

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA**

**MARÍLIA PYLES PATTO KANEGAE**

**APOCININA E METÓXI-CATECÓIS CORRELATOS:  
RELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA MOLECULAR E INIBIÇÃO  
DA ATIVAÇÃO DO COMPLEXO NADPH OXIDASE**

**ARARAQUARA – SP**

**2009**

**MARÍLIA PYLES PATTO KANEGAE**

**APOCININA E METÓXI-CATECÓIS CORRELATOS:  
RELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA MOLECULAR E INIBIÇÃO  
DA ATIVAÇÃO DO COMPLEXO NADPH OXIDASE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia e Biociências aplicadas a Farmácia  
da Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,  
como requisito para obtenção do título de doutor.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes**  
**CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca**

**ARARAQUARA – SP**

**2009**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes**  
**(Orientador)**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dulce Helena Siqueira Silva**

**Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleni Mara Marzocchi Machado**

**Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso**

*Aos meus queridos pais, Paulo e Ady,  
por sempre me apoiarem. Por mais esta  
conquista conjunta; e pelo amor que  
sempre me foi dispensado!*

*Ao Leonardo, pelo amor, confiança e  
incentivo. Por sua presença sempre  
constante!*

## **AGRADECIMENTOS**

*Às minhas irmãs, Laura e Júlia, simplesmente por serem partes de mim!*

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Valdecir, pela amizade, ajuda, por acreditar em meu trabalho e me transmitir parte de seu conhecimento.*

*Ao Prof. Dr. Fonseca, pela amizade, por me incentivar e sempre estar presente em minha vida acadêmica!*

*Ao Prof. Dr. Antônio Condino Neto, por me aceitar em seu laboratório e tornar possível este trabalho.*

*Ao Mateo, meu querido amigo, pela imensa ajuda, sem a qual este trabalho não teria sido possível!*

*Aos meus grandes amigos, Bruna, Caru, Edgar, Fabiana, Josias, Juliana, Jussara, Maiara, Patrícia, Soraya, Walmir, pela ajuda, amizade e alegria que sempre prevaleceram em meus dias de trabalho. Por me darem força naqueles dias em que tudo deu errado e por me ajudarem a seguir sempre adiante!*

*Aos meus queridos amigos Berenice, Julhiany, Thaís, Vanessa, Tatiane, Ana Paula, José Carlos, Najeh por fazerem parte de mais esta etapa cumprida!*

*À Eliana, Max, Marcos, Valéria, Rosemira e Tirene pela amizade e solicitude.*

*Aos funcionários do NAC pela coleta e processamento de amostras.*

*Às funcionárias do Hemonúcleo pela ajuda na coleta de amostras e também pela amizade e ajuda na execução do trabalho.*

*A todos os funcionários da Biblioteca que sempre estiveram dispostos a ajudar.*

*À Ângela, Cláudia, Laura e Sônia da Seção de Pós-Graduação pela paciência, ajuda e solicitude com que sempre me atenderam.*

*Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida.*

*A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, seja com uma palavra de incentivo ou um sorriso. Muito obrigada!*

# SUMÁRIO

	Página
<b>Capítulo I</b>	
1 Introdução.....	14
1.1 Fagócitos.....	15
1.2 Sistema NADPH oxidase.....	16
1.3 Espécies reativas de oxigênio e doenças relacionadas.....	19
1.3.1 Hipertensão.....	20
1.3.2 Doenças cardiovasculares.....	21
1.3.3 Câncer.....	21
1.3.4 Artrite reumatóide.....	22
1.4 Inibidores da NADPH oxidase.....	22
1.4.1 gp91ds-tat.....	22
1.4.2 PR 39.....	23
1.4.3 Difenileno iodônio (DPI).....	23
1.4.4 AEBSF.....	24
1.4.5 Neopterin.....	24
1.4.6 Apocinina.....	24
2 Justificativa e objetivos.....	28
3 Materiais e métodos.....	31
3.1 Reagentes.....	32
3.2 Preparo de soluções.....	32
3.2.1 Tampão PBS-D 10mM.....	32
3.2.2 NaCl 0,15M.....	33
3.2.3 Tampão fosfato 50mM.....	33
3.2.4 Azul de Trypan 0,5%.....	33
3.2.5 Peróxido de hidrogênio.....	34

3.3 Avaliação da viabilidade celular.....	34
3.3.1 Ensaio do azul de Trypan.....	34
3.3.2 Incorporação do iodeto de propídeo.....	34
3.4 Obtenção de Zymosan opsonizado.....	35
3.5 Separação de células por gradiente duplo de densidade (Histopaque®).....	35
3.6 Ensaio quimiluminescente dependente de lucigenina.....	36
3.7 Consumo de oxigênio por neutrófilos ativados.....	37
3.8 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) da oxidação dos metóxi-catecóis catalisada pela MPO e o efeito de GSH.....	38
3.9 Consumo de oxigênio durante a oxidação dos metóxi-catecóis catalisada pela MPO.....	38
3.10 Depleção de GSH durante a oxidação dos metóxi-catecóis.....	38
3.11 Depleção de grupamentos SH de ovalbumina durante a oxidação de orto-metóxi-catecóis.....	39
3.12 Síntese e análise de diapocinina.....	40
3.13 Avaliação da liberação de TNF- $\alpha$ e de IL-10.....	41
3.14 Expressão gênica de gp91 <sup>phox</sup> – Reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	42
4 Resultados.....	44
4.1 Ensaio quimiluminescente dependente de lucigenina.....	45
4.2 Consumo de oxigênio por neutrófilos ativados.....	46
4.3 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) da oxidação dos metóxi-catecóis catalisada pela MPO e o efeito de GSH.....	47
4.4 Consumo de oxigênio durante a oxidação dos metóxi-catecóis catalisada pela MPO.....	49
4.5 Depleção de GSH durante a oxidação dos metóxi-catecóis.....	51
4.6 Depleção de grupamentos SH de ovalbumina durante a oxidação de orto-metóxi-catecóis.....	54
4.7 Síntese e análise de diapocinina.....	55
4.8 Ensaio quimiluminescente dependente de lucigenina – efeitos da apocinina e do dímero de apocinina em neutrófilos e PBMC.....	57



4.9 Avaliação da liberação de TNF- $\alpha$ e de IL-10.....	58
4.10 Expressão gênica de gp91 <sup>phox</sup> – Reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	60
5 Discussão.....	61
5.1 Proposta de mecanismo de ação da apocinina por meio de sua capacidade em oxidar grupos tióis.....	62
5.2 Apocinina <i>versus</i> diapocinina como inibidores pré e pós-transcricionais.....	65
6 Conclusões.....	69
7 Referências bibliográficas.....	71

## Capítulo II

1 Artigo publicado - <i>The reactivity of ortho-methoxy-substituted catechol radicals with sulfhydryl groups: Contribution for the comprehension of the mechanism of inhibition of NADPH oxidase by apocynin</i> .....	80
2 Artigo submetido - <i>Diapocynin versus apocynin as pre- and post-transcriptional inhibitors of NADPH oxidase in peripheral blood mononuclear cells</i> .....	88

## RESUMO

A apocinina, um métoxi-catecol (MC) extraído das raízes da planta *Picrorhiza kurroa*, é um eficiente inibidor do complexo NADPH oxidase (NOX) e seu mecanismo de ação está relacionado à inibição da agregação dos componentes enzimáticos e à oxidação catalisada por peroxidases. Estudamos a relação estrutura-atividade da apocinina e de metóxi-catecóis correlatos, na inibição da NOX. Com a função de alterar o potencial de redução das moléculas estudadas, escolhemos MC com grupos adicionais aceptores (MC-A) ou doadores de elétrons (MC-D) na posição *para*, em relação à hidroxila da molécula de apocinina. Os MC-D inibiram mais fracamente a ativação da NOX em neutrófilos ativados quando comparados aos MC-A. Acreditamos que isso se deva à fraca reatividade destes compostos com grupamentos sulfidríla de proteínas, assim, os MC-D são incapazes de oxidar grupos essenciais aos componentes citosólicos da enzima e desta forma, inibir sua ativação. A diapocinina, metabólito gerado após a oxidação da apocinina por peroxidases, foi sintetizada e avaliamos seus efeitos em neutrófilos e leucócitos mononucleares ativados quanto à inibição da ativação da NOX e em leucócitos mononucleares, em relação à liberação de citocinas e expressão do RNAm do componente de membrana gp91<sup>phox</sup>. Encontramos que a apocinina e a diapocinina inibiram os três fenômenos estudados, embora a diapocinina o tenha feito de modo mais eficiente. Acreditamos que isto possa estar relacionado ao efeito supressor da apocinina e diapocinina sobre a ativação da NADPH oxidase.

**Palavras-chave:** apocinina, NADPH oxidase, diapocinina, citocinas, gp91<sup>phox</sup>

## ABSTRACT

Apocynin, a methoxy catechol (MC) extracted from the roots of *Picrorhiza kurroa* has been used as an efficient inhibitor of the NADPH oxidase (NOX) complex and its mechanism of action involves the impairment of the assemble process of the enzyme. Here, we studied the structure-activity relationship for apocynin and analogous ortho-methoxy-substituted catechols as inhibitors of the NADPH oxidase. Aiming to alter the reduction potential, the ortho-methoxy-catechol moiety was kept constant and the substituents at *para* position related to the hydroxyl group were varied. Two series of compounds were employed: methoxy-catechols bearing electron-withdrawing groups (MC-W) and methoxy-catechol bearing electron-donating groups (MC-D). We found that MC-D were weaker inhibitors of the NOX complex in stimulated neutrophils compared to MD-W. We suggest that there is a close relationship between the weak reactivity of MC-D compounds with sulfhydryl residues of proteins and there incapacity in inhibiting NOX activation. Diapocynin is a product generated by peroxidase oxidation of apocynin. Here we synthesized diapocynin and compared its efficacy as NOX inhibitor in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and neutrophils in relation to apocynin. Both drugs were also studied in cytokine release and its influence on gp91<sup>phox</sup> mRNA expression. We found that diapocynin was a more efficient inhibitor of NOX activation, gp91<sup>phox</sup> mRNA expression and cytokine release than apocynin. We suggest that these findings could be related to NOX inhibition process.

**Keywords:** apocynin, NADPH oxidase, diapocynin, cytokines, gp91<sup>phox</sup>.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR: artrite reumatóide

cDNA: DNA complementar

DGC: doença granulomatosa crônica

DNA: ácido desoxirribonucléico

DTNB: 5,5-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico)

ERO: espécie reativa de oxigênio

g: grama

GSH: glutationa

h: hora

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

IL-10: interleucina 10

kV: kilovolt

L: litro

LPS: lipopolissacarídeo

M: molar

MC: metóxi-catecol

min: minuto

mL: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

MPO: mieloperoxidase

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

nm: nanômetro

NOX: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

PBMC: células mononucleares sanguíneas periféricas

PCR: reação da polimerase em cadeia

phox: "phagocyte oxidase"

PI: iodeto de propídeo

PMA: miristato de forbol acetato

RNA: ácido ribonucléico

SDS: dodecil sulfato de sódio

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa

ZO: zymosan opsonizado

$\mu\text{g}$ : micrograma

$\mu\text{M}$ : micromolar

# **CAPÍTULO I**

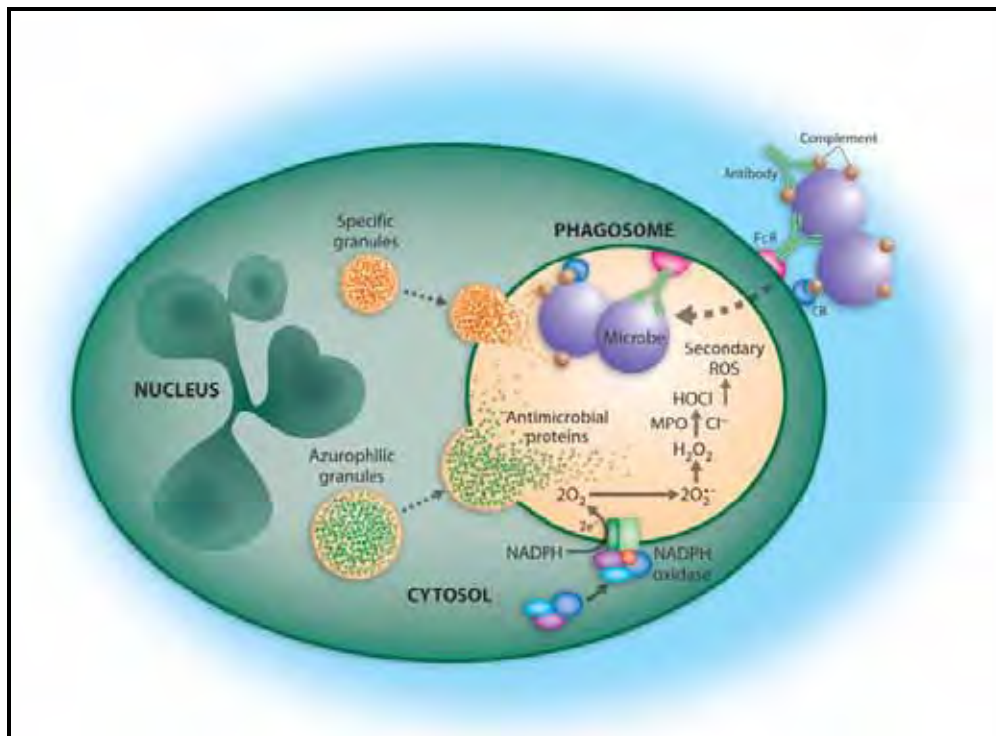
# **1 INTRODUÇÃO**

## 1 Introdução

### 1.1 Fagócitos

Os fagócitos são células cuja principal função é identificar, ingerir e destruir microrganismos. São originários da medula óssea e representados pelos neutrófilos, monócitos e macrófagos e células dendríticas (ABBAS et al., 2007).

