensaio. Essa menor eficiência quando comparada à PD, também foi observada nos ensaios de citotoxicidade (Figura 34). O IAA produziu cerca de 6 vezes mais ERO quando oxidado pela HRP, em relação a PD nas mesmas condições (Figura 43)

Observou-se ainda que os compostos que não sofreram oxidação na reação catalisada pela HRP (AcAc, DM, CH e 5-OH-IAA), também não eliciaram quimiluminescência.

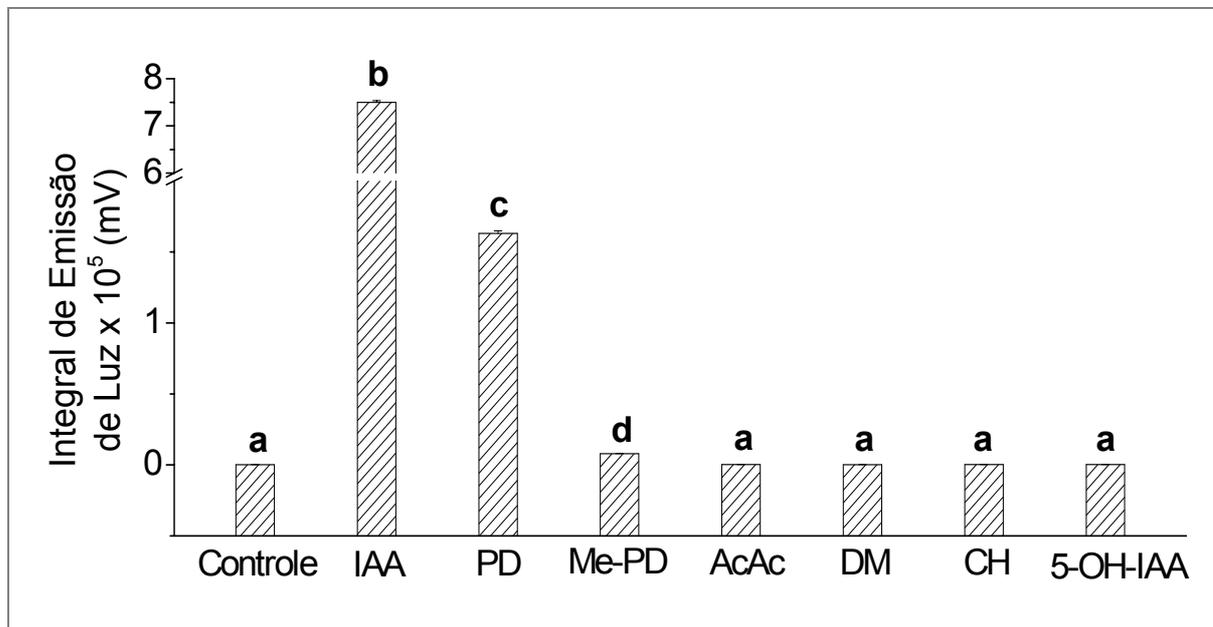


Figura 43. Produção de ERO durante oxidação de substratos carbonílicos, catalisada por HRP. Condições da reação: luminol 0,1 mmol/L, HRP 1 μ mol/L, substratos 1 mmol/L, tampão fosfato 100 mmol/L (pH 7,4). A reação foi monitorada por 10 minutos. O controle representa a reação sem a adição da HRP (não apresentou diferença estatística significativa com a adição de qualquer um dos substratos). Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n = 3$).

4.8. Avaliação da Oxidação da PD, Me-PD e IAA Catalisada pela Hemina ou Heme-proteínas na Ausência de H₂O₂

Uma vez que tal estudo tem potencial na aplicação da PD para a técnica ADEPT, testes com hemina e outras heme-proteínas endógenas (citocromo C, mioglobina e mieloperoxidase) foram realizados, com a finalidade de investigar se a oxidação observada restringia-se à HRP. Na figura 44 pode ser observado que não houve reação entre alguns dos substratos ensaiados (PD, Me-PD e IAA) e o citocromo C, em condições idênticas àsquelas da reação catalisada por HRP.

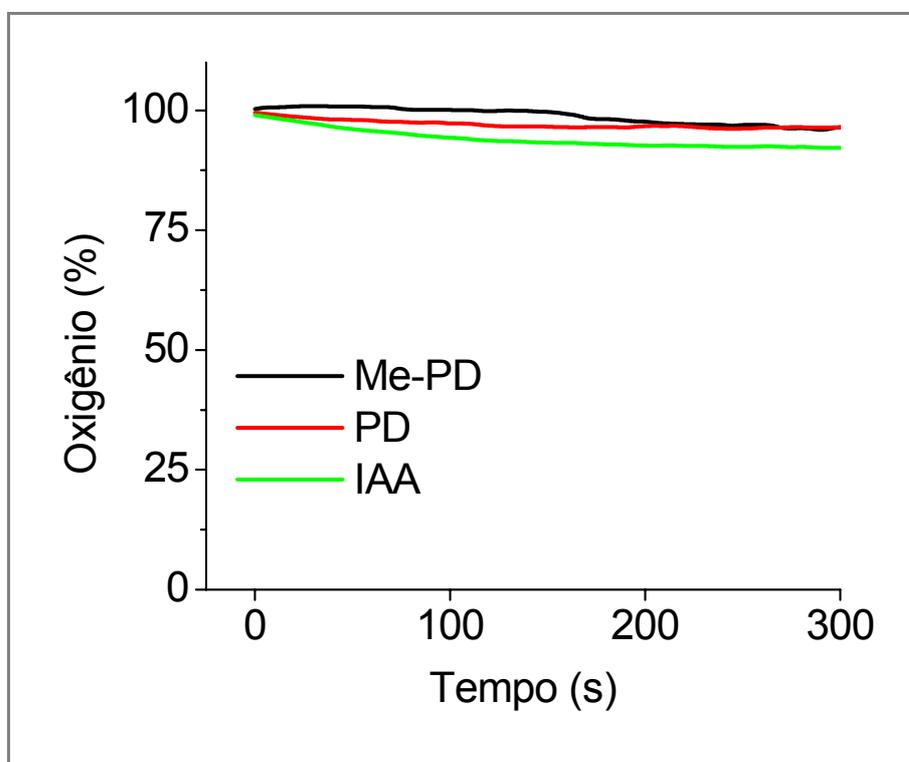


Figura 44. Ausência de consumo de oxigênio do citocromo C e a PD ou Me-PD ou IAA. Condições da reação: Citocromo C 0,5 $\mu\text{mol/L}$; PD, Me-PD ou IAA 3 mmol/L , tampão fosfato 100 mmol/L pH 7,4. Gráfico representativo de ensaios realizados em triplicata.

Para os ensaios com mieloperoxidase, devido ao alto custo da enzima, reduziu-se o volume de reação de consumo de oxigênio para 1,2 mL e realizou-se o ensaio somente com a Me-PD. De acordo com o que pode ser visto na figura 45, concluiu-se que a Me-PD, continuou sendo oxidada quando se utilizou uma concentração menor de HRP, ao passo que na mesma concentração de MPO nada ocorreu.

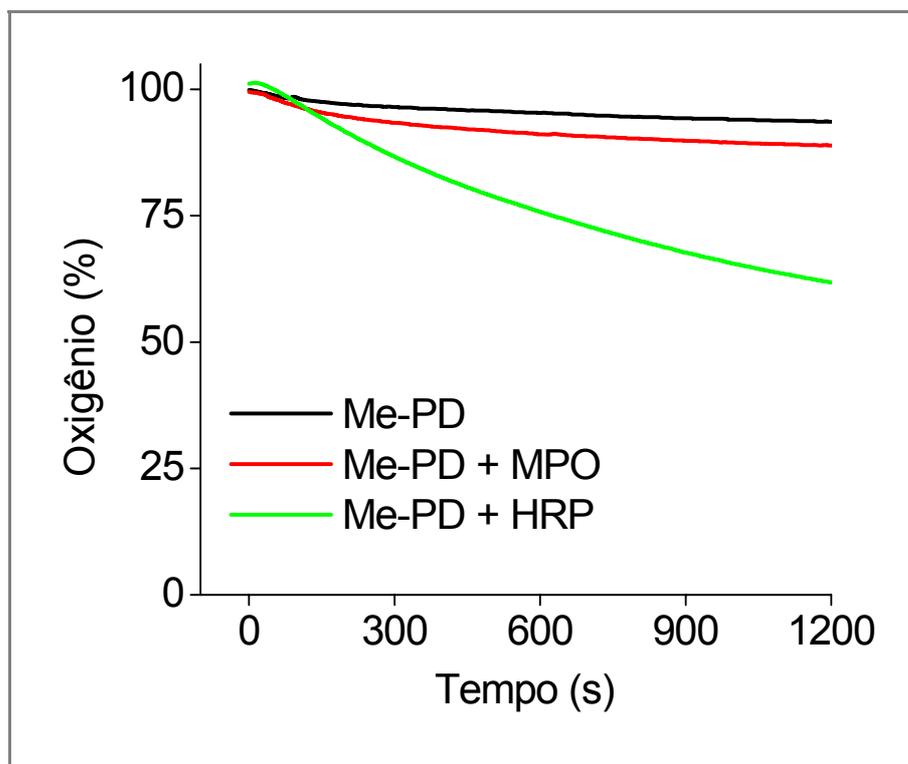


Figura 45. Reação de consumo de oxigênio provocado por oxidação de Me-PD. Condições da reação: HRP ou MPO 10 nmol/L, Me-PD 3 mmol/L, tampão fosfato 100 mmol/L pH 7,4, a 37°C. Gráfico representativo de ensaios realizados em triplicata.

O mesmo ensaio não foi realizado com a PD, visto que a reação PD/HRP, tem pouca eficiência em concentrações muito baixas de HRP (10 nmol/L), o que torna difícil a comparação com a MPO; contudo, como pode ser observado na figura 46, a reação PD/MPO não foi capaz de oxidar eficientemente o luminol, como ocorreu quando a PD foi oxidada na presença de HRP. É importante salientar que a integral de emissão de luz na oxidação da PD usando HRP foi cerca de 10 vezes superior do que quando se utilizou MPO.

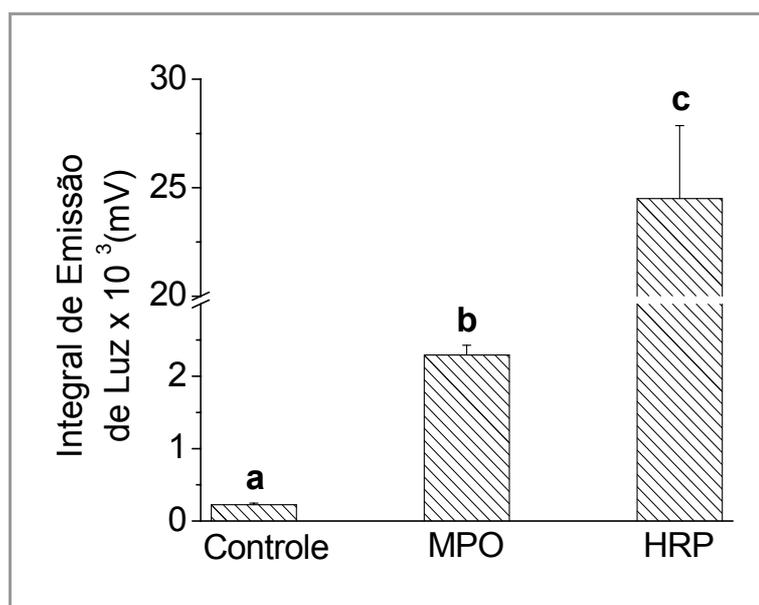


Figura 46. Produção de ERO durante oxidação da PD catalisada por HRP ou MPO. Condições da reação: luminol 0.1 mmol/L, PD 3 mmol/L, HRP ou MPO 10 nmol/L, tampão fosfato 100 mmol/L (pH 7.4), a 37°C. Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n = 3$).

A hemina e a mioglobina também não provocaram oxidação da PD ou do IAA, como pode ser visto na figura 47.

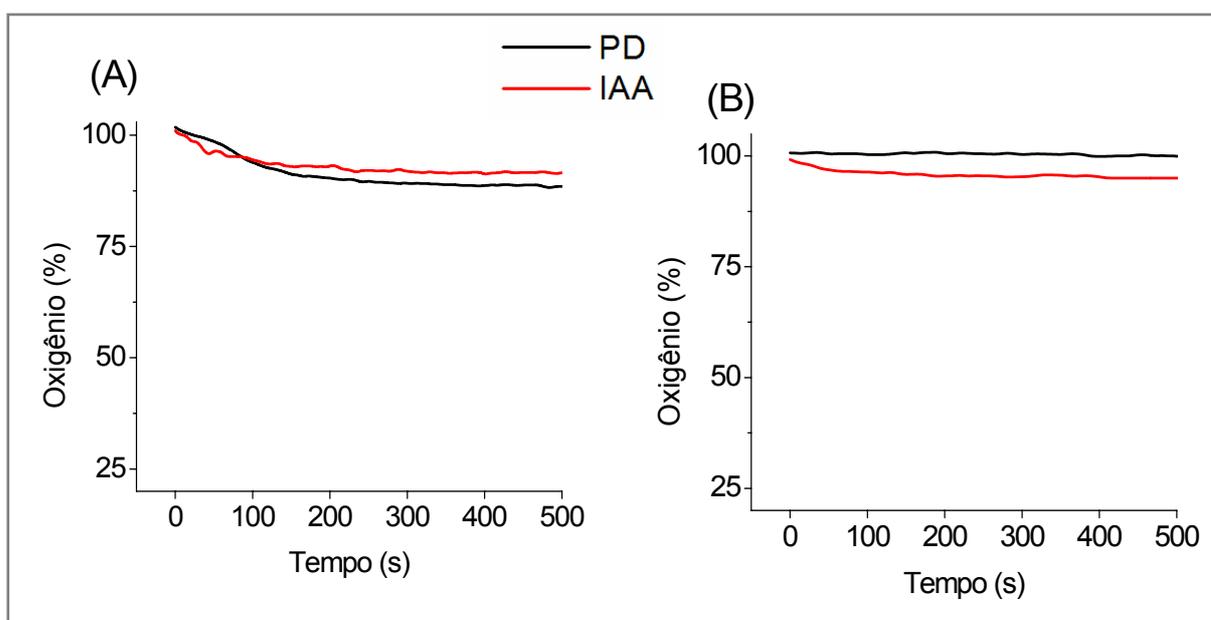


Figura 47. Ausência de consumo de oxigênio utilizando a PD e o IAA na presença de hemina (A) ou mioglobina (B). Condições da reação: hemina ou mioglobina 1 $\mu\text{mol/L}$, PD ou IAA 3 mmol/L, tampão fosfato 100 mmol/L pH 7,4, a 37°C. Gráfico representativo de ensaios realizados em triplicata.

4.9. Estudo da Especificidade da HRP na Oxidação da PD na Ausência de H_2O_2

Com a finalidade de demonstrar a importância da HRP na oxidação da PD, submeteu-se a PD à reações de consumo de oxigênio utilizando-se Fe^{+3} na mesma concentração de HRP utilizada em ensaios anteriores. Como pode ser observado na figura 48, o consumo de oxigênio ocorreu somente em concentrações muito elevadas de íons Fe^{+3} , confirmando que a oxidação de PD por HRP não depende somente da presença do ferro no grupamento heme da enzima, mas sim da molécula enzimática como um todo, pois a hemina também não catalisou a reação nas mesmas condições que a HRP o fez, nem mesmo quando a hemina foi utilizada em concentrações elevadas, semelhantes a essas do ensaio com Fe^{+3} . Outros cátions quelados pela PD, como o Zn^{+2} e Mn^{+2} (HALL; BRODBELT, 1999), quando presentes no meio reacional, não interferiram na reação de oxidação da PD catalisada pelo Fe^{+3} (Figura 48), o mesmo resultado foi observado com HRP em ensaios onde esses cátions foram adicionados.

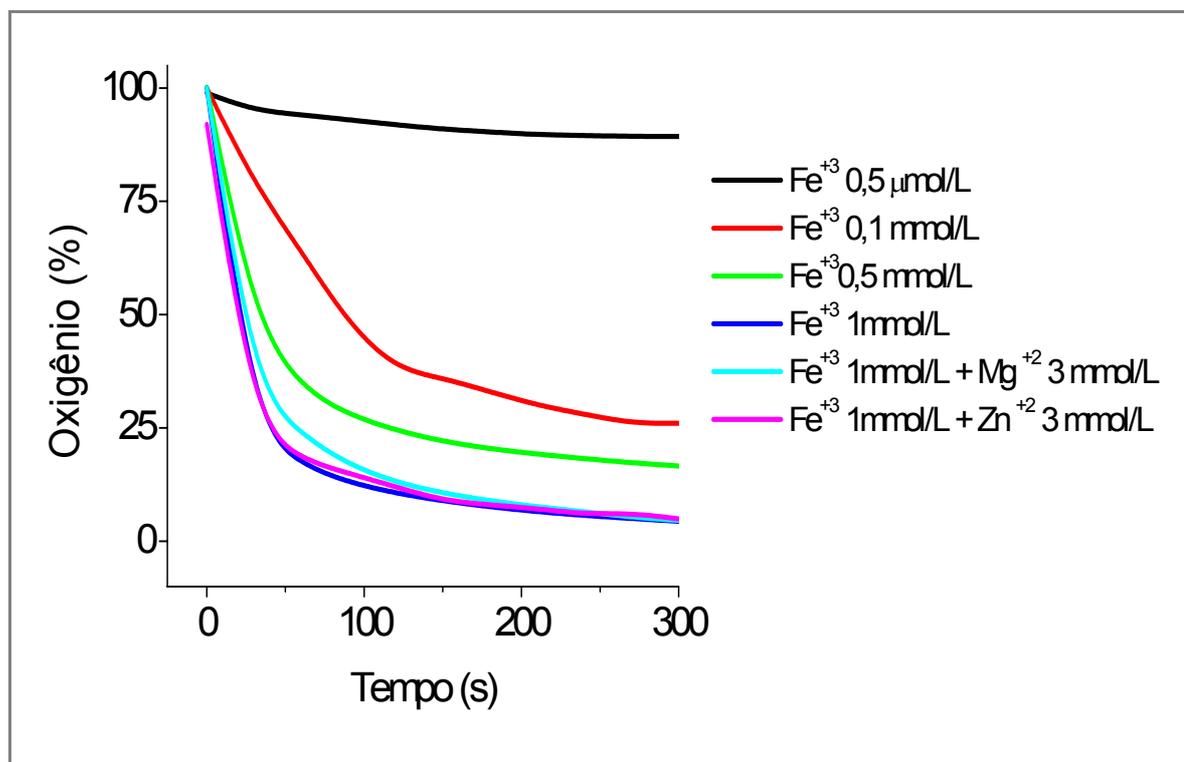


Figura 48. Consumo de oxigênio provocado na oxidação da PD. Condições da reação: PD 3 mmol/L, Fe⁺³, Mg⁺² e Zn⁺² em concentrações descritas na figura, tampão fosfato 100 mmol/L pH 7,4, a 37°C. Gráfico representativo de ensaios realizados em triplicata.