A ativação de neutrófilos e fagócitos mononucleares resulta na secreção do conteúdo de seus grânulos: peptídeos microbicidas (defensinas, proteína antimicrobiana catiônica) e enzimas líticas (mieloperoxidase, elastase, catepsina G). Este fenômeno é acompanhado pela geração de reativos intermediários do oxigênio – fenômeno este, denominado de “surto oxidativo” – que podem ser liberados para o interior dos fagolisossomos, formados após a fagocitose, onde contribuem para a morte dos microrganismos ingeridos, ou, em algumas circunstâncias, para o meio extracelular, causando danos aos tecidos (FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003) (Figura 1).



**Figura 1:** Ativação da NADPH oxidase e sistemas microbicidas durante a fagocitose (QUINN et al., 2006).

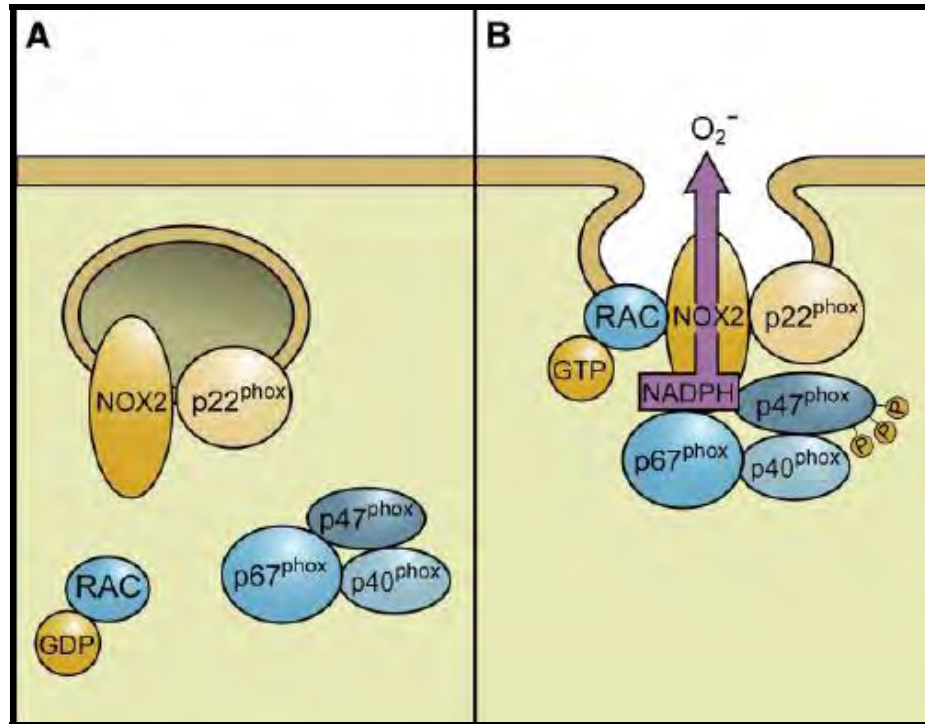


## 1.2 Sistema NADPH oxidase

As nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidases constituem um grupo de enzimas transmembrana, presentes em células de origem mesodérmica, incluindo os fagócitos, que catalisam a transferência de elétrons através da membrana celular (BABIOR, 1999; BEDARD & KRAUSE, 2007). São compostas de seis subunidades: duas proteínas transmembrana (p22<sup>phox</sup> e gp91<sup>phox</sup>/NOX2; esta última codificada pelo gene *CYBB*), que formam o flavocitocromo b<sub>558</sub> e são formadoras do sítio catalítico da enzima. O flavocitocromo b<sub>558</sub> é ancorado à membrana celular através de segmentos hidrofóbicos transmembrana e possui uma flavina e dois grupamentos heme (JOHNSON et al., 2002). As outras subunidades constituem-se de três proteínas citosólicas (p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> - *phox* de "*phagocyte oxidase*") e uma GTPase (Rac1 ou Rac2) (EL-BENNA et al., 2005; GROEMPING & RITTINGER, 2005). A separação destes dois grupos de componentes em compartimentos distintos garante a regulação do complexo enzimático. A ativação celular por estímulos fisiológicos (bactérias e fungos), moléculas indutoras de quimiotaxia (anticorpos e lipídeos bioativos) ou agentes não fisiológicos como ésteres de forbol, ácidos graxos, retinóides ou zymosan opsonizado levam à fosforilação da proteína citoplasmática p47<sup>phox</sup>, levando todo o complexo citoplasmático a migrar para a membrana e se associar ao citocromo b<sub>558</sub> (BABIOR, 1999) (Figura 2A).

A agregação do complexo NADPH oxidase permite o início da transferência eletrônica, a partir do substrato (NADPH), para o oxigênio molecular, gerando ânion superóxido e em seguida, outras espécies reativas de oxigênio (ERO). Ao mesmo tempo, todo o complexo é levado para a membrana celular,

através da fusão dos grânulos com a membrana. Esta fusão leva à liberação de EROs também para o meio extracelular (BABIOR, 1999) (Figura 2B).



**Figura 2:** Agregação do complexo NADPH oxidase em fagócitos (BEDARD & KRAUSE, 2007).

Por muito tempo se acreditou que a NADPH oxidase fosse exclusiva de fagócitos profissionais, mas, nos últimos anos, seis homólogos da gp91<sup>phox</sup>/NOX2 foram encontrados em células não fagocíticas e denominados NOX1, NOX3, NOX4, NOX5 (NADPH oxidase 1, 2, etc), DUOX1 e DUOX2; sendo que na nova terminologia, a gp91<sup>phox</sup> é denominada NOX2 e serviu de protótipo para seus homólogos. As DUOX1 e 2 foram os segundos homólogos a serem identificados, no tecido tireoidiano e, portanto, foram inicialmente denominadas ThOX1 e ThOX2. Em estudos subseqüentes, descobriu-se que estes dois homólogos possuíam a extremidade C-terminal semelhante a NOX2, mas a extremidade N-terminal possuía um domínio homólogo à peroxidase. Assim, devido à presença de dois tipos de

domínios, essas proteínas são hoje conhecidas como DUOX 1 e DUOX 2 (“dual oxidase” 1 e 2) (LAMBETH, 2004). Estas enzimas são funcionalmente distintas da oxidase fagocítica e respondem a uma variedade de mediadores humorais, como fatores de crescimento, citocinas e hormônios, assim como a estímulos físicos (tensão tangencial e estiramento cíclico) (QUINN et al., 2006). Na Tabela 1, abaixo, podem-se observar os tecidos/ tipo celulares em que cada componente da família NOX é expresso:

**Tabela 1:** Distribuição das NADPH oxidases.

Oxidase	Tecido/ Tipo celular
NOX1	Cólon, endotélio, útero, placenta, músculo liso, próstata, osteoclastos
NOX2	Células mielóides e linfóides, tecido vascular
NOX3	Ouvido interno, tecido fetal
NOX4	Rins, tecido fetal, endotélio, fibroblastos, queratinócitos
NOX5	Tecido linfóide, testículos, próstata, ovários, pâncreas
DUOX1	Tireóide, epitélio respiratório, epitélio lingual, cerebelo, testículos
DUOX2	Tireóide, glândulas retais e salivárias, epitélio gastrointestinal, epitélio respiratório, útero, vesícula biliar

(BEDARD & KRAUSE, 2007, QUINN et al., 2006)

A importância do surto oxidativo se faz notar em indivíduos afetados pela doença granulomatosa crônica (DGC), em que o sistema NADPH oxidase é parcial ou totalmente deficiente, devido à não expressão de um ou mais de seus componentes. Os portadores de DGC estão sujeitos a infecções recorrentes e, como consequência, a uma diminuída expectativa de vida (JURKOWSKA, et al., 2004).

### 1.3 Espécies reativas de oxigênio e doenças relacionadas

As EROs representam uma família diversa de moléculas envolvidas em processos fisiológicos e fisiopatológicos. São geradas durante uma seqüência de reações conhecida por surto oxidativo, em que há um aumento no consumo não mitocondrial de oxigênio, provocado pela ativação da NADPH oxidase, a qual reduz o oxigênio a ânion superóxido. Este ânion é o precursor primário das EROs, que podem ser divididas em: radicais livres de oxigênio – espécies altamente instáveis e de vida curta – como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) e radicais mais estáveis e oxidantes não-radicalares como ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e ozônio ( $O_3$ ) (BABIOR, 1999; QUINN et al., 2006).

Nos últimos anos, muito se avançou no estudo das NADPH oxidases e hoje já está claro que os reativos do oxigênio produzidos por esta enzima, constituem importantes reguladores de vias de sinalização celular, através da modulação da atividade de quinases e fosfatases ou através da regulação da transcrição gênica (GROEMPING & RITTINGER, 2005).

Embora façam parte de várias vias de sinalização celular, a produção excessiva de EROs resulta no estresse oxidativo, um processo deletério que pode causar danos em estruturas celulares e seus constituintes, incluindo lipídeos e membranas, proteínas e DNA (VALKO et al., 2007). Estas espécies estão envolvidas na progressão de vários processos patológicos, como a hipertensão e a aterosclerose (GROTE, et al., 2006; CAVE, et al., 2005), artrite reumatóide, isquemia tecidual, doenças renais (EL-BENNA, et al., 2005) e câncer (VALKO et al. 2007). A evolução dessas patologias deve-se a dois fatores: alteração do balanço redox da célula ou ao aumento da atividade da NADPH oxidase levando a condições

inflamatórias. Além disso, o processo de envelhecimento também está relacionado aos danos causados pelas EROs, como peroxidação lipídica, danos ao DNA e oxidação protéica (HARMAN, 1956).

### 1.3.1 Hipertensão

Alguns estudos recentes têm mostrado o envolvimento da NADPH oxidase na patogênese da hipertensão arterial. No sistema vascular, as EROs, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, atuam como importantes moléculas sinalizadoras na regulação da dinâmica da matriz extracelular, inflamação, proliferação, migração e diferenciação celular, assim como na contração e no relaxamento dos vasos. Entretanto, quando em excesso as EROs extrapolam a capacidade dos sistemas antioxidantes, causando várias complicações cardiovasculares. Deste modo, podem promover a hipertensão devido à disfunção endotelial, alteração da capacidade de contração e remodelação vascular, que são características comuns associadas à doença. Estudos indicam que superóxido em excesso tem ação *scavenger* sobre o óxido nítrico (NO), diminuindo assim sua biodisponibilidade e levando à formação de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), o qual é capaz de oxidar o cofator tetraidrobiopterina, causando o seu desacoplamento da NO sintase e início da disfunção endotelial. A alteração na biodisponibilidade do NO leva então, à diminuição na vasodilatação (McINTYRE et al., 1999; WILLIAMS & GRIENGLING, 2007). Estas alterações contribuem para a hipertensão e a exposição prolongada a estas condições pode ativar a remodelação vascular compensatória associada à doença, cujo processo é dinâmico e envolve mudanças na proliferação, apoptose e migração celular e na matriz extracelular (INTENGAN & SCHIFFRIN, 2001, MULVANY, 2002).

### **1.3.2 Doenças cardiovasculares**

As doenças cardiovasculares são a causa mais comum de mortes no ocidente e são responsáveis por mais de um terço das mortes em todo o mundo. Elas podem ser classificadas em doença coronariana, doença cerebrovascular e doença vascular periférica. São doenças multifatoriais e dependentes dos hábitos de vida (fumo, exercícios físicos, consumo de álcool). Um fato comum a todas essas patologias é a formação da placa aterosclerótica ou lesão (ateroma), que leva à oclusão de pequenos vasos e interrupção do fluxo sanguíneo, causando manifestações agudas como o infarto do miocárdio ou acidente cerebrovascular (ROSS, 1999). O passo inicial da doença cardiovascular é o dano endotelial, que expõe as células e a camada subendotelial ao processo inflamatório levando posteriormente, à lesão aterosclerótica. Este processo inflamatório leva à expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais que facilitam a adesão de monócitos, permitindo sua migração através do endotélio, até a íntima. Neste local os monócitos se transformam em macrófagos teciduais e posteriormente, em células espumosas, precursoras do processo aterosclerótico. Muitos tipos de EROs estão envolvidos na migração e proliferação deste tipo celular, causando também modificações oxidativas na molécula da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (FEARON & FAUX, 2009).