Apesar do evidente efeito catalítico desempenhado pela HRP, existia ainda uma possibilidade de que apenas o conteúdo férrico da enzima (grupo heme) fosse responsável por tal ação. A PD apresentou especificidade para a HRP, já que a hemina e outras heme-proteínas utilizadas (citocromo C, mioglobina e mieloperoxidase) não apresentaram capacidade para oxidá-la. Apesar da PD complexar-se com metais facilmente, ficou claro também que a PD não necessita somente da molécula de ferro presente na enzima, e sim da estrutura enzimática como um todo, já que em concentrações equimolares de ferro não houve reação com a PD, somente em concentrações muito elevadas deste metal.

Além dos estudos com hemina, para solidificar tal hipótese, realizou-se ensaios quimiluminescentes onde a enzima foi inativada termicamente ou com adição de um inibidor clássico de peroxidase, a 4-hidroxibenzidrazida (BZD)

(AITKEN, S.M et al, 2003) (Figura 49). A HRP inativada e o inibidor de peroxidase utilizado impediram a formação de ERO na reação, mostrando ser a HRP nativa essencial para que a reação ocorra, o que também foi observado nos estudos de consumo de O_2 , pois na ausência de HRP a reação não ocorreu.

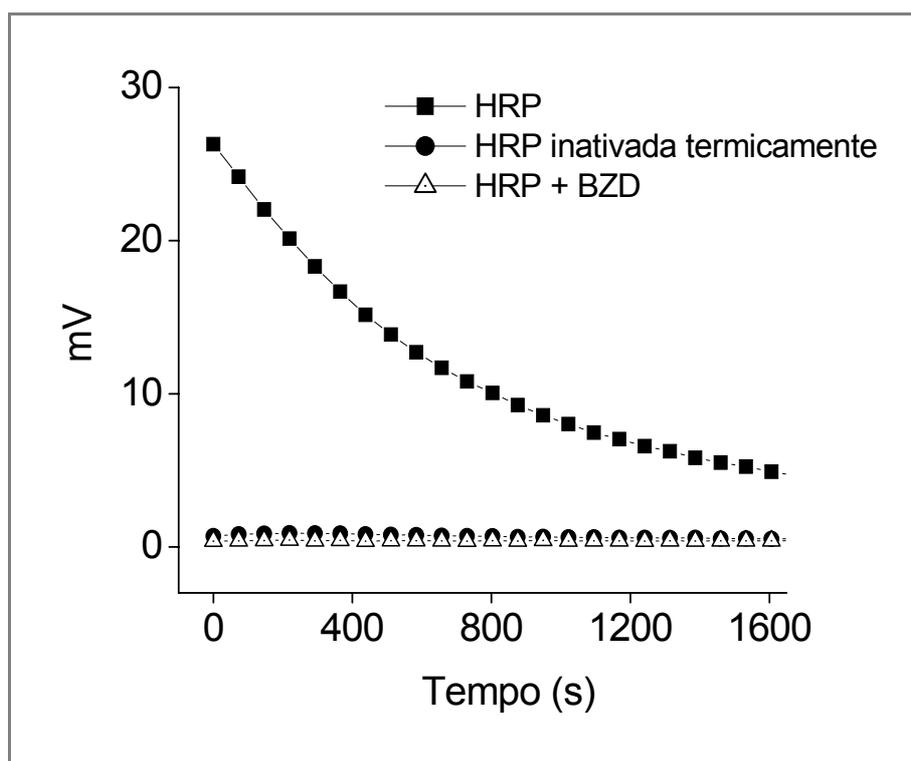


Figura 49. Produção de quimiluminescência durante oxidação da PD catalisada por HRP. Condições da reação: Luminol 0.1 mmol/L, PD 1 mmol/L, HRP 1 μ mol/L, tampão fosfato 100 mmol/L (pH 7.4). Quando presente, 4-hidroxibenzidrazida (BZD) 1 mmol/L. Inativação térmica da HRP realizada por aquecimento a 80°C durante 4 horas. Gráfico representativo de ensaios realizados em triplicata.

4. 10. Oxidação da Me-PD Catalisada pela Hemina ou Mioglobina na Ausência de H₂O₂

A Me-PD foi eficientemente oxidada, na presença da hemina e mioglobina, de maneira dose-dependente (Figura 50-A e 50-B), observou-se ainda, que a reação catalisada pela hemina foi tão rápida quanto a catalisada pela HRP em concentração equimolar. Esse resultado pode dificultar muito a utilização da Me-PD como pró-fármaco, já que a hemina e a mioglobina estão presentes no organismo.

A reatividade da Me-PD com hemina já havia sido relatada em literatura, por Augusto e Bechara (1980), que observaram a oxidação aeróbica da Me-PD na presença de HRP, hemina e mioglobina; tal reação leva a Me-PD à uma clivagem C-C.