### **1.3.3 Câncer**

Quando comparadas às células saudáveis; as células cancerosas têm um maior desbalanceamento do estado redox causado pelo estresse oxidativo e por este motivo, acredita-se que a oncogênese esteja relacionada às EROs. Outrossim,

os danos oxidativos constantes causados ao material genético celular representam a primeira etapa para a mutagênese e carcinogênese (VALKO et al., 2007).

### **1.3.4 Artrite reumatóide**

A artrite reumatóide (AR) é uma doença autoimune caracterizada pela hiperproliferação da membrana sinovial e acúmulo de macrófagos e células T ativadas, o que leva à inflamação crônica das articulações e tecidos adjacentes. Além da presença aumentada de citocinas pró-inflamatórias; a patogênese da AR está relacionada com a formação de EROs no sítio inflamatório (BAUEROVA & BEZEK, 1999; CHENEVIER-GOBEAUX et al., 2006). As EROs (ânion superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio) são responsáveis pela hidrólise do colágeno e ativação de metaloproteinases, levando à degradação da matriz extracelular (CHENEVIER-GOBEAUX et al., 2006).

## **1.4 Inibidores da NADPH oxidase**

Considerando o efeito deletério da produção descontrolada de EROs, muitas substâncias têm sido estudadas como inibidores da NADPH oxidase, entre elas a apocinina (WILLIAMS & GRIENGLING, 2007).

### **1.4.1 gp91ds-tat**

gp91ds-tat é um peptídeo quimérico composto por 18 aminoácidos, sendo um dos mais específicos e eficazes inibidores da NADPH oxidase. Nove de seus aminoácidos mimetizam a região em que a gp91<sup>phox</sup> interage com a p47<sup>phox</sup>. Em sistemas livre de células, esta seqüência ancoradora (“*docking sequence*”) se liga à p47<sup>phox</sup>, impedindo a agregação do complexo, e inibindo, portanto, a ativação. Os

outros nove aminoácidos correspondem a uma sequência específica do envelope do vírus da imunodeficiência humana (HIV), que permite que o peptídeo seja internalizado pelas células (WILLIAMS & GRIENGLING, 2007). Este peptídeo se mostrou mais eficaz na inibição da geração de superóxido no sistema vascular, onde as isoformas NOX1 e NOX4 têm papel mais importante (REY et al., 2001). Em ensaios livre de células, gp91ds inibiu a atividade da NADPH oxidase em mais de 80%, entretanto, a máxima inibição ocorreu somente em altas concentrações (100 $\mu$ M) e somente em neutrófilos humanos a inibição máxima foi de 35% (WILLIAMS & GRIENGLING, 2007).

#### **1.4.2 PR 39**

O PR39 é outro peptídeo inibidor das NADPH oxidases. Originalmente extraído de intestino de porco, constitui um peptídeo de 39 aminoácidos com ação antibiótica contra bactérias Gram negativas. O PR 39 interfere na agregação da oxidase por se ligar a domínios SH3 da p47<sup>phox</sup>, semelhante ao modo de ação do gp91ds-tat. O inconveniente deste peptídeo é sua alta inespecificidade, uma vez que ele é capaz de se ligar a proteínas que possuam domínios SH3, além de interagir com lipídeos de membrana (CAI et al., 2003, WILLIAMS & GRIENGLING, 2007).

#### **1.4.3 Difenileno iodônio (DPI)**

É um potente inibidor da NADPH oxidase. O DPI abstrai um elétron da oxidase, levando à formação de um aduto com o FAD e inibindo deste modo, a formação de superóxido (O'DONNELL et al., 1993) . Seu uso é limitado devido à sua inespecificidade, pois ele age em outras enzimas portadoras do grupamento FAD, como a NO sintase e os citocromos P450. Além disso, o DPI é um inibidor da



gliconeogênese, pois impede a oxidação dos substratos mitocondriais (WILLIAMS & GRIENGLING, 2007).

#### **1.4.4 AEBSF**

AEBSF (fluoreto de aminoetil benzenossulfônico), também conhecido como Pefabloc, é outro inibidor químico da NADPH oxidase. É um inibidor de serino proteases que interfere na associação da subunidade citoplasmática p47<sup>phox</sup>. Devido à sua ação inespecífica seu uso é inadequado para a inibição clínica das NOX (BEDARD & KRAUSE, 2007).

#### **1.4.5 Neopterin**

A neopterin é uma pteridina gerada por macrófagos como catabólito do GTP. A inibição da NADPH oxidase fagocítica ocorre com doses micromolares, no entanto, sua ação é inespecífica, pois inibe também as xantina oxidases (BEDARD & KRAUSE, 2007).

#### **1.4.6 Apocinina**

A apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona), composto pertencente à classe dos metóxi-catecóis, foi descrita pela primeira vez em 1883 por Schmiedeberg quando foi isolada das raízes da planta *Apocynum cannabinum* (maconha canadense). Em 1971, foi isolada das raízes da planta nativa do Himalaia *Picrorhiza kurrooa*, muito utilizada na medicina tradicional indiana. Desde então, tem sido utilizada como um potente e não tóxico inibidor da ativação do complexo multienzimático NADPH oxidase em fagócitos e células não fagocíticas,

apresentando, portanto, potencial antiinflamatório (‘t HART, et al., 1990, LAFEBER et al., 1999, ZHANG et al., 2005, COSTA et al., 2009).

Dezenas de trabalhos têm reportado a apocinina como uma das moléculas de escolha quando o objetivo é avaliar o envolvimento do sistema NADPH oxidase em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Como exemplo, temos este trabalho de DODD-O e colaboradores: suínos pré-tratados com altas doses de apocinina (400mg/kg) por via intravenosa foram submetidos a um modelo experimental de lesão em pulmões, causado por circulação extracorpórea (*cardiopulmonar bypass*). Neste caso, os autores sugerem que espécies reativas de oxigênio derivadas do sistema NADPH oxidase contribuam para o dano neste órgão, no entanto, o tratamento com apocinina levou a uma menor ativação basal dos neutrófilos periféricos e ainda, uma menor geração de EROs nas células endoteliais do que em animais controle (DODD-O, et al., 2004).

Em outro estudo, células endoteliais de cordão umbilical foram submetidas ao modelo de isquemia/reperfusão, o que levou à ativação celular, levando à maior produção de EROs e expressão de moléculas de adesão, conhecidas como selectinas. A co-cultura dessas células com apocinina, além de inibir a geração de EROs, mostrou-se capaz de diminuir a expressão de selectinas (RUPIN, et al., 2004). Lafeber e colaboradores mostraram que a apocinina foi capaz de inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias em células mononucleares obtidas de pacientes portadores de artrite reumatóide (LAFEBER, et al., 1999).

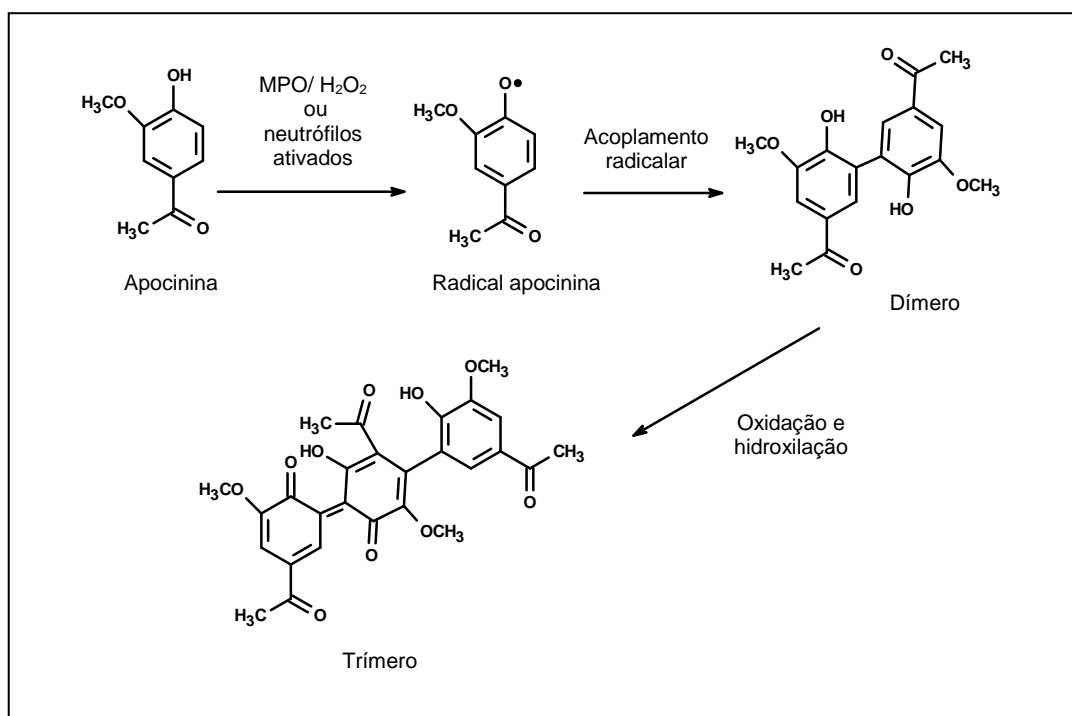
A geração de EROs e a liberação de citocinas podem ser suprimidas pela apocinina, a qual também apresenta propriedades tipicamente relacionadas aos antiinflamatórios não esteroidais, ou seja, inibição da formação dos mediadores lipídicos da inflamação. Neste contexto, a forma induzível das ciclooxygenases,

conhecida como COX-2, foi inibida por este metóxi-catecol em monócitos estimulados por zymosan opsonizado. Neste caso, o decréscimo na razão glutatona reduzida/ glutatona oxidada (GSH/GSSG) intracelular, causado pela adição de apocinina, parece estar relacionado à inibição da expressão da COX-2, uma vez que o efeito pôde ser revertido pela adição de GSH (BARBIERI, et al., 2004). Esta propriedade da apocinina em reagir com GSH é justificada pelo caráter eletrofílico de seus produtos de oxidação ou pela formação de intermediários radicalares, como será descrito adiante.

Em um modelo experimental em ratos da doença de Huntington, induzido pela injeção intraestriatal de ácido quinolínico, o aumento da atividade da NADPH oxidase parece estar envolvido nos danos causados pela patologia. Foi observado que a injeção intraperitoneal de apocinina levou à diminuição da atividade enzimática, diminuição da peroxidação lipídica e diminuição do dano histológico (MALDONADO et al., 2009).

Inúmeros trabalhos mostram que a apocinina é um eficiente inibidor do complexo NADPH oxidase. O modo de ação desta molécula não é totalmente conhecido e parece estar relacionado ao impedimento da agregação dos componentes da enzima (BARBIERI et al., 2004). Recentemente foi reportado, que o mecanismo de ação da apocinina, envolve sua metabolização por meio da ação catalítica da enzima mieloperoxidase e a conseqüente geração de um produto dimérico. Sugere-se que este metabólito iniba a agregação e translocação para a membrana dos componentes citossólicos do complexo NADPH oxidase (JOHNSON, et al., 2002).

O mecanismo proposto para a oxidação da apocinina via ação catalítica da peroxidase neutrofílica (mieloperoxidase, MPO) foi sugerido em um trabalho recente do grupo e está representado na Figura 3 (XIMENES, et al., 2007).