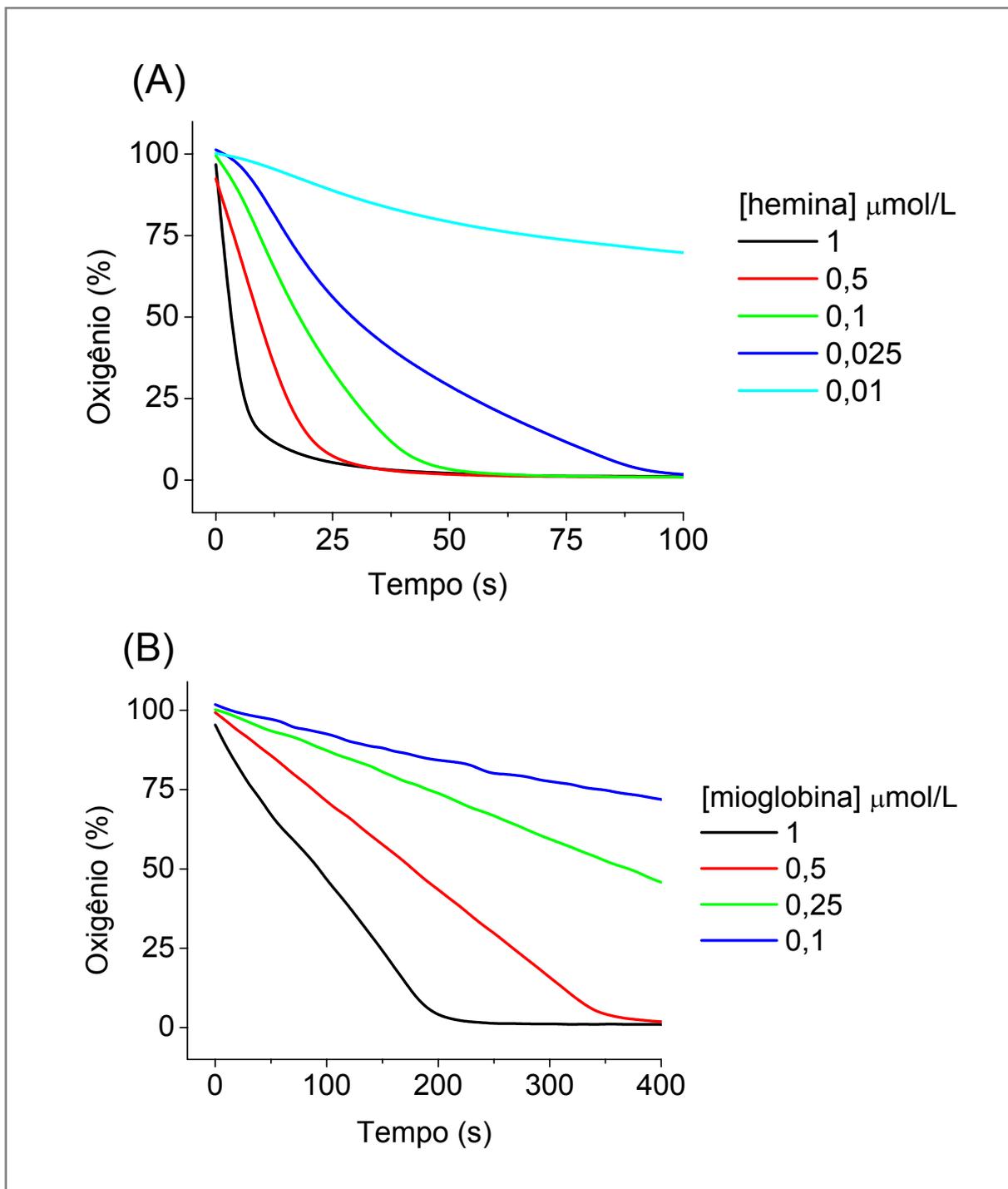


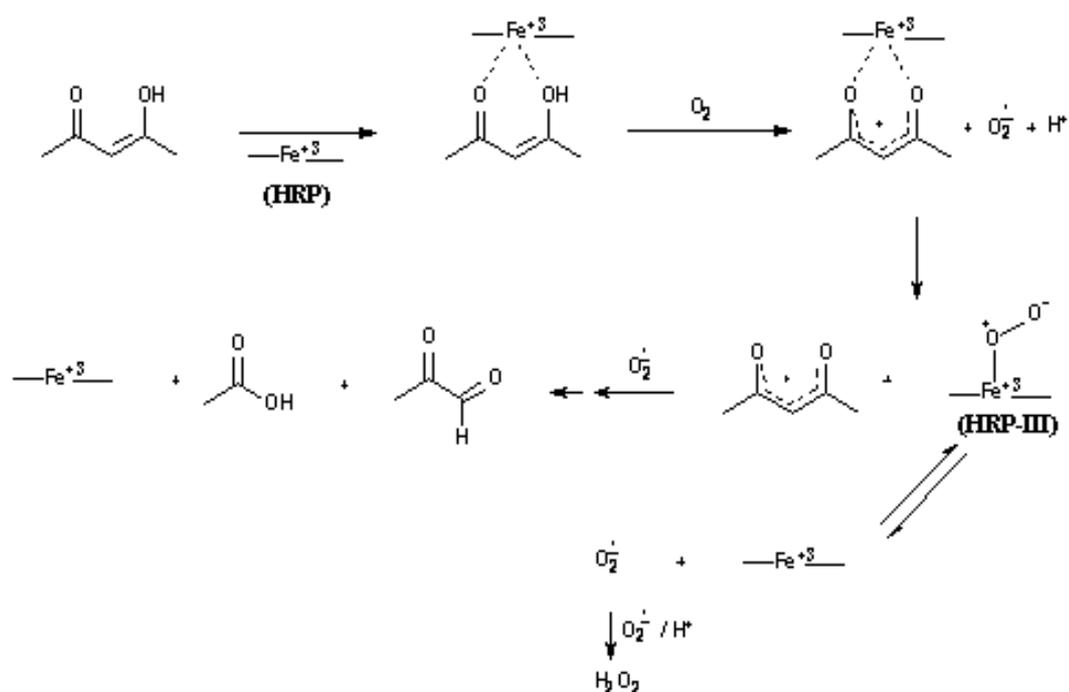
Figura 50. Consumo de oxigênio provocado na oxidação da Me-PD na presença de hemina (a) e mioglobina (B). Condições da reação: hemina ou mioglobina nas concentrações indicadas na legenda, Me-PD 3 mmol/L, tampão fosfato 100 mmol/L pH 7,4, a 37°C. Gráfico representativo de ensaios realizados em triplicata.

4. 11. Mecanismo Proposto para Oxidação da PD Catalisada pela HRP na Ausência de H₂O₂

Já é conhecido que a oxidação de compostos carbonílicos catalisada pela HRP depende da constante de equilíbrio ceto-enol de tais compostos (CILENTO; ADAM, 1995). A falta de reatividade do acetoacetato, que tem estrutura química bem semelhante à PD, mas com baixo conteúdo de enol no equilíbrio (enol/ceto = 0,007) (CAREY; SUNDBERG, 1993) comparado à PD (0,23) (CAREY; SUNDBERG, 1993), poderia justificar a sua não oxidação na ausência de H₂O₂.

É importante considerar que tal fator, embora importante, não deve atuar como efeito preponderante ou único, já que a dimedona tem uma alta constante de equilíbrio enol/ceto (20) (CAREY; SUNDBERG, 1993) e assim como observado para o acetoacetato, também não reagiu com a HRP na ausência de H₂O₂ (Figura 41).

Um possível mecanismo para a oxidação da PD, é sua capacidade de quelar metais de transição. A PD tem sido utilizada na extração de metais de soluções aquosas, como indutor de polimerização promovida por metais, oxidação de álcoois a aldeídos e cetonas; há estudos que relatam sua capacidade de complexação com Mn, Zn, Co, Cu, Al, Cr (DURAND et al, 2000; SABOLOVIC et al, 2004; SHIN et al, 2003). Assim, pode-se propor que o íon férrico (heme) da HRP complexa-se com os grupos carbonila da PD. Essa complexação pode direcionar a reação pela estabilização de um radical enolato, formado após abstração de H ou elétron pelo O₂ e conseqüente produção de O₂^{•-} (Esquema 6). Tal mecanismo é muito semelhante à oxidação de PD mediada por cerium (ALEIXO et al, 2000) e também mediada por enzimas presentes em certas bactérias, como por exemplo, *Pseudomonas* sp e *Acinetobacter johnsonii* (GROGAN, 2005)



Esquema 6 . Mecanismo proposto para oxidação da PD catalisada por HRP (RODRIGUES et al, 2006).

Esta nossa proposta é corroborada pela não reatividade da dimedona, como já salientado. Ou seja, considerando-se que a proximidade dos grupos carbonilas seja essencial para complexação com metais de transição, então a dimedona, apesar de possuir uma alta quantidade de forma enólica, não poderia ligar-se de modo efetivo com o grupo heme da HRP. De acordo com esta proposta, Teixeira et al. (1999), relataram a importância da distância entre as carbonilas presentes nas posições α e γ da molécula, como essencial para a polimerização de acrilamida utilizando HRP e diversas β -dicetonas, inclusive a PD. A figura 51 mostra a diferença nas distâncias entre as carbonilas para dimedona e PD.

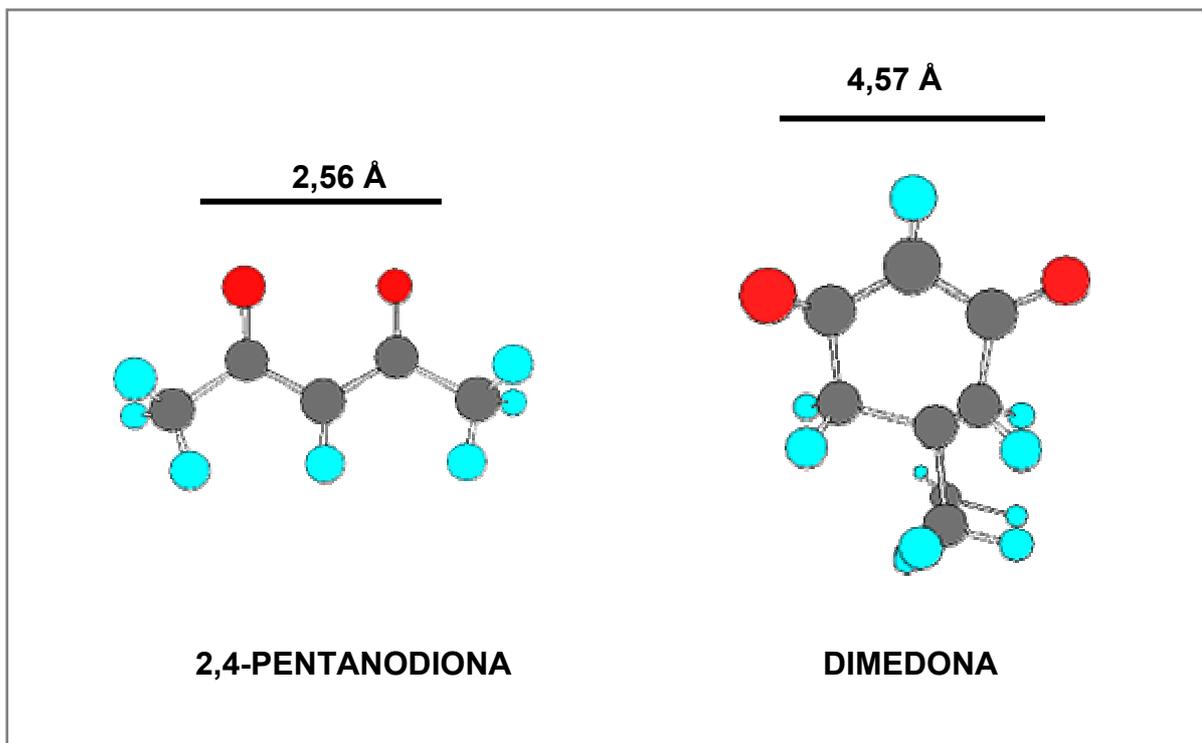


Figura 51. A estrutura molecular espacial das formas enólicas da PD e da DM. A distância das ligações entre as carbonilas da PD (2.719 Å) e da DM (4.704 Å) foram calculadas usando o software Chemdraw ultra 3D.

A similaridade que encontrou-se entre os sistemas PD/HRP/O₂ e IAA/HRP/O₂, abriu a possibilidade de estudar novos fármacos, estruturalmente semelhantes à PD, que assim como o IAA, possam ser eventualmente aplicados no estudo da tecnologia ADEPT, utilizando a HRP como enzima responsável pela catálise.

A aplicação da reação IAA/HRP na terapia contra o câncer vem, durante anos, atraindo pesquisadores que procuram entender por qual mecanismo a reação ocorre e quais os produtos que se formam e apresentam alto grau de citotoxicidade. Uma variedade de radicais livres, incluindo radicais indolil, escatolil e peroxil, bem como ERO, já foram identificados como produto da oxidação do IAA por HRP (CANDEIAS et al, 1995). Devido à capacidade do radical peroxil de causar lipoperoxidação, acreditava-se que este produto pudesse ser o principal motivo da citotoxicidade em células tumorais. Mas estudos posteriores mostraram que a peroxidação lipídica não era o principal fator de citotoxicidade induzida por HRP/IAA. Recentemente, observou-se que o H₂O₂ é o principal mediador de apoptose em células de melanoma humano (KIM et al, 2006).

Estudos com outras células tumorais, sugerem que a peroxidase endógena em células tumorais provavelmente não seja suficiente para ativar IAA e seus derivados e resultar em citotoxicidade significativa e seletiva de células tumorais. Outros trabalhos também mostram alta eficiência de citotoxicidade com peroxidase exógena, utilizando tipos celulares como de câncer de cólon humano (HT29) ou de mama (MCF7), mostrando que o efeito parece se estender a diversos tipos celulares (FOLKES et al, 1998)

Atsumi et al. (2007), em estudos recentes, relatam que a curcumina (Figura 51), extraída do rizoma da planta *Curcuma longa*, e um dos seus principais metabólitos, a tetrahydrocurcumina (Figura 52), foram utilizados no tratamento de células normais (fibroblastos gengivais humanos) e neoplásicas (carcinoma de glândulas submandibulares humanas) em duas condições diferentes de oxidação, a irradiação com luz visível ou adição de HRP/H₂O₂. A citotoxicidade da curcumina foi maior com irradiação da luz visível, enquanto a tetrahydrocurcumina apresentou maior citotoxicidade, bem como maior produção de ERO, com a adição de HRP/H₂O₂. Considerando a estrutura da tetrahydrocurcumina e da PD, nosso laboratório já iniciou estudos na catálise pela HRP da oxidação da curcumina e/ou tetrahydrocurcumina na presença e ausência de H₂O₂.

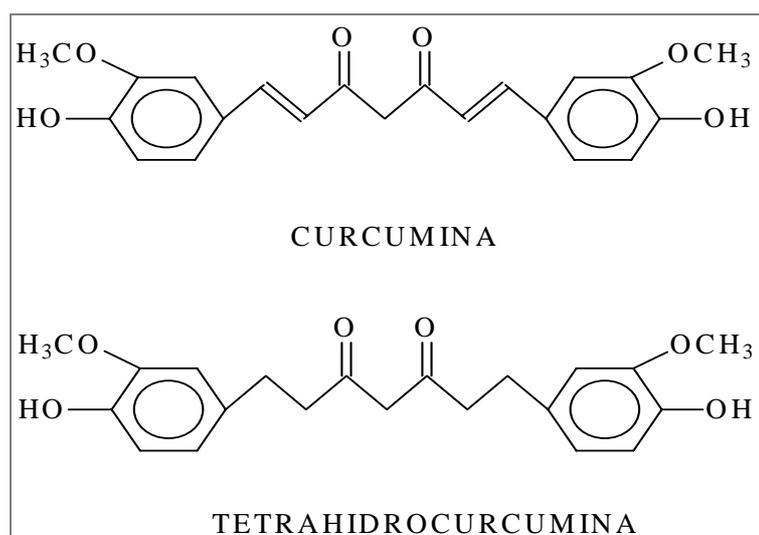


Figura 52. Estrutura química da curcumina e da tetrahydrocurcumina.

5. CONCLUSÕES

Através dos estudos apresentados neste trabalho, pode-se concluir que:

- A 2,4-pentanodiona é eficientemente oxidada pela HRP em um mecanismo de reação independente de peróxido de hidrogênio;
- Metilglioxal e espécies reativas de oxigênio são produtos dessa reação de oxidação;
- A HRP é relativamente específica para que a oxidação da PD ocorra na ausência de peróxido de hidrogênio, já que hemina e outras heme-proteínas não o fizeram;
- O par PD/HRP apresenta efeito citotóxico;
- A similaridade entre os sistemas PD/HRP/O₂ e IAA/HRP/O₂, permite o estudo de novos fármacos, estruturalmente semelhantes à PD, que assim como o IAA, possam ser eventualmente aplicados no estudo da tecnologia ADEPT, utilizando a HRP como enzima responsável pela catálise e;
- A metil-pentanodiona foi oxidada pela HRP na ausência de peróxido de hidrogênio; mas também o fez na presença de outras heme-proteínas, o que torna difícil sua aplicação na técnica ADEPT.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, S.M.; OUELLET, M.; PERCIVAL, M.D.; ENGLISH, A.N. Mechanism of horseradish peroxidase inactivation by benzhydrazide: a critical evaluation of arylhydrazidas as peroxidases inhibitors. **Biochem. J.**, v. 375, p. 613-621, 2003.
- ALBERT, A. Chemical Aspects of selective toxicity. **Nature (Lond)**, v. 182, p. 421-423, 1958.
- ALEIXO, P.C.; CHO, L.Y.; ROMERO, J.R. Oxygen as na oxidizing agent in eletrocatalytic oxidation of β -dicarbonylic compounds using Ce IV as a mediator. **J. Catal.**, v. 182, p. 248-251, 2000.
- ALLEN, R.C.; LOOSE, L.D. Phagocytic activation of luminol-dependent chemiluminescence in rabbit alveolar and peritoneal magrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 69, p.245-253, 1976.
- ALONSO LOMILLO, M.A.; KAUFFMANN, J.M.; ARCOS MARTINEZ, M.J. HRP-based biosensor for monitoring rifampicin. **Biosens. Bioelectron.**, v. 18, n. 9, p. 1165-71, 2003.
- ATSUMI, T.; TONOSAKI, K.; FUJISAWA, S. Comparative cytotoxicity and ROS generation by curcumin and tetrahydrocurcumin following visible-light irradiation or treatment with horseradish peroxidase. **Anticancer Res.**, v. 27, p. 363-372, 2007.
- AUGUSTO, O.; BECHARA. E.J.H. Hemin-catalyzed generation of triplet acetone. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 631, p. 203-209; 1980.
- AYDIN, A.; ARSOVA-SARAFINOVSKA, Z.; SAYAL. A.; EKEN, A.; ERDEM, O.; ERTEN, K.; OZGOK, Y.; DIMOVSKI, A. Oxidative stress and ontioxidant status in non-metastatic prostate câncer and benign prostatic hyperplasia. **Clin. Biochem.**, v. 39, p. 176-179, 2006.
- BAADER, J.W.; BOHNE, C.; CILENTO, G.; DUNFORD, H.B. Peroxidase catalysed formation of triplet acetone and chemiluminescence from isobutyraldehyde and molecular oxygen. **J. Biol. Chem.**, v. 260, p. 10217-10225, 1985.
- BABIOR, B.M.; COHEN, H.J. Measurement of neutrophil function: phagocytosis, degranulation, the respiratory *burst* and bactericidal killing. In: CLINE, M. J. **Methods in hematology: leucocyte function**, New York: Churchiel Livingstone, 1981. v. 13.
- BAGSHAWE, K.D.; SHARMA, S.K.; SPRINGER, C.J.; ANTONIW, P. Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): a pilot scale clinical trial. **Tumor Target.**, v. 1, p. 17- 29, 1995.
- BARRESCHEN, H.K. Methylglyoxal als intermediaries Spaltungsprodukt bei der glykolyse des blutes. **Biochem. Zeitschr.**, v. 193, p. 105-108, 1928.
- BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVÁ, Z.; FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sci.**, v. 5, p. 1865-1874, 1999.
- BERGLUND, G.I.; CARLSSON, G.H.; SMITH, A.T.; SZÖKE H.; HENRIKSEN, A.; HAJDU, J. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. **Nature**, v. 417, p. 463-468, 2002.
- BLAKEY, D.C.; DAVIES, D.H.; DOWELL, R.I.; EAST, S.J.; BURKE, P.J.; SHARMA, S.K.; SPRINGER, C.J.; MAUGER, A.B.; MILTON, R.G. Anti-tumor effects of na antibody-carboxypeptidase G2 conjugate in combination with phenol mustard prodrugs. **Br. J. Cancer**, v. 72, p. 1083-1088, 1995.
- BOWEN, W.J. The absorption spectra and extinction coefficients of myoglobin. **J. Biol. Chem.**, v. 179, p. 235, 1949.
- BRESTEL, E.P. Co-oxidation of luminol by hypochlorite and hydrogen peroxide implications for neutrophil chemiluminescence **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 126, p. 482-488, 1985.
- BRIHEIM, G.; STENDAHL, O. , DAHLGREN, C. Intra and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leucocytes. **Infect. Immun.**, v. 45, p. 1-5, 1984.