**Figura 3:** Mecanismo proposto para a oxidação da apocinina (XIMENES, et al., 2007).

## **2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

## 2 Justificativa e objetivos

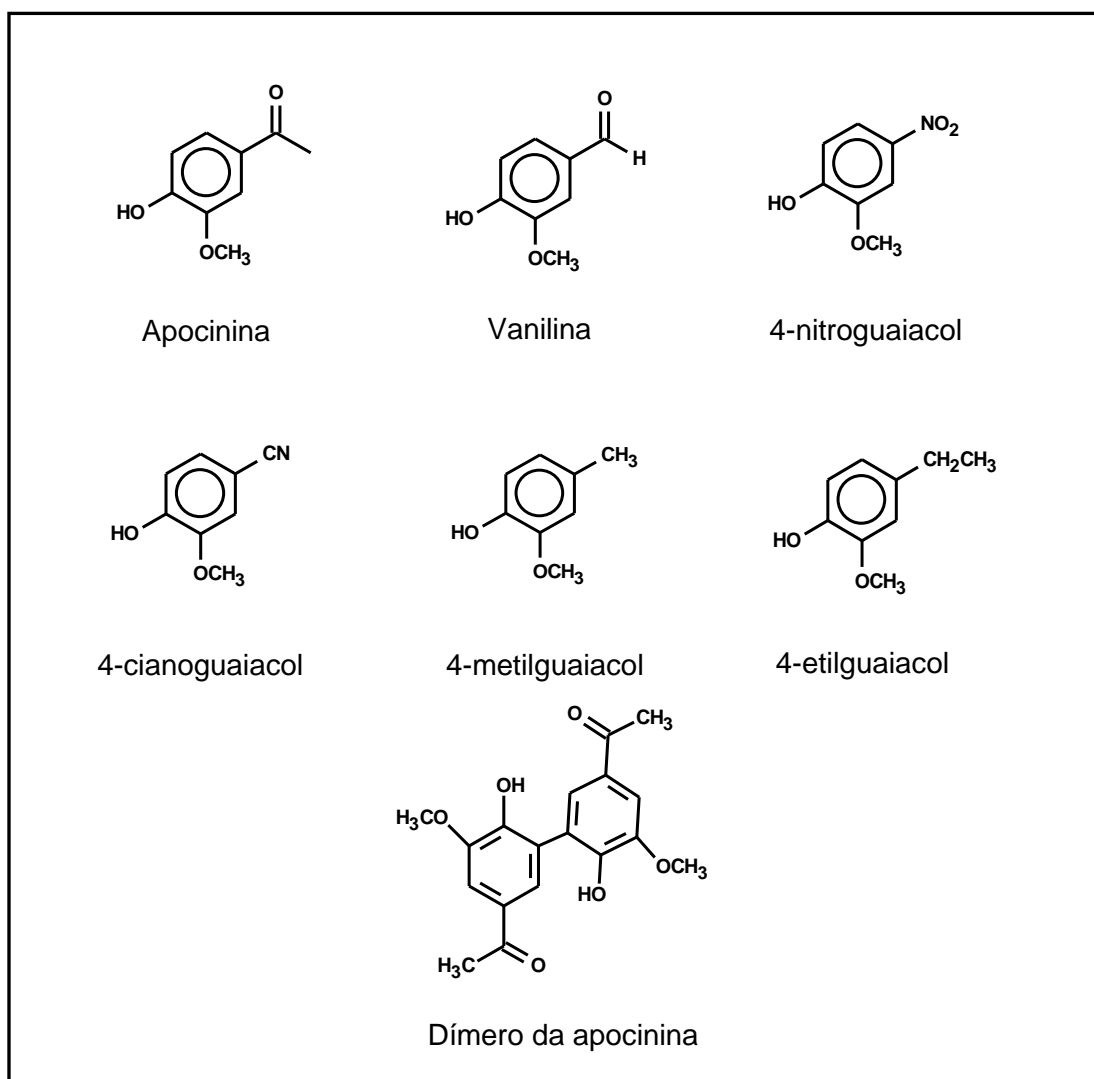
Como delineado anteriormente, a apocinina é extremamente promissora na geração de uma nova classe de compostos imunomoduladores que poderão ser úteis em diversas áreas biomédicas. Este projeto de pesquisa se apóia em três propriedades recentemente descritas para a apocinina, e que acreditamos serem fundamentais para o entendimento do mecanismo de ação da mesma: i) a importância do grupo acetila da apocinina na inativação do *burst* oxidativo em neutrófilos (VAN DEN WORM, et al., 2001); ii) a provável necessidade de metabolização da apocinina pela ação catalítica da MPO com conseqüente geração de um produto dimérico como sendo o real inibidor da ativação do complexo NADPH oxidase (STOLK, et al., 1994); iii) o decréscimo na razão GSH/GSSG intracelular causado pela adição de apocinina (BARBIERI, et al., 2004).

Neste sentido o projeto se desenvolveu em duas linhas com os seguintes objetivos específicos:

- Estudar a correlação entre a estrutura molecular de metóxi-catecóis correlatos à apocinina (Figura 4) e a inibição do complexo NADPH oxidase em relação a:
  - i) Inibição do surto oxidativo em neutrófilos estimulados;
  - ii) Reatividade dos metóxi-catecóis com peroxidases e efeito de glutatona e resíduos sulfidrilas em proteínas.
- Estudar e comparar os efeitos biológicos da apocinina e de seu dímero quanto a:
  - i) Inibição da ativação do surto oxidativo em neutrófilos e células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC);

ii) Inibição da liberação de fator de necrose tecidual-alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-10 (IL-10) por PBMC estimulados por lipopolissacarídeo (LPS);

iii) Inibição da expressão de gp-91<sup>phox</sup>.



**Figura 4:** Estrutura dos metóxi-catecóis estudados.

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**



### 3 Materiais e métodos

#### 3.1 Reagentes

Apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona), 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (vanilina), 2-metoxi-4-nitrofenol (4-nitroguaiacol), 4-hidroxi-3-metoxibenzonitrila (4-cianoguaiacol), 2-metoxi-4-metilfenol (4-metilguaiacol), 4-etil-2-metoxifenol (4-etilguaiacol), glutationa (GSH), zymosan, 5,5-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB), lucigenina, miristato de forbol acetato (PMA), Histopaque-1077<sup>®</sup>, Histopaque-1119<sup>®</sup>, iodeto de propídeo, azul de Trypan, citocromo C, superóxido dismutase, foram adquiridos da Sigma (St Louis, MO, EUA). Peróxido de hidrogênio da Peróxidos do Brasil (SP, Brasil). Mieloperoxidase (EC 1.11.1.7) da Planta Natural Products (Viena, Áustria) e sua concentração foi determinada através da sua absorção em 430nm ( $\epsilon_{430nm}=89.000M^{-1}cm^{-1}$  por heme). Meio RPMI 1640 foi adquirido da LGC Biotecnologia (Cotia, SP, Brasil). Soro fetal bovino (SFB) da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA), L-glutamina, estreptomicina e penicilina da Gibco (NY, EUA), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), sistema de desenvolvimento de ELISA DuoSet<sup>®</sup> para TNF- $\alpha$  e IL-10 da R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA). Todos os reagentes utilizados para soluções e tampões possuíam grau analítico.

#### 3.2 Preparo de soluções

##### 3.2.1 Tampão PBS-D (Dulbecco) 10mM (BABIOR & COHEN, 1981)

###### Composição

NaCl	8,0g
KCl	0,2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15g
CaCl <sub>2</sub>	0,1g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2g

MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1g
H <sub>2</sub> O q.s.p.	1,0L

Em um recipiente dissolveu-se o CaCl<sub>2</sub> e MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O em 100mL de água tipo I (MilliQ®). Em outro recipiente foram diluídos os outros sais, em aproximadamente 700mL de água tipo I. As duas soluções foram então, misturadas sob agitação. O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH 5N e o volume foi completado para 1000mL.

### **3.2.2 NaCl 0,15M**

Adicionaram-se 8,77g de NaCl em um béquer contendo aproximadamente 500mL de água tipo I. Esta solução foi então transferida para um balão volumétrico de 1000mL e completou-se o volume.

### **3.2.3 Tampão fosfato 50mM**

Foram preparadas soluções 50mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> em frascos distintos. Estas soluções foram então misturadas sob agitação até se atingir o pH desejado.

### **3.2.4 Azul de Trypan 0,5% (XU et al., 2005)**

Dissolveu-se 0,05g de azul de Trypan em 10mL de solução de NaCl 0,15M. Esta suspensão foi filtrada duas vezes em papel de filtro e conservada em frasco âmbar, a 4°C.

### **3.2.5 Peróxido de hidrogênio (BRETEL, 1985)**

A solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Peróxidos do Brasil, SP, Brasil) foi diluída em água e sua concentração calculada usando-se sua absorção em 240nm ( $\epsilon = 43,6M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

## **3.3 Avaliação da viabilidade celular**

### **3.3.1 Ensaio do azul de Trypan (XU et al., 2005)**

Este ensaio foi realizado através do teste de exclusão pelo azul de Trypan, em que as células viáveis não incorporam o corante, apresentando-se refringentes quando observadas em câmara hemocitométrica (Câmara de Neubauer) à microscopia óptica.

A suspensão celular foi incubada com solução de azul de Trypan 0,5%, na proporção de 1:1, por 5 minutos. Essa suspensão foi observada em microscópio óptico e as células contadas como coradas (mortas) e não coradas (viáveis). A viabilidade celular foi então calculada em porcentagem.

### **3.3.2 Incorporação do iodeto de propídeo**

([www.molbio1.princeton.edu/facility/flowcyt/viability.html](http://www.molbio1.princeton.edu/facility/flowcyt/viability.html))

O iodeto de propídeo (PI) é um corante capaz de penetrar a membrana de células não viáveis ou mortas e intercalar na fenda maior do DNA, produzindo fluorescência. Deste modo, as células não viáveis podem ser identificadas por fluorescência vermelha positiva. O PI possui comprimento de onda de excitação de 488nm e a fluorescência emitida é detectada entre 550 e 670nm.

Primeiramente, uma solução estoque de PI (Sigma, EUA) foi preparada em PBS (10mg/mL) e armazenada a 4°C, ao abrigo da luz.

Para o ensaio de viabilidade, as células foram ressuspensas em tampão PBS adicionado de soro fetal bovino 2% na concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL. Esta suspensão foi então misturada a uma solução de PI (20 $\mu$ g/mL) na proporção de 1:1.

As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo Beckman Coulter<sup>®</sup> EPICS<sup>®</sup>-XL-MCL (Beckman Coulter, Fullerton, CA) e os resultados analisados no software Flow Jo, mostrando sempre viabilidade acima de 95%.

#### **3.4 Obtenção de Zymosan opsonizado (LOJEK et al., 2002)**

O Zymosan (Zymosan A de *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma, EUA) foi suspenso em PBS-D (20mg/mL) e levado a fervura por 20 minutos. Deixou-se esfriar e esta suspensão foi então, lavada três vezes com PBS-D, por centrifugação, a 250xg por 10 minutos. Para a opsonização, a suspensão de Zymosan foi incubada, a 37°C por 60 minutos, com um pool de soros humanos a 65%, na proporção de 1:2. Foi então lavada duas vezes com PBS-D e ressuspensa na concentração desejada. A concentração final de Zymosan opsonizado (ZO) na mistura de reação, foi de 1mg/mL.

#### **3.5 Separação de células por gradiente duplo de densidade (Histopaque<sup>®</sup>)**

(BOYUM, 1968; ENGLISH & ANDERSEN, 1974)

Amostras de sangue (12mL) foram coletadas de 15 voluntários sadios após serem informados dos riscos e propósitos da pesquisa através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Parecer 03/2006) em tubos contendo heparina sódica.

Os leucócitos mononucleares (PBMC) e os polimorfonucleares (PMN) foram obtidos após o procedimento descrito a seguir:

A um tubo cônico de centrifuga de 15mL foram adicionados 3mL de Histopaque-1119<sup>®</sup>, em seguida, foram adicionados 3mL de Histopaque-1077<sup>®</sup>. Sobre a fase superior, foram adicionados 6mL de sangue total heparinizado. O tubo foi centrifugado a 700xg por 30 minutos à temperatura ambiente, de modo que camadas distintas puderam ser observadas após a centrifugação. Após a centrifugação, o plasma foi descartado, a fase contendo os leucócitos mononucleares transferidos para um novo tubo e a fase contendo os leucócitos polimorfonucleares para outro. De acordo com o ensaio realizado, o tubo contendo os mononucleares ou o tubo contendo os PMN foi centrifugado a 700xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células lavado duas vezes com solução de NaCl 0,15M, centrifugando-se por 10 minutos a 700xg. As células foram ressuspensas em tampão PBS 10mM, pH 7,4 ou em meio RPMI 1640 completo suplementado com soro fetal bovino 10% e 2mM L-glutamina, 100µg/mL estreptomicina e 100U/mL penicilina, de acordo com o ensaio a ser realizado, e tiveram sua concentração ajustada.

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão de azul de Trypan, apresentando, sempre, resultados acima de 95%.

### **3.6 Ensaio quimiluminescente dependente de lucigenina (ALLEN, 1986).**

A quimiluminescência tem sido amplamente utilizada como um método sensível e preciso para se quantificar a capacidade de neutrófilos em produzir EROs. Este ensaio permite identificar qual ERO está sendo produzida, através da sonda luminescente utilizada – o ânion superóxido pode ser detectado com o uso de lucigenina e a atividade do sistema MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl pode ser detectado com luminol

(ALLEN, 1986). Aqui o nosso objetivo foi quantificar a atividade da NADPH oxidase, por isso utilizamos a lucigenina como sonda, através do ensaio descrito adiante.

As células mononucleares ou os polimorfonucleares foram pré-incubados a 37°C durante 10 minutos, em PBS suplementado na presença de lucigenina (10 $\mu$ M) e várias concentrações de metóxi-catecóis, completando um volume de 300 $\mu$ L. A reação foi iniciada pela adição do estímulo – PMA (100nM) ou zymosan opsonizado (1mg/mL) e a quimiluminescência monitorada por 30 minutos utilizando-se o luminômetro Centro 960 (Berthold Technologies, Alemanha). A integral da emissão de luz foi utilizada como parâmetro analítico.

Os ensaios em que os metóxi-catecóis estavam ausentes foram utilizados como controle para o cálculo da inibição relativa para cada substância.

Para o cálculo do IC<sub>50</sub> de cada metóxi-catecol, curvas analíticas foram levantadas correlacionando a inibição com as concentrações das substâncias em estudo. O valor de IC<sub>50</sub> foi obtido a partir de ensaios realizados em triplicata.

### **3.7 Consumo de oxigênio por neutrófilos ativados**

Os PMN (4x10<sup>6</sup> células/mL) foram incubados a 37°C em PBS-D suplementado com glicose (1mg/mL) na presença dos diferentes metóxi-catecóis e de zymosan opsonizado (1mg/mL). O consumo de oxigênio dissolvido no meio foi medido em um eletrodo de oxigênio do tipo Clark (Yellow Spring Instruments 5300A, Cincinnati, EUA). Os ensaios em que os metóxi-catecóis estiveram ausentes foram usados como controle. Para garantir a presença de oxigênio no meio, a solução tampão foi equilibrada deixando-se a cubeta aberta e sob agitação por 5 minutos.

### **3.8 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) da oxidação dos metóxi-catecóis catalisada por MPO e o efeito de GSH**

Os metóxi-catecóis (1mM) foram incubados em tampão fosfato 50mM, pH 7,0 a 25°C, na presença de MPO 0,5 $\mu$ M e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5mM por 10 min na presença ou não de GSH. A reação foi iniciada pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A mistura de reação foi submetida à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) utilizando-se um cromatógrafo Waters composto por módulo de separação Waters 2690 e detector UV-vis Waters 996 ajustado para comprimento de onda de 254 nm (Waters, Milford, Massachusetts, EUA). As análises foram realizadas em modo isocrático em uma coluna de fase reversa (Synergi<sup>®</sup> C18, com dimensões de 250 x 4,6mm, 5 $\mu$ m) utilizando-se a mistura água:acetoneitrila na proporção de 60:40 como fase móvel e fluxo de 0,7mL/min.

### **3.9 Consumo de oxigênio durante a oxidação dos metoxi-catecóis catalisada pela MPO**

Os metóxi-catecóis (1mM) foram incubados com MPO 0,5 $\mu$ M em tampão fosfato 50mM, pH 7,0 a 25°C, na presença ou ausência de GSH (1mM). A reação foi iniciada pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5mM) e monitorada em um eletrodo de oxigênio do tipo Clark (Yellow Spring Instruments 5300A, Cincinnati, EUA).

### **3.10 Depleção de GSH durante a oxidação dos metóxi-catecóis**

Ao tampão fosfato 50mM, pH 7,0 adicionaram-se metóxi-catecóis 1mM, peróxido de hidrogênio 0,5mM, MPO 0,5 $\mu$ M e GSH 1mM, totalizando um volume de 1mL. A reação foi iniciada pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após um período fixo de incubação (2 min) a 25°C, a reação foi interrompida pela adição de catalase (20 $\mu$ g/mL).

Alíquotas de 450 $\mu$ L desta reação foram removidas para se quantificar a concentração remanescente de GSH como segue: a 450 $\mu$ L da mistura de reação foram adicionados 450 $\mu$ L de uma solução 300mM de fosfato dibásico de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e 100 $\mu$ L de uma solução de ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) (20mg DTNB dissolvidos em 100mL de uma solução 1% de citrato de sódio). A absorbância foi lida em 412nm contra um branco em que se substituiu a mistura de reação por 450 $\mu$ L de tampão (KO et al., 1997).

### **3.11 Depleção de grupamentos SH de ovalbumina durante a oxidação de orto-metóxi-catecóis**

Para quantificar a concentração relativa de resíduos sulfidrilas (SH) livres em proteínas utilizamos a mesma técnica de redução do DTNB, mas adaptado para determinação em ovalbumina, que foi obtida a partir da clara do ovo de galinha. As seguintes soluções foram preparadas: tampão tris-glicina (0,1M tris; 0,1M glicina e 4mM EDTA ajustado para pH 8.0), solução 5% de SDS em tampão tris-glicina e solução de DTNB constituída por 4mg/mL de DTNB em tampão tris-glicina.

Uma solução de ovalbumina 0,1% foi preparada em tampão tris-glicina e centrifugada por 5min a 1.000xg. Para a determinação do total de grupamentos SH, 500 $\mu$ L da solução de proteína foram misturados a 500 $\mu$ L da solução SDS-tris-glicina e 10 $\mu$ L do reagente DTNB. A mistura de reação foi incubada em banho-maria por 15min a 40°C para que a proteína se desnaturasse e os grupamentos SH ficassem acessíveis ao DTNB. A absorbância foi medida em 412nm utilizando um branco em que a solução de proteína foi substituída por tampão (VAN DER PLANCKEN et al., 2005).



Para verificarmos a reatividade dos metóxi-catecóis com os grupos SH, a solução de proteína descrita acima foi previamente incubada com estes compostos (1mM) na presença de MPO (0,2 $\mu$ M) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1mM) por 10min, a temperatura ambiente. Os grupamentos SH remanescentes foram então, quantificados pelo método citado (DTNB).

### **3.12 Síntese e análise de diapocinina (LUCHTEFELD et al., 2008)**

A diapocinina foi sintetizada pela dissolução de 2g de apocinina em 200mL de água deionizada sob agitação e aquecimento até fervura. Adicionou-se então, 0,15g de sulfato ferroso hepta-hidratado e 1,6g de persulfato de potássio. A solução foi resfriada, filtrada e o precipitado formado dissolvido em hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) 3M. A seguir, o produto formado foi re-precipitado pela adição de ácido clorídrico (HCl) 6M. O precipitado foi filtrado e lavado com 100mL de água aquecida à fervura. A diapocinina precipitada foi então purificada pela lavagem em 100mL de metanol aquecido e seca em dessecador à vácuo sobre ácido sulfúrico. A pureza foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Varian ProStar e detector UV-Vis ajustado para 254nm). A análise foi realizada em modo isocrático utilizando-se uma coluna de fase reversa C18 (coluna Luna<sup>®</sup>, Phenomenex<sup>®</sup> com as seguintes dimensões 250 X 4,6 mm, 5 $\mu$ m). A fase móvel foi composta de solução aquosa de acetato de amônio 0,31%:metanol nas proporções 52:48 (v/v) e fluxo de 1,0mL/min.

A identificação da diapocinina foi realizada por espectrometria de massa por infusão direta da amostra purificada no espectrômetro (Quattro II Micro<sup>™</sup>, triplo quadrupolo, Micromass, Manchester, Reino Unido) o qual estava equipado com uma fonte de ionização do tipo electrospray. O equipamento foi operado com ionização

no modo negativo, na faixa de relação massa/carga 150–500 m/z. A voltagem aplicada na geração do spray foi de 4,5kV, a temperatura do capilar ajustada para 150°C e o fluxo do gás de dessolvatação ajustado para 300L/h.

### **3.13 Avaliação da liberação do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e de interleucina-10 (IL-10)**

Os leucócitos mononucleares isolados ( $1 \times 10^6$ /mL) foram pré-incubados por 15 minutos a temperatura ambiente com apocinina/dímero, em diferentes concentrações, em meio RPMI 1640 suplementado, em placa de 96 poços. Após este período, adicionou-se LPS 10 $\mu$ g/mL para que a liberação de citocinas fosse estimulada e incubou-se por 24 horas, a 37°C, em atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub>. Os sobrenadantes foram aliqüotados e estocados a -80°C até o momento do ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de TNF- $\alpha$  ou IL-10. Após a incubação de 24 horas, realizou-se o ensaio de viabilidade celular por citometria de fluxo, utilizando-se o ensaio de incorporação de iodeto de propídeo. Os resultados de citometria de fluxo foram analisados no software Flow Jo, mostrando sempre viabilidade acima de 95%.

O ensaio imunoenzimático foi executado de acordo com instruções do fabricante: incubou-se a placa de 96 poços com o anticorpo de captura *overnight*. A placa foi então lavada e efetuou-se o bloqueio com solução de albumina bovina a 1% em tampão PBS durante 1 hora. A placa foi então, lavada e o padrão, nas concentrações preconizadas, e as amostras foram adicionados. Incubou-se por 2 horas. Após nova lavagem, a placa foi incubada por 1 hora com o anticorpo de detecção. Lavou-se a placa e adicionou-se estreptavidina conjugada com HRP (*horseradish peroxidase*) por 20 minutos. Após nova lavagem, o substrato

(tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio) foi adicionado e procedeu-se uma incubação de 20 minutos. Logo após, adicionou-se a solução de ácido sulfúrico para interromper a reação. A absorbância foi determinada em 540nm em leitor de microplacas (Labsystems Multiskan ).

### **3.14 Expressão gênica de gp91<sup>phox</sup> - Reação em cadeia da polimerase em tempo real (real-time PCR)**

Após o isolamento, os leucócitos mononucleares foram incubados com apocinina ou dímero, por 24 horas a 37°C, em atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub>. Dexametasona 3μM foi utilizada como inibidor controle da expressão de gp91<sup>phox</sup> (CONDINO-NETO et al., 1998). A amostra que apresentava ausência de inibidores foi usada como controle espontâneo (expressão relativa igual a 1).

O RNA total foi isolado pelo método do Trizol (TRIZOL<sup>®</sup> Reagent (INVITROGEN15596-026), de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi obtido a partir de 1μg do RNA total, num volume de 20μL, utilizando-se M-MLV RT e hexâmeros randômicos (Invitrogen). A partir do cDNA, a análise de expressão foi avaliada utilizando-se o sistema SYBR Green Real Time System (Applied Biosystems). Cada 12μL de mix de PCR continham 3μL de cDNA diluído 1:30, 6μL de SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix (1X SYBR<sup>®</sup> Green Buffer, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 200nM mix de dNTP, 0,63U Amplitaq Gold<sup>®</sup>, 0,25U AmpErase<sup>®</sup>), e 600nM do primer para gp91<sup>phox</sup> (Gene Bank NM 00397) *forward* primer 5'-TTG CTG GAA ACC CTC CTA TGA-3', *reverse* primer 5'-AAA ACC GCA CCA ACC TCT CA-3'. As condições de ciclo de temperatura para o aparelho ABI 5700 *thermal cycler* foram: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min e então 35 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min. Após 35 ciclos (ABI 5700 *thermal cycler*), uma curva de dissociação (*melting curve*) foi gerada no

intervalo de 60°C a 95°C. A amplificação paralela de  $\beta$  actina (Gene Bank NM 001101) foi utilizada para normalizar a quantidade de amostra. As reações foram realizadas em triplicata e os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão. Curvas padrões para cada produto de amplificação foram geradas a partir de diluições de 10 vezes de *pools* de cDNAs para a determinação da eficiência dos primers.

## **4 RESULTADOS**

## 4 Resultados

### 4.1 Ensaio quimiluminescente dependente de lucigenina

Os metóxi-catecóis análogos à apocinina foram analisados quanto à capacidade de inibir a quimiluminescência dependente de lucigenina em neutrófilos estimulados por zymosan opsonizado. Os grupos utilizados em substituição ao grupamento acetila da apocinina foram selecionados de acordo com o efeitoceptor ou doador de elétrons exercido sobre o anel aromático (MARCH, 1982). Assim, 4-etilguaiacol e 4-metilguaiacol são exemplos de metóxi-catecóis portadores de grupos doadores de elétrons (MC-D) e apocinina, vanilina, 4-cianoguaiacol e 4-nitroguaiacol representam moléculas com grupos aceptores de elétrons (MC-A). Os resultados na Tabela 2 mostram que os MC-D inibiram fracamente a ativação da NADPH oxidase, quando comparados com os MC-A.