- BRUNETTI, I.L.; FARIA-OLIVEIRA, O.M.M. Sistemas quimiluminescentes com peroxidase (EC: 1.11.1.7) e suas aplicações em análises clínicas. **Rev. Ciênc. Farm.**, v. 16, p. 55-77, 1996.
- BUSTAMANTE, J.; LODGE, J.K.; MARCOCCI, L.; TRITSCHLER, H.J.; PACKER, L.; RIHN, B.H. Alpha-lipoic acid in liver metabolism and disease. **Free Rad. Biol Med.**, v. 24, p. 1023-1039, 1998.
- CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 58, p. 79-110, 1989.
- CAMPA, A. Biological roles of plant peroxidases: know and potential function. In: EVERSE, K.; GRISHAM, M.B (Eds). **Peroxidase in chemistry and biology**. New York: CRC Press, 1991. v. 2, p. 25.
- CANDEIAS, L.P.; FOLKES, L.K.; PORSSA, M.; PARRICK, J.; WARDMAN, P. Enhancement of lipid peroxidation by indole-3-acetic acid and derivatives: substituent effects. **Free Radic. Res.**, v. 23, p. 303-418, 1995.
- CAREY, F.A.; SUNDBERG, R.J. **Advanced organic chemistry, Part A: Structure and Mechanisms**. 3rd edition. New York: Plenum Press, 1993.
- CARRERAS, M.C.; PARGAMENT, G.A.; CATZ, S.D.; PODEROSSO, J.J.; BOVERIS, A. Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during respiratory burst of human neutrophils. **FEBS Lett.**, v. 341, p. 65, 1994.
- CERQUEIRA, F.M.; MEDEIROS, M.H.G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 30, p. 441-449, 2007.
- CILENTO, G.; ADAM, W. From free-radicals to electronically excited species. **Free Radical Biol. Med.**, v. 19, p. 103-114, 1995.
- CONKLIN, K.A. Chemotherapy-associated oxidative stress: Impact on chemotherapeutic effectiveness. **Integr. Cancer Ther.**, v. 3, p. 294-300, 2004.
- COON, M.J.; DING, X.; PERNEKY, S.J.; VAZ, A.D.N. Cytochrome P450: progress and predictions. **FASEB J.**, v. 6, p. 669-673, 1992.
- DAHLGREN, C.; STENDAHL, O. Role of myeloperoxidase in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leucocytes. **Infect. Immun.**, v. 39, p. 136-141, 1983.
- DE MELO, M.P.; LIMA, T. M.; PITHON-CURI, T.C.; CURI, R. The mechanism of indole acetic acid cytotoxicity. **Toxicol. Lett.**, v.148, p. 103-111, 2004.
- DENNY, W.A. Prodrug strategies in cancer therapy. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 36, p. 577-595, 2001.
- DIAZ, J.; SERRANO, E.; ACOSTA, F.; CARBONELL, L.F. References intervals for four biochemistry analytes in plasma for evaluating oxidase stress and lipid peroxidation in human plasma. **Clin. Chem.**, v.44, p. 2215-2217, 1998.
- DODEIGNE, C.; THUMUS, L.; LEJEUNE, R. Chemiluminescence as diagnostic tool: a review. **Talanta**, v. 51, p. 415-439, 2000.
- DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, v.82, p. 47-95, 2002.
- DUARTE-VÁSQUEZ, M.A.; GARCIA-ALMENDAREZ, B.; REGALADO, C.; WHITAKER, J.R. Purification and parcial characterization of three turnip (*Brassica napus* L. var. esculenta D.C.) peroxidases. **J. Agricult. Food Chem.**, v. 48, p. 1574 –1579, 2000.
- DUBOWCHIK, G.M.; WALKER, M.A. Receptor-mediated and enzyme-dependent targeting of cytotoxic anticancer drugs. **Pharmacol. Ther.**, v. 83, p. 67-123, 1999.

- DUNFORD, H.B. **Heme peroxidases**. New York: Wiley-VCH, 1999.
- DUNFORD, H.B. Horseradish peroxidase: Structure and Kinetic Properties. In: EVERSE, J.; EVERSE, K.; GRISHAM, M.B. **Peroxidases in chemistry and biology**. Boston: CRC, 1991. v. 2, p. 1-24.
- DURAND, A.; LALOT, T.; BRIGODIOT, M.; MARECHAL, E. Enzyme-mediated initiation of acrylamide polymerization: reaction mechanism. **Polymer**, v. 41, p. 8183-8192, 2000.
- EL-AGAMEY, A.; LOWE, G.M.; MCGARVEY, D.J.; MORTENSEN, A.; PHILLIP, D.M.; TRUSCOTT, T.G. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 430, p. 37-48, 2004.
- ENGLISH, D.; ANDERSEN, B.R. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leucocytes on discontinuous density gradient of Ficoll-Hypaque. **J. Immunol. Method.**, v. 5, p. 294, 1974.
- FATIBELLO-FILHO, O; CRUZ VIEIRA, I. Uso analítico de tecidos e extrato brutos vegetais como fonte enzimática. **Quim. Nova**, v. 25, p. 455-464, 2002.
- FAULKNER, K.; FRIDOVICH, I. Luminol and lucigenin as detectors for superoxide. **Free Rad. Biol. Med.**, v.15, p. 447-451, 1993.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.
- FOLKES, L.K.; CANDEIAS, L.P.; WARDMAN, P. Toward targeted oxidation therapy” of cancer: peroxidase-catalysed cytotoxicity of indole-3-acetic acids. **Int. J. Radiation Oncol. Biol. Phys.**, v. 42, p. 917-920, 1998.
- FOLKES, L.K.; WARDMAN, P. Oxidative activation of indole-3-acetic acids to cytotoxic species – a potential new role for plant auxins in cancer therapy. **Biochem. Pharmacol.**, v. 61, p. 129- 136, 2001.
- FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **J. Exp. Biol.**, v. 201, p. 1203-1209, 1998.
- GAZARIAN, I.G.; LAGRIMINI, L.M.; ASHBY, G.A.; THORNELEY, R.N.F. Mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by plant peroxidases: anaerobic stopped-flow spectrophotometric studies on horseradish and tobacco peroxidases. **Biochem. J.**, v. 313, p. 841-847, 1996.
- GAZARIAN, I.G.; LAGRIMINI, L.M.; MELLONS, F.A.; NALDRETT, M.J.; ASHBY, G.A.; THORNELEY, R.N.F. Identification of scatolyl hydroperoxide and its role in the peroxidase catalysed of indol-3-yl acetic acid. **Biochem. J.**, v. 333, p. 223 – 232, 1998.
- GIBSON, Q.H.; ANTONINI, E. Rates of reaction of native human globin with some hemes. **J. Biol. Chem.**, v. 238, p. 1384-1388, 1963.
- GOMORI, G. Preparation of buffers for use in enzyme studies. In: COLOWISCK, S. P.; KAPHAN, N. O. (Eds). **Methods Enzymol.** New York: Academic Press, 1955, v. 1, Cap. 16, p. 138 – 146.
- GRECO, O.; ROSSITER, S.; KANTHOU, C.; FOLKES, L.K.; WARDMAN, P.; TOZER, G.M.; DACHS, G.U., Horseradish peroxidase-mediated gene therapy: choice of prodrugs in oxic and anoxic tumor conditions. **Mol. Cancer Therap.**, v.1, p. 151- 160, 2001.
- GRIEDLING, K.K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase: Role in cardiovascular biology and disease. **Circ. Res.**, v. 86, p. 894-501, 2000.
- GROGAN, G. β -Diketone hydrolases. **J. Mol. Catal. B. Enzym.**, v. 19, p. 73-82, 2002.

- GROGAN, G. Emergent mechanistic diversity of enzyme-catalysed β -diketone cleavage. **Biochem. J.**, v. 388, p. 721-730, 2005.
- GUENGERICH, F.P. Cytochromes P450 of human liver. Classification and activity profiles of the major enzymes. In: Advances in drug metabolism in man. PACIFI, G.M.; FRACCHIA, G.N. (Eds). **Europe Commission**. Office for the Official Publications of the European Communities, Luxembourg 1995; 179-231.
- HALL, B.J.; BRODBELT, J.S. Study of diketone/metal ion complexes by electrospray ionization mass spectrometry: influence of keto-enol tautomerism and chelation. **J. Am. Soc. Mass. Spectrom.**, v. 10, p. 402-413, 1999.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.C. **Free radical in biology and medicine**. 3rd ed. Oxford, New York, 2000.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol.**, New York, v. 186 (part B), p. 1-85, 1990.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 18, p. 125-126, 1995.
- HAMED, R.R.; MAHAREM, M.A.; ATAYA, F. Purification of peroxidase isoenzymes from turnip roots. **Phytochemistry**, v. 48, p. 1291-1294, 1998.
- HAMPTON, M.B.; KETTLE, A.J.; WINTERBOURN, C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v. 92, p. 3007-3017, 1998.
- HANCOCK, J.T.; DESIKAN, R.; NEILL, S.J. Role of reactive species in cell signaling pathways. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 29, p. 345-350, 2001.
- HARRISON, J.E.; SAEED, F.A. Radical acetoacetate oxidation by myeloperoxidase, lactoperoxidase, prostaglandin synthetase, and prostacyclin synthetase: implications for atherosclerosis. **Biochem. Med.**, v. 29, p. 149-163, 1983.
- HYSLOP, P.A.; HINSHAW, D.B.; SCRANFSTATTER, I.U.; COCHRANE, C.G.; KUNZ, S.; VOSBECK, K. Hydrogen peroxide as a potent bacteriostatic antibiotic: implications for host defense. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 19, p. 31-37, 1995.
- JONES, D.P.; CARLSON, J.L.; MODY, V.C.; CAI, J.Y.; LYNN, M.J.; STERNBERG, P. Redox state of glutathione in human plasma. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 28, p. 625-635, 2000.
- KALAPOS, M.P. Methylglyoxal in living organisms. Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. **Toxicol. Lett.**, v. 110, p. 145-175, 1999.
- KARAS, M.; AMIR, H.; FISHMAN, D.; DANILENKO, M.; SEGAL, S.; NAHUM, A.; KOIFMANN, A.; GIAT, Y.; LEVY, J.; SHARONI, Y. Lycopene interferes with cell cycle progression and insulin-like growth factor I signaling in mammary cancer cells. **Nutr. Cancer Int. J.**, v. 36, p. 101-111, 2000.
- KAWAGOSHI, Y.; FUJITA, M. Purification and properties of the poly(vinyl alcohol) degrading enzyme 2,4-pentanedione hydrolase obtained from *Pseudomonas vesicularis* var. *povalolyticus*. **World J. Microbial. Biotechnol.**, v. 14, p. 95-100, 1998.
- KAWANO, T.; KAWANO, N.; HOSOYA, H.; LAPEYRIE, F. Fungal auxin antagonist hypaphorine competitively inhibits indole-3-acetic acid-dependent superoxide generation by horseradish peroxidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 288, p. 546-551, 2001.
- KIM, D.S.; JEON, S.E.; JEONG, Y.M.; KIM, S.Y.; KWON, S.B.; PARK, K.C. Hydrogen peroxide is a mediator of indole-3-acetic acid/ horseradish peroxidase – induced apoptosis. **FEBS Lett.**, v. 580, p. 1439-1446, 2006.