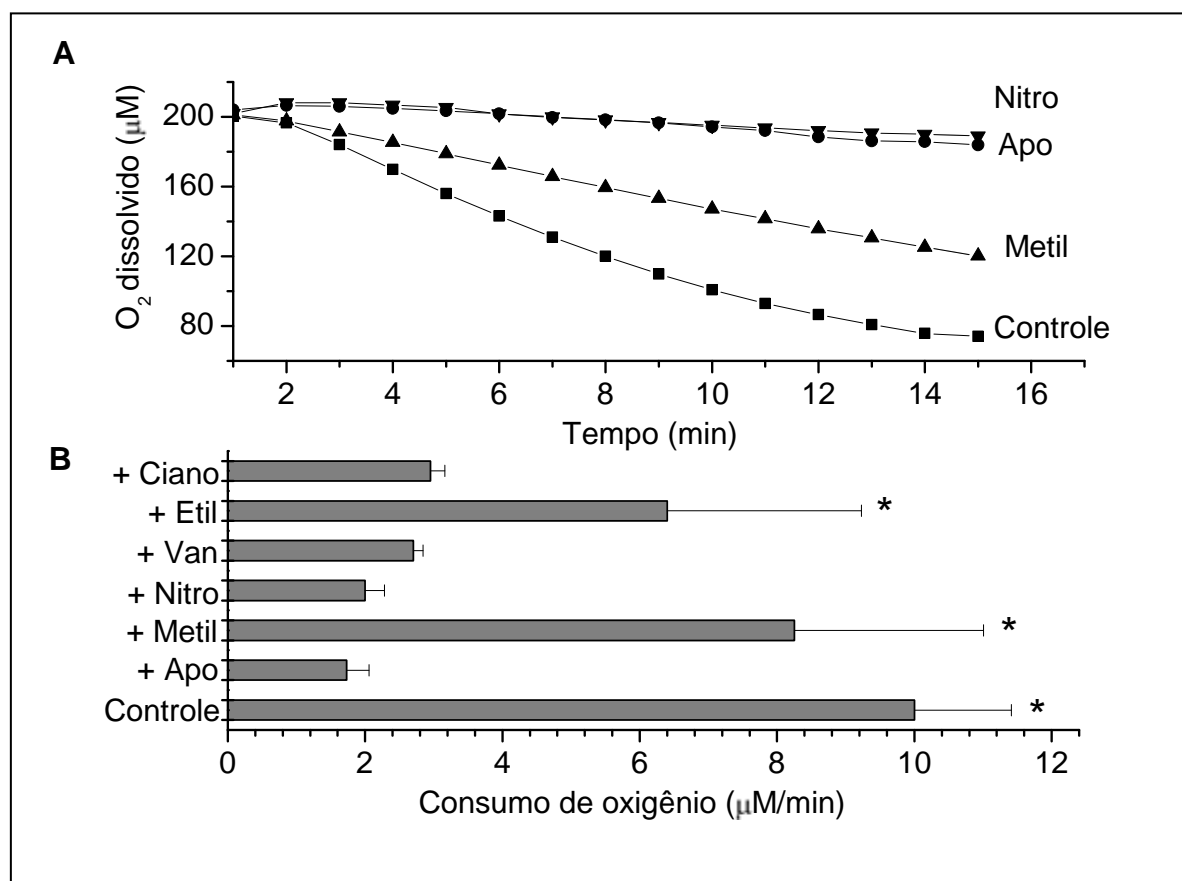
**Tabela 2:** Potência relativa dos metóxi-catecóis como inibidores da ativação da NADPH oxidase.

Metóxi-catecol	IC 50
Apocinina	8,0 ± 3,0
Vanilina	7,6 ± 1,0
4-nitroguaiacol	17,7 ± 1,1 *
4-cianoguaiacol	10,9 ± 2,9
4-metilguaiacol	78,0 ± 10,0 *
4-etilguaiacol	155,1 ± 7,0 *

A mistura de reação continha neutrófilos ( $2 \times 10^6$ /mL), lucigenina ( $10 \mu\text{M}$ ), zymosan opsonizado (1mg/mL) e os diferentes metóxi-catecóis. A quimiluminescência foi avaliada no luminômetro Centro 960 (Berthold Technologies, Alemanha). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados representam média  $\pm$  SEM de três experimentos diferentes. \* $p < 0,05$  em relação ao experimento em que foi utilizada apocinina (A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA e teste de Dunnett para múltipla comparação).

## 4.2 Consumo de oxigênio por neutrófilos ativados

Para confirmar os resultados anteriores, realizamos experimentos em que a potência dos metóxi-catecóis foi estudada quanto à ação direta sobre o consumo de oxigênio de neutrófilos estimulados. Este ensaio possibilita uma medida direta da ativação da NADPH oxidase, uma vez que quando as células são estimuladas e há a agregação do complexo enzimático, há consumo de oxigênio, com formação de ânion superóxido. Do mesmo modo que no experimento anterior, os MC-D – 4-etilguaiacol e 4-metilguaiacol – foram menos efetivos na prevenção da ativação celular e, conseqüentemente, no consumo de oxigênio que os MC-A (Figura 5).



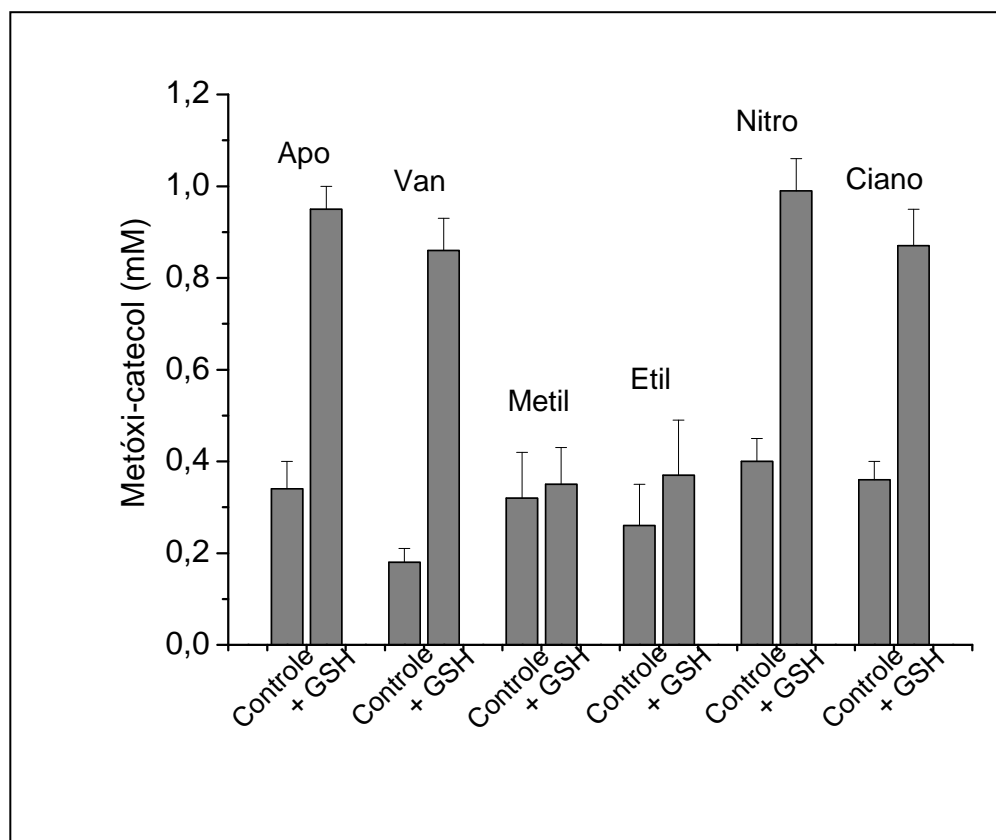
**Figura 5:** Potência relativa dos metóxi-catecóis como inibidores da ativação da NADPH oxidase quantificada através do consumo de oxigênio. A mistura de reação continha neutrófilos ( $4 \times 10^6$ /mL), zymosan opsonizado (1mg/mL) e os metóxi-catecóis (2mM). A: Traçado típico do consumo de oxigênio na presença ou ausência dos metóxi-catecóis. B: Inibição do consumo de oxigênio pelos metóxi-catecóis. \* $p < 0,05$  em relação ao experimento em que apocinina estava presente (A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA e teste de Dunnett para múltipla comparação).

### **4.3 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) da oxidação dos metóxi-catecóis catalisada por MPO e o efeito de GSH**

Sabendo-se que, a presença de grupo aceptor ou doador de elétrons no anel aromático de compostos fenólicos, tem influência direta no seu potencial de redução e afeta suas características como inibidores da liberação de EROs pelo complexo NADPH oxidase, estudamos a reatividade dos metóxi-catecóis com peroxidase e o efeito da adição de GSH. Este estudo teve como base o fato de que a apocinina causa a depleção de GSH intracelular (BARBIERI, et al., 2004).

Após a incubação dos metóxi-catecóis com  $H_2O_2$  e MPO, na presença ou não de GSH, a concentração remanescente dos metóxi-catecóis foi quantificada por HPLC. A Figura 6 mostra que todos os MC foram prontamente oxidados pelo sistema MPO/ $H_2O_2$ . No entanto, quando a oxidação dos compostos foi realizada na presença de GSH, os resultados foram diferentes: os MC-A tiveram sua oxidação prevenida, enquanto que, com os MC-D isso não ocorreu. Como GSH é um substrato pobre para MPO e, portanto, não deve competir com os compostos fenólicos (TIEN, 1999; PICHORNER, et al., 1995), estes resultados indicam que a GSH é capaz de reciclar os metóxi-catecóis, reduzindo os radicais gerados durante a oxidação dos derivados aceptores de elétrons, mas não dos doadores de elétrons.



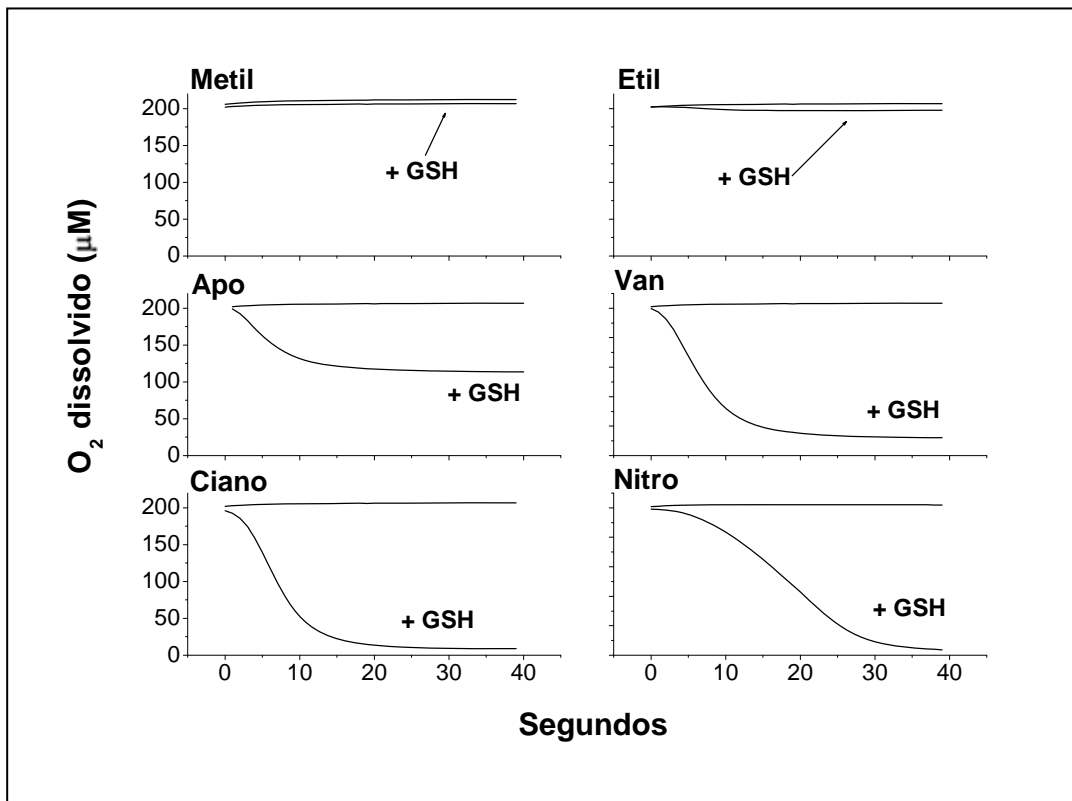


**Figura 6:** O efeito de GSH na oxidação dos metóxi-catecóis catalisada pela MPO. Os substratos (1mM) foram incubados durante 10min a 25°C em tampão fosfato pH7,0, contendo MPO 0,5 $\mu$ M, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5mM (controles) e na presença de GSH. A reação foi iniciada pela adição de peróxido de hidrogênio. A concentração remanescente de metóxi-catecóis foi avaliada por HPLC. Dados representativos de, pelo menos, três experimentos.

#### **4.4 Consumo de oxigênio durante a oxidação dos metóxi-catecóis catalisada pela MPO**

Os resultados anteriores foram confirmados através da quantificação de GSH, como pode ser visto adiante, e do envolvimento do radical glutationila ( $GS^\bullet$ ) durante as reações. A geração do radical  $GS^\bullet$  durante a oxidação dos metóxi-catecóis por MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi avaliada através do ensaio de consumo de oxigênio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1988). Quando GSH é adicionada ao meio de reação, há formação de radicais  $GS^\bullet$  que são capazes de iniciar um processo de redução de oxigênio molecular, que pode ser evidenciado pelo seu consumo (PICHORNER, et al., 1995).

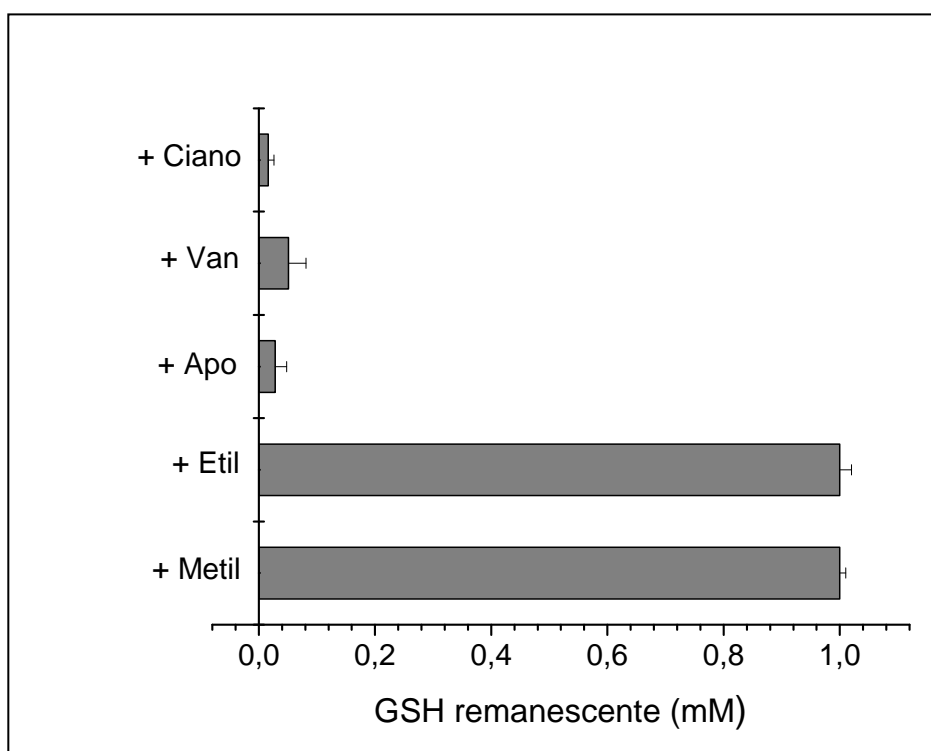
A Figura 7 mostra o consumo de oxigênio provocado pela adição de GSH durante a oxidação dos metóxi-catecóis. A ausência de qualquer um dos reagentes foi usada como controle e não provocou consumo de oxigênio (não mostrado). Confirmando os experimentos anteriores, somente o grupo dos metóxi-catecóis portadores de grupos aceptores de elétrons causou consumo de oxigênio, o que comprova a formação de  $GS^\bullet$ .



**Figura 7:** Consumo de oxigênio durante a oxidação dos metóxi-catecóis. Os compostos (1mM) foram incubados a 25°C em tampão fosfato 50mM pH7,0, contendo MPO 0,5 $\mu M$  e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5mM na presença ou ausência de GSH 1mM. Deu-se início à reação com adição de peróxido de hidrogênio. Para garantir a presença de oxigênio no meio, a solução tampão foi equilibrada deixando-se a cubeta aberta e sob agitação por 5 min. Gráfico representativo de, pelo menos, três experimentos.

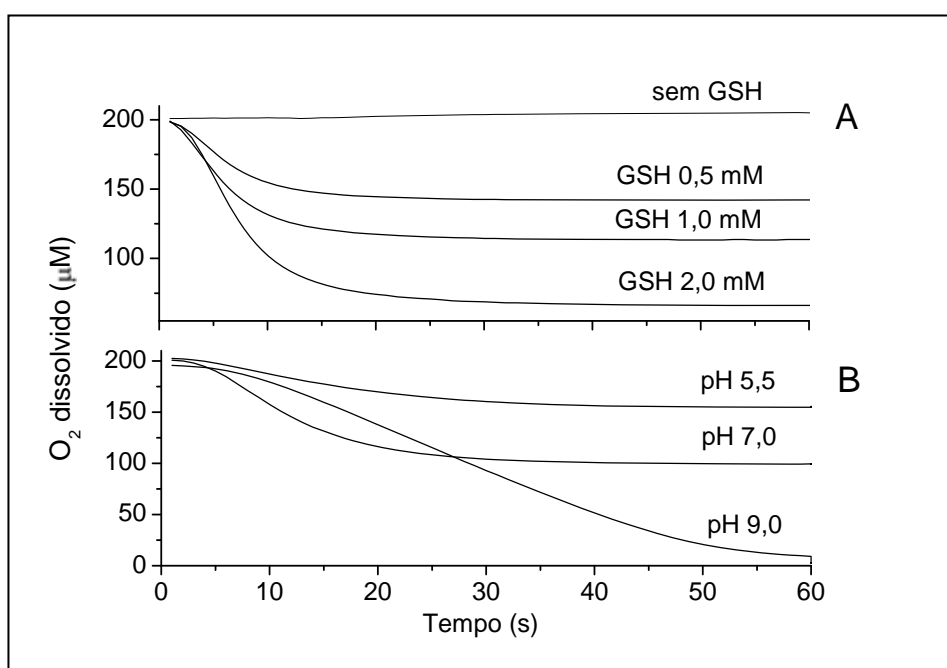
#### 4.5 Depleção de GSH durante a oxidação dos metóxi-catecóis

Complementando os experimentos anteriores, a concentração remanescente de GSH foi quantificada pela técnica de redução de DTNB. Resultados compatíveis e esperados foram observados, ou seja, somente durante a oxidação dos MC-A, houve consumo de GSH (Figura 8). A explicação reside no fato de que os radicais de MC-A, mas não de MC-D, foram capazes de oxidar a GSH.

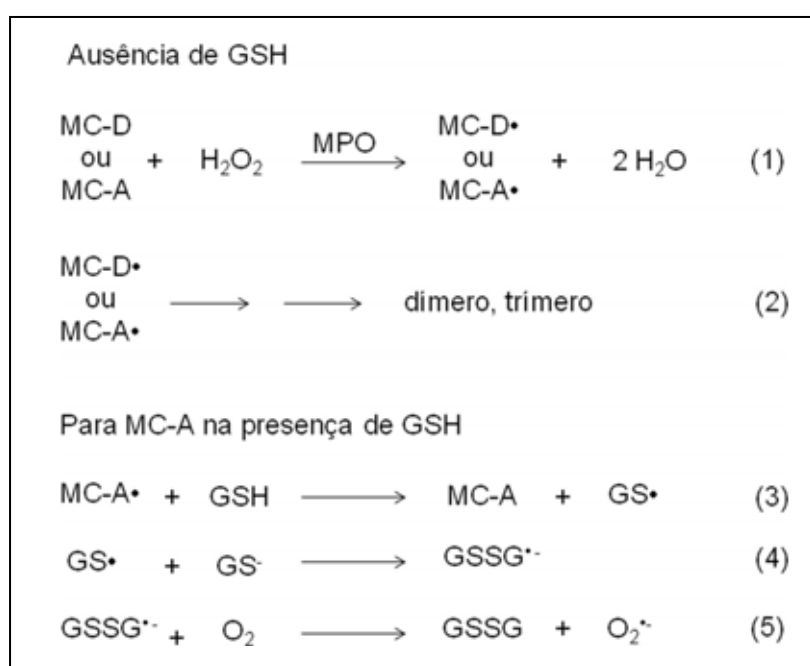


**Figura 8:** Oxidação de GSH durante a oxidação catalisada por MPO dos metóxi-catecóis. Os metóxi-catecóis (1mM) foram incubados por 2min a 25°C em tampão fosfato 50mM, pH7,0, contendo MPO 0,5 $\mu$ M, peróxido de hidrogênio 0,5mM e GSH 1mM. A concentração de GSH foi quantificada pelo método do DTNB, removendo-se alíquotas da solução após adição de catalase (20 $\mu$ g/mL) para interromper a reação. O derivado contendo grupamento nitro não foi utilizado neste ensaio, pois sua absorvância interfere com o ensaio do DTNB. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas.

Para reforçar ainda mais a proposta do envolvimento de  $GS^{\bullet}$  durante a oxidação dos MC-A catalisada pela MPO, o efeito do pH e da concentração de GSH foram estudados quanto à influência no consumo de oxigênio. A Figura 9 mostra que o pH alcalino aumenta a eficiência da reação de consumo de oxigênio por favorecer a geração do ânion glutationila ( $GS^-$ ) a partir de GSH e sua reação com  $GS^{\bullet}$ , com formação de  $GSSG^{\bullet-}$  (Figura 10, reação 4), que por sua vez, reage com oxigênio. De modo semelhante, uma alta concentração de GSH favorece a formação de  $GS^{\bullet}$  (Figura 10, reação 3), em detrimento da dimerização (Figura 10, reação 2).



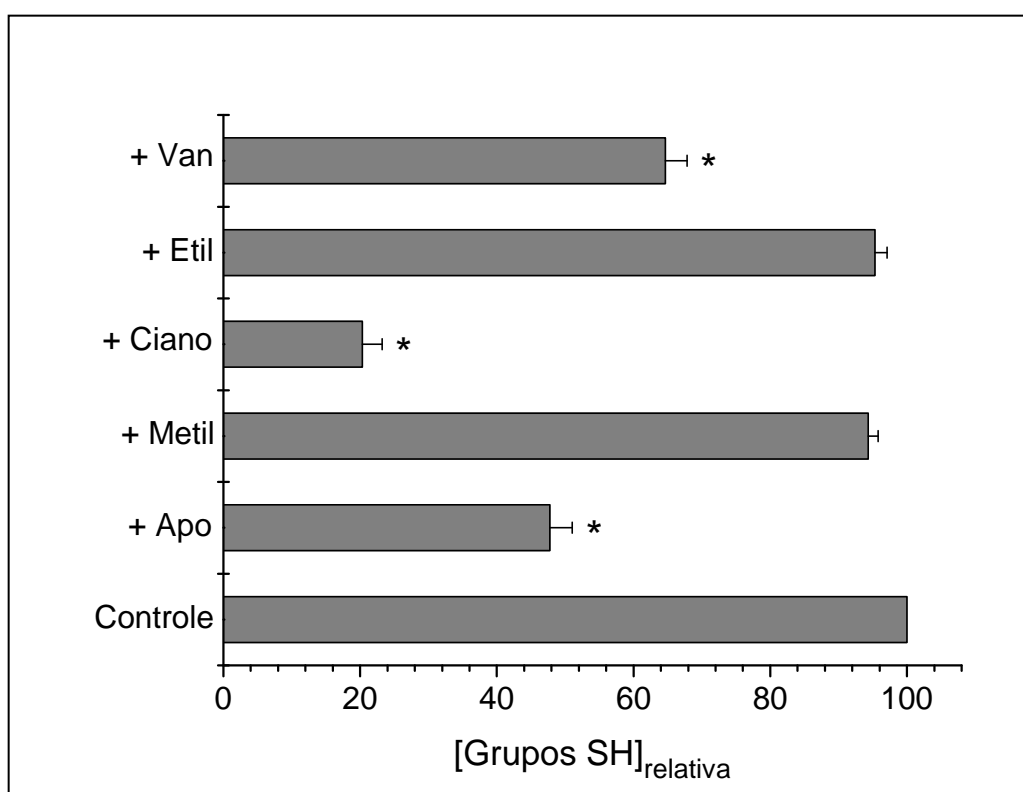
**Figura 9:** Efeito da concentração de GSH e do pH na eficiência do consumo de oxigênio durante a oxidação de apocinina. A: Apocinina 1mM foi incubada a 25°C em tampão fosfato 50mM pH 7,0, contendo MPO 0,5μM e peróxido de hidrogênio 0,5mM na presença ou ausência de GSH. B: Manteve-se constante a concentração de GSH (1mM) e variou-se o pH. As reações foram iniciadas pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A solução tampão foi previamente saturada com ar (200mM) deixando-se a cubeta aberta por 5 min. Os dados representam pelo menos, três experimentos.



**Figura 10:** Esquema proposto para o envolvimento de GSH durante a oxidação catalisada por MPO de metóxi-catecóis. Metóxi-catecóis doadores de elétrons (MC-D) e metóxi-catecóis aceptores de elétrons (MC-A).

#### 4.6 Depleção de grupamentos SH de ovalbumina durante a oxidação de orto-metóxi-catecóis

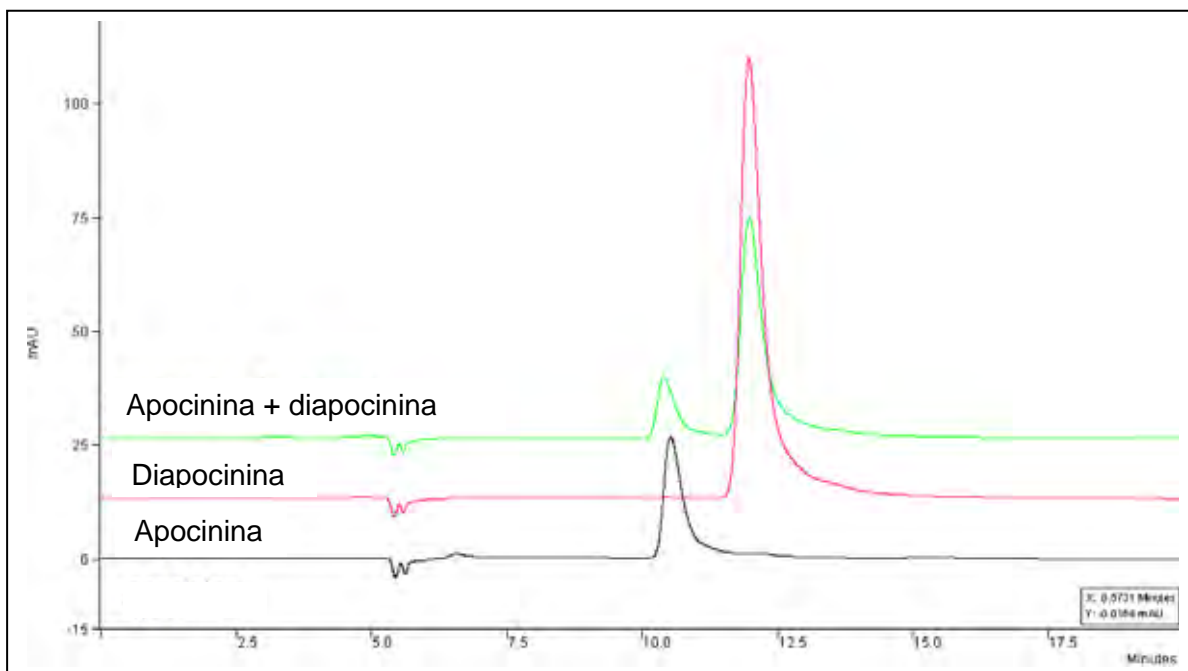
A capacidade dos radicais formados, após a oxidação dos metóxi-catecóis portadores de grupos aceptores de elétrons, em reagir com compostos tiólicos, foi enfatizada pela reação com resíduos SH (aminoácidos cisteína) em proteínas, aqui representadas pela ovalbumina. Esta proteína foi usada como modelo para se mostrar a capacidade dos metóxi-catecóis em oxidar grupamentos sulfidrila de proteínas (Figura 11). Os compostos foram incubados com ovalbumina 0,1% na presença de MPO e peróxido de hidrogênio, então a quantidade relativa de grupamentos SH reduzidos foi quantificada utilizando-se o método do DTNB.