KIRKOR, E.S.; SCHEELINE, A. Nicotinamide adenine dinucleotide species in the horseradish peroxidase-oxidase oscillator. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 5014-5022, 2000.

KOJO, S. Vitamin C: basic metabolism and its function as in index of oxidative stress. **Curr. Med. Chem.**, v. 11, p. 1041-1064, 2004.

KRYLOV, S.N. Computer simulation of damped oscillations during peroxidase-catalysed oxidation of indole-3-acetic acid. **Biophys. Chem.**, v. 72, p. 285 – 295, 1998.

LAMSON, D.W.; BRIGNAL, M.S. Antioxidants in cancer therapy; their actions and interactions with oncologic therapies. **Altern. Med. Rev.**, v. 4, p. 304-329, 1999.

LEBEL, C.P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDYS, C. Evaluation of the probe 2', 7'- dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 5, p. 227-231, 1992.

LEITE, S. **Estudo da toxicidade induzida pelo antiinflamatório sulindaco e seus metabólitos sulfona e sulfeto**. 2003. 116 f. Tese (Doutorado) – Toxicologia. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.

LYLE, A.N.; GRIENGLING, K.K. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. **Physiol.**, v. 21, p. 269-280, 2006.

MANTOVANI, G.; MACCIO, A.; MADEDDU, C.; MURA, L.; GRAMIGNANO, G.; LUSSO, M.R.; MASSA, E.; MOCCI, M.; SERPE, R. Antioxidant agents are effective in inducing lymphocyte progression through cell cycle in advanced cancer patients: assessment of the most important laboratory indexes of cachexia and oxidative stress. **J. Mol. Med.**, v. 81, p. 64-673, 2003.

MARTIN, J.; STRIBBLING, S.M.; POON, G.K.; BEGENT, R.H.J.; NAPIER, M.; SHARMA, S.K.; SPRINGER, C.J. Antibody-directed enzyme prodrug therapy: pharmacokinetics and plasma levels of prodrug and drug in a phase I clinical trial. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 40, p. 189- 201, 1997.

MASON, D.W.; WILLIAMS, A.F. The kinetics of antibody binding to membrane antigens in solution and at the cell surface. **Biochem. J.**, v. 187, p. 1- 20, 1980.

MATES, J.M.; PEREZ-GOMES, C.; DE CASTRO, I.N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin. Biochem.**, v. 32, p. 595-603, 1999.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, v. 244, p. 60409-60455, 1969.

MERENY, G.; LIND, J.; ERIKSEN, T. E. Luminol chemiluminescence: chemistry, excitation, emitter. **J. Biolumin. Chemilumin.**, v. 5, p. 53-56, 1990.

MIYASAWA, T.; FUJIMOTO, K.; SUZUKI, T.; YASUDA, K. Determination of phospholipid hydroperoxides using luminol chemiluminescence-high-performance liquid chromatography. **Methods Enzymol.** v. 233, p. 324-329, 1994.

MOHACEK-GROSEV, V.; FURIC, K.; IVANKOVIC, H. Luminescence and Raman spectra of acetylacetone at low temperatures. **J. Phys. Chem.**, v. 111, p. 5820-5827, 2007.

MONCADA, S. Nitric Oxide. **J. Hypertens.**, v. 12, p. 35-39, 1994.

MURATA-KAMIYA, N.; KAMIYA, H., KAJI, H.; KASAI, H. Mutations induced by glyoxal and methylglyoxal in mammalian cells. **Nucleic Acids Symp. Ser.**, v. 44, p. 3-4, 2000.

NEMET, I.; VARGA-DEFTERDAROVIC, L.; TURK, Z. Preparation and quantification of methylglyoxal in human plasma using reverse-phase high-performance liquid chromatography, **Clin. Biochem.**, v.37, p. 875-881, 2004.

- NENNY, W.A.; WILSON, W.R. The design of selectively-activated anti-cancer prodrugs for use in antibody-directed and gene-directed enzyme-prodrug therapies. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 50, p. 387-394, 1998.
- NICULESCU-DUVAZ, I.; SPOONER, R.; MARAIS, R.; SPRINGER, C.J. Gene-directed enzyme-prodrug therapy. **Bioconjug. Chem.**, v. 9, p. 4-22, 1998.
- NIEMAN, T.A. Analytical chemiluminescence in flowing streams: FIA and HPLC. In: BAEYENS, W.R.G.; KEUKELEIRE, D.; KORKIDS, K (Eds). **Luminescence techniques in chemical and biochemical analysis**. New York: Marcel Dekker, 1991. v.12. p. 523-565.
- NISHIZUKA, Y.; ICHIYAMA, A.; NAKAMURA, S.; HAYAISHI, O. A new metabolic pathway of catechol. **J. Biol. Chem.**, v. 237, p. 268-270, 1961.
- OHLSSON, P.J.; PAUL, K.G. Molar absorvity of horseradish-peroxidase. **Acta Chem. Scand.**, v. 30, p. 373-375, 1976.
- OHMORI, S.; MORI, M.; KAWASE, M.; TSUBOI, S. Determination of methylglyoxal as 2-methylquinoxaline by high-performance liquid chromatography and its application to biological samples. **J Chromatogr** 414: 149-155, 1987.
- OKADO, A.; KAWASAKI, Y.; HASUIKE, Y.; TAKAHASHI, M.; TESHIMA, T.; FUJII, J.; TANIGUCHI, N. Induction of apoptotic cell death by methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in macrophage-derived cell lines. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 225, p. 219-224, 1996.
- OKADO-MATSUMOTO, A.; FRIDOVICH, I. The role of α,β -dicarbonyl compounds in the toxicity of short chain sugars. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 34853-34857, 2000.
- OZBEN, T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. **J. Pharm. Sci.**, v. 96, p. 2181-2196, 2007.
- PAUL, K.G. Peroxidases, In: BOYER, P.D. (Ed.). **The Enzymes**. New York Academic Press, 1963. v. 8, p. 227-237.
- PERVAIZ, S.; CLEMENT, M.V. Superoxide anion: oncogenic reactive oxygen species? **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 39, p. 1297-1304, 2007.
- PIRES DE MELO, M.; CURI, T.C.P.; MIYASAKA, C.K.; PALANCH, A.C.; CURI, R. Effect of Indole Acetic Acid on Oxygen Metabolism in Cultured Rat Neutrophil. **Gen. Pharmac.**, v. 31, p. 573-578, 1998.
- PIRES de MELO, M.; ESCOBAR, J.A.; METODIEWA, D.; DUNFORD, B.; CILENTO, G. Horseradish peroxidase-catalysed aerobic oxidation of indole-3-acetic acid. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 296, p. 34-39, 1992.
- PIRES DE MELO, M.; LIMA, T.M.; CURI, T.C.P.; CURI, R. The mechanism of indole acetic acid cytotoxicity. **Toxicol. Lett.**, v. 148, p. 103-111, 2004.
- POKORNY, D.; BRECKER, L.; POGOREVC, M.; STEINER, W.; GRIENGL, H.; KAPPE, T.; RIBBONS, D.W. Proton-nuclear magnetic resonance analyses of the substrate specificity of a β -ketolase from *Pseudomonas putida*. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 5051-5059, 1999.
- POKORNY, D.; STEINER, W.; RIBBONS, D.W. β -Ketolases – forgotten hydrolytic enzymes? **Trends Biotechnol.**, v. 15, p. 291-296, 1997.
- PRYOR, W.A.; Vitamin E and hearth disease: basic science to clinical intervention trials. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 28, p. 141-164, 2000.

- QUILES, J.L.; HUERTAS, J.R.; BATTINO, M.; MATAIX, J.; RAMIREZ-TORTOSA, M.C. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. **Toxicology**, v. 180, p. 79-95, 2002.
- QUINN, M. T.; AMMONS, M. C.B.; DeLEO, F.R. The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction. **Clin. Sci.**, v. 3, p. 1-20, 2006.
- RAINOV, N.G.; DOBBERSTEIN, K.U.; SENA-ESTEVEZ, M.; HERRLINGER, U.; KRAMM, C.M.; PHILPOT, R.M.; HILTON, J.; CHIOCCA, E.A.; BREAKFIELD, X.O. New prodrug activation gene therapy for cancer using cytochrome p450 4B1 and 2-aminoanthracene/4-1pomeanol. **Hum. Gene Ther.**, v. 9, p. 1261- 1273, 1998.
- RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, J.H.; PELÚZO, M.C.G.; COSTA, N.M.B.; MATTA, S.L.P.; QUEIROZ, M.E.L.R. The formation and the effects of the reactive oxygen species in biological media. **Biosci. J.**, v. 21, p. 133-148, 2005.
- RIGG, A.; SIKORA, K. Genetic Prodrug Activation Therapy. **Mol. Med. Today**, v. 3, p. 359-366, 1997.
- RODRIGUES, A.P.; FONSECA, L.M.; OLIVEIRA, O.M.M.F.; BRUNETTI, I.L.; XIMENES, V.F. Oxidation of acetylacetone catalysed by horseradish peroxidase in the absence of hydrogen peroxide. **Biochim.Biophys. Acta**, v. 1760, p. 1755-1761, 2006.
- ROOSEBOOM, M.; COMMANDEUR, J.N.M.; VERMEULEUR, N.P.E. Enzyme-Catalysed Activation of Anticancer Prodrugs. **Pharmacol. Rev.**, v. 56, p. 53-102, 2004.
- ROOSEBOOM, M.; VERMEULEN, N.P.E.; VAN HEMERT, N.; COMMANDEUR, J.N.M. Bioactivation of chemopreventive selenocysteine Se-conjugates and related aminoacids by amino acid oxidases. Novel route of metabolism of selenoamino acids. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 4, p. 996- 1005, 2001.
- ROSSITER, S.; FOLKES, L.K.; WARDMAN, P. Halogenated indole-3-acetic acids as oxidatively activated prodrugs with potential for targeted cancer therapy. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 12, p. 2523 – 2526, 2002.
- RYAN, O.; Smyth, M.R.; O'FÁGÁIN, C. Horseradish peroxidase: the analysts'friend. **Essays Biochem.**, v. 28, p. 129-146, 1994.
- RYTER, S.W.; TYRREL, R.M. Singlet molecular oxygen: a possible effector of eukaryotic gene expression. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 24, p. 1520-1534, 1998.
- SABOLOVIC, J.; MRAK, Z.; KOSTRUN, S.; JANEKOVIC, A. Is the enthalpy of fusion of tri(acetylacetonato)metal(III) complexes affected by their potential energy in the crystal state? **Inorg. Chem.**, v. 43, p. 8479-8489, 2004.
- SAKAI, K.; HAMADA, N.; WATANABE, Y. Degradation mechanism of poly(vinyl alcohol) by successive reactions of secondary alcohol oxidase and β -diketone hydrolase from *Pseudomonas sp.* **Agric. Biol. Chem.**, v. 50, p. 989-996, 1986.
- SCHROETER, H.; BOYD, C.; SPENCER, J.P.E.; WILLIAMS, R.J.; CADENAS, E.; RICE-EVANS, C. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and nitric oxide. **Neurobiol. Aging**, v. 23, p. 861-880, 2002.
- SHIN, W.; NAKATANI, H.; UOZOMI, T.; LIU, B.P.; SANO, T.; NITTA, K.; TORANO, M.M. stepwise polymerization of propylene and ethylene with $\text{Cr}(\text{acetylacetonate})_3/\text{MgCl}_2$ -ethylbenzoate/diethylaluminium chloride catalyst system. **Polymer Int.**, v.52, p. 29-34, 2003.
- SMULEVICH, G.; PAOLI, M.; DE SANCTIS, G.; MANTINI, A.R.; ASCOLI, F.; COLETTA, M. Spectroscopic evidence for a conformation transition in horseradish peroxidase at very low pH. **Biochemistry**, v. 36, p. 640-649, 1997.
- SOARES, C.H.L.; BECHARA, E.J.H. Enzymatic generation of triplet biacetyl. **Photochem. Photobiol.** v. 36, p. 117 – 119, 1982.

- STEINBERG, M.J.; KLAN, A.U.; KARNOVSKY, M.J. Intracellular singlete oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 13425-13432, 1992.
- STITT, A.W.; JENKINS, A.J.; COOPER, M.E. Advanced glycation end products and diabetic complications. **Expert. Opin. Investig. Drugs**, v. 11, p. 1205-1223, 2002.
- STRAGANZ, G.D.; BRECKER, L.; WEBER, H.J.; STEINER, W.; RIBBONS, D.W. A novel β -diketone-cleaving enzyme from *Acinetobacter johnsonii*: acetylacetone 2,3-oxygenase. **Biochem. Biophys. Res. Commum.**, v. 297, p. 232-236, 2002.
- STRAGANZ, G.D.; GLIEDER, A.; BRECKER, L.; RIBBONS, D.W.; STEINER, W. Acetylacetone-cleaving enzyme Dke1: a novel C-C-bond-cleaving enzyme from *Acinetobacter johnsonii*. **Biochem. J.**, v. 369, p. 573-581, 2003.
- STRAGANZ, G.D.; NIDETZKY, B. Reaction coordinate analysis for β -diketone cleavage by the non-heme Fe^{+2} -dependent dioxygenase Dke1. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 127, p. 12306-12314, 2005.
- STRAGANZ, G.D.; NIDETZKY, B. Variations of the 2-His-1-carboxylate Theme in mononuclear non-heme Fell oxygenases. **ChemBioChem**, v. 7, p. 153-1548, 2006.
- STRIBBLING, S.M.; MARTIN, J.; PEDLEY, R.B.; BODEN, J.A.; SHARMA, S.K.; SPRINGER, C.J. Biodistribution of an antibody enzyme conjugate for antibody-directed enzyme prodrug therapy in nude mice bearing a human colon adenocarcinoma xenograft. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 40, p. 277- 284, 1997.
- SYRIGOS, K.N.; EPENETOS, A.A. Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): a review of the experimental and clinical considerations. **Anticancer Res.**, v. 40, p. 277- 284, 1999.
- SYRIGOS, K.N.; ROWLINSON-BUSZA, G.; EPENETOS, A.A. *In vitro* cytotoxicity following specific activation of amygdalin by α -glucosidase conjugated to a bladder cancer-associated monoclonal antibody. **Int. J. Cancer.**, v. 78, p. 712- 719, 1998.
- TAFAZOLI, S.; O'BRIEN, P.J. Prooxidant activity and cytotoxic effects of indole-3-acetic acid derivative radicals. **Chem.. Res. Toxicol.**, v. 17, p. 1350 – 1355, 2004.
- TEIXEIRA, D.; LALOT, T.; BRIGODIOT, M.; MARÈCHAL, E. β -Diketones askey compounds in free-radical polymerization by enzyme-mediated initiation. **Macromolecules**, v. 32, p. 70-72, 1999.
- THORNALLEY, T.; LANGBORG, A.; MINHAS, H.S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. **Biochem. J.**, v. 344, p. 109-116, 1999.
- VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZACOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interact.**, v. 160, p. 1-40, 2006.
- VEITCH, N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, v. 65, p. 249-259, 2004.
- WARDMAN, P. Indole-3-acetic-acids and horseradish peroxidase: A new prodrug/enzyme combination for targeted cancer therapy. **Current Pharm. Design**, v. 8, p. 1363- 1374, 2002.
- WILBERG, K.Q. **Oxidação de compostos fenólicos em solução aquosa com enzima peroxidase de extratos vegetais**. 2003. 156 f. Tese (Doutorado) – Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- XIAO, C.; KING, D. W.; PALMER, D. A .; WESOLOWSKI, D. J. Study of enhancement effects in the chemiluminescence method for Cr (II) in the ng l –1 range. **Anal. Clin. Acta**, v. 415, p. 209-219, 2000.

XIMENES, V.F.; CATALANI, L.H.; CAMPA, A. Oxidation of Melatonin and Tryptophan by an HRP Cycle Involving Compound III. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 287, p.130–134, 2001.

XU, G.; MCLEOD, H.L. Strategies for Enzyme/Prodrug Câncer Therapy. **Clin. Cancer Res.**, v. 7, p. 3314- 3324, 2001.

XU, K.L.; ZHANG, Y.; PAN, X.Y.; LU, Q.X. Inhibiting the expression of CD28 costimulatory molecule on human lymphocytes by special RNA. **Chin. Med. J.(Engl)**, v. 118, p. 480-486, 2005.

7. ANEXO A



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



Protocolo CEP/FCF/CAr. nº 11/2005

Interessado: VALDECIR FARIA XIMENES

Projeto: EFEITOS ANTIINFLAMATÓRIOS E CITOTÓXICOS DE METOXI-
CATECÓIS E COMPOSTOS β -DICARBONÍLICOS

Parecer nº 03/2006 – Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto "Efeitos antiinflamatórios e citotóxicos de metoxi-catecóis e compostos β -dicarbonílicos", 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 considera o referido projeto estruturado dentro de padrões éticos e é de PARECER FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório parcial do projeto de pesquisa deverá ser entregue em janeiro de 2007 e o final em janeiro de 2008, no qual deverá constar o Termo de Consentimento Livre Esclarecido dos sujeitos da pesquisa.

Araraquara, 31 de janeiro de 2006.


Prof.^a. Dr.^a. MARIA VIRGINIA S. GOMES DE OLIVEIRA
Coordenadora do CEP