**Figura 11:** Oxidação de grupos SH de ovalbumina durante a oxidação de metóxi-catecóis catalisada por MPO. Os metóxi-catecóis (1mM) foram incubados durante 10 min a temperatura ambiente com a solução de albumina 0,1%, MPO 0,5 $\mu$ M e peróxido de hidrogênio 0,5mM. A concentração de grupos SH remanescentes foi avaliada pelo método de Ellman's adaptado. O derivado portador de grupamento nitro não foi utilizado, pois sua absorvância interfere com o ensaio do DTNB. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de ensaios realizados em triplicata. \* $p < 0,05$  em relação ao controle. A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA seguido de teste de Dunnett para múltipla comparação.

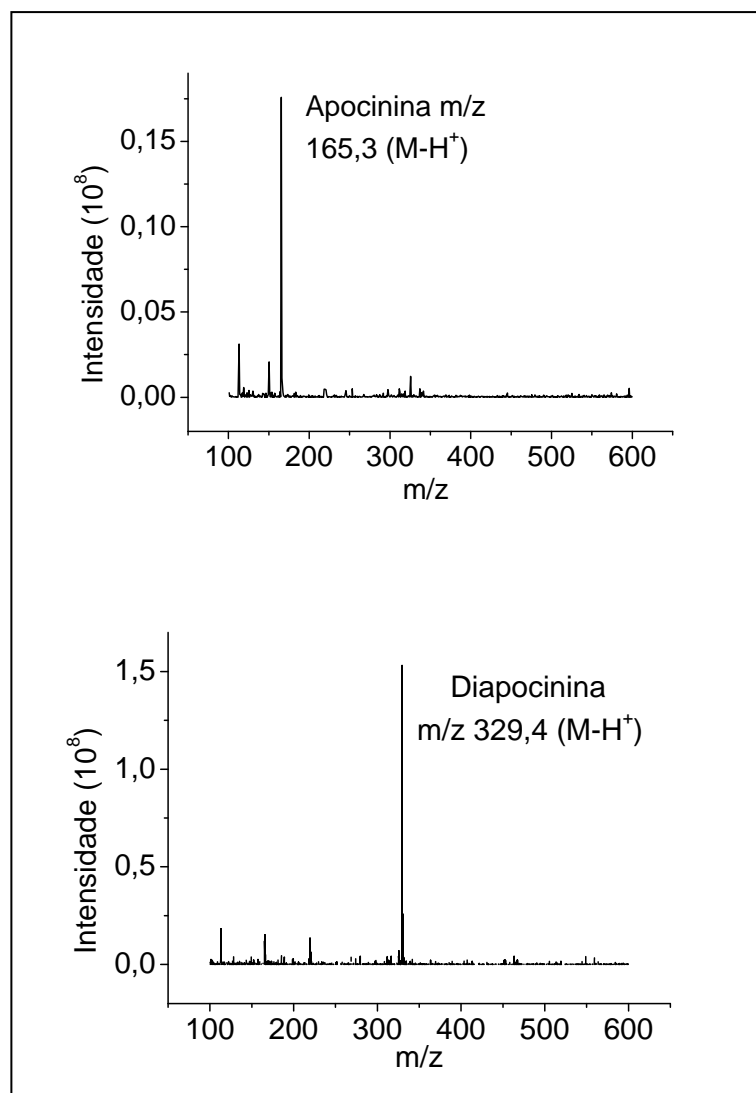
#### 4.7 Síntese e análise de diapocinina

O dímero da apocinina, ou diapocinina, foi sintetizado segundo Luchtefeld et al. (2008) e a identificação inicial realizada por HPLC (Figura 12). Após a separação, a identificação foi feita por espectrometria de massa (Figura 13).



**Figura 12:** Identificação da diapocinina por HPLC (Varian ProStar e detector UV-Vis ajustado para 254nm), análise em modo isocrático utilizando-se coluna de fase reversa C18 (coluna Luna<sup>®</sup>, Phenomenex<sup>®</sup> com as seguintes dimensões 250 X 4,6 mm, 5µm). A fase móvel composta de solução aquosa de acetato de amônio 0,31%:metanol nas proporções 52:48 (v/v) e fluxo de 1,0mL/min.



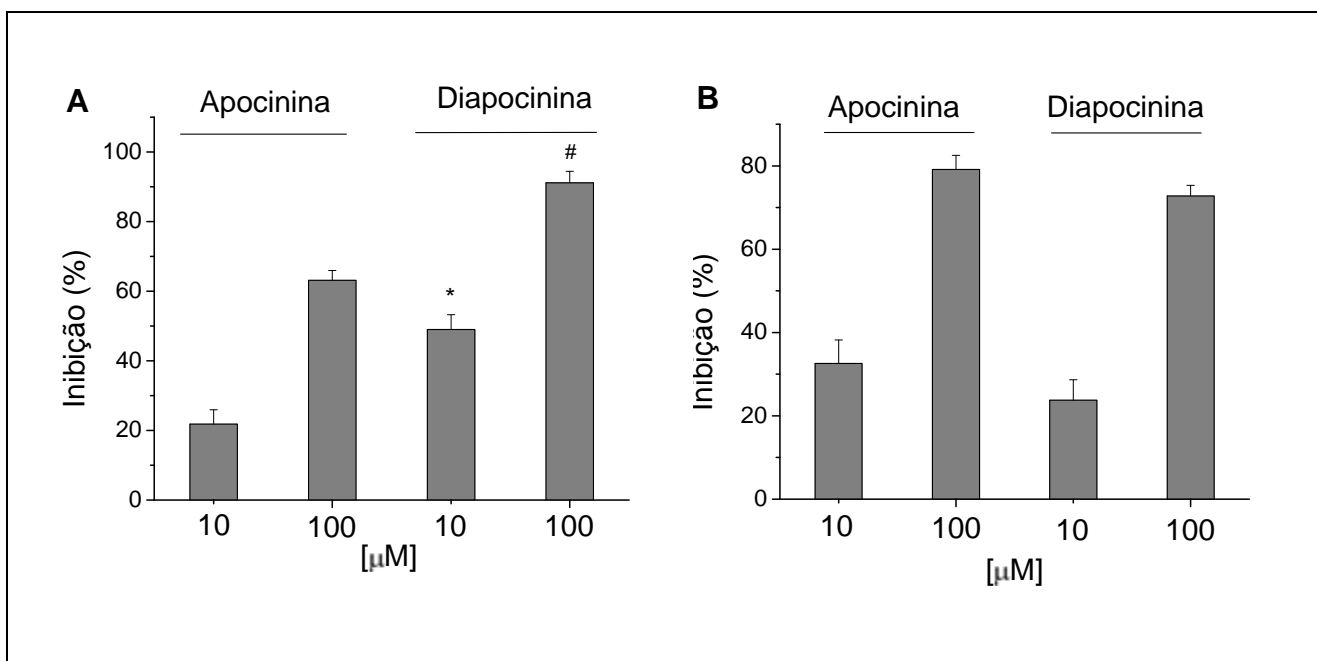


**Figura 13:** Identificação da diapocinina por espectrometria de massa. A amostra purificada foi infundida diretamente no espectrômetro (Quattro II Micro™, triplo quadrupolo, Micromass, Manchester, Reino Unido) equipado com uma fonte de ionização do tipo electrospray. O equipamento foi operado com ionização no modo negativo, na faixa de relação massa/carga 150–500 m/z. A voltagem aplicada na geração do spray foi de 4,5kV, a temperatura do capilar ajustada para 150°C e o fluxo do gás de dessolvatação ajustado para 300L/h.

#### 4.8 Ensaio quimiluminescente dependente de lucigenina – efeitos da apocinina e do dímero de apocinina em neutrófilos e PBMC

Após a síntese da diapocinina, passamos aos experimentos em que buscávamos uma comparação do efeito das substâncias sobre o surto oxidativo de fagócitos estimulados.

Os neutrófilos e os leucócitos mononucleares (PBMC) isolados a partir de sangue total (Detalhes em Materiais e métodos, item 3.5) foram incubados por 10 min em PBS-D na presença de apocinina ou de seu dímero e estimulados com PMA (100nM). Como pode ser observado na Figura 14A, a diapocinina inibiu mais efetivamente a ativação da NADPH oxidase em PBMCs que a apocinina, o que por sua vez, não foi observado quando as células em estudo foram os neutrófilos (Figura 14B).

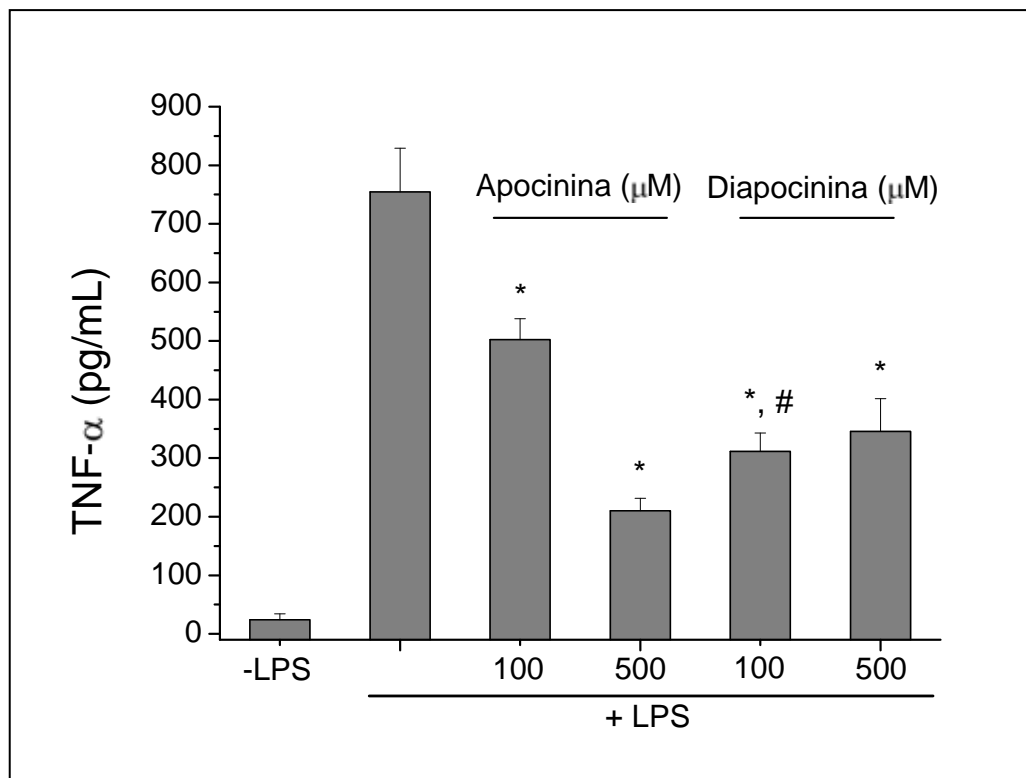


**Figura 14:** Inibição da quimiluminescência dependente de lucigenina. A reação foi composta de (A) PBMC ( $4 \times 10^6/\text{mL}$ ) e (B) neutrófilos ( $4 \times 10^6/\text{mL}$ ), lucigenina ( $10 \mu\text{M}$ ), PMA (100nM) e apocinina ou dímero de apocinina. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados representam média  $\pm$  SEM de quatro experimentos diferentes. \* $p < 0,05$  em relação ao experimento em que foi utilizada apocinina  $10 \mu\text{M}$ . # $p < 0,05$  em relação ao experimento em que foi utilizada apocinina  $100 \mu\text{M}$  (A análise estatística foi realizada utilizando-se Teste-t).

#### 4.9 Avaliação da liberação do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e de interleucina-10 (IL-10)

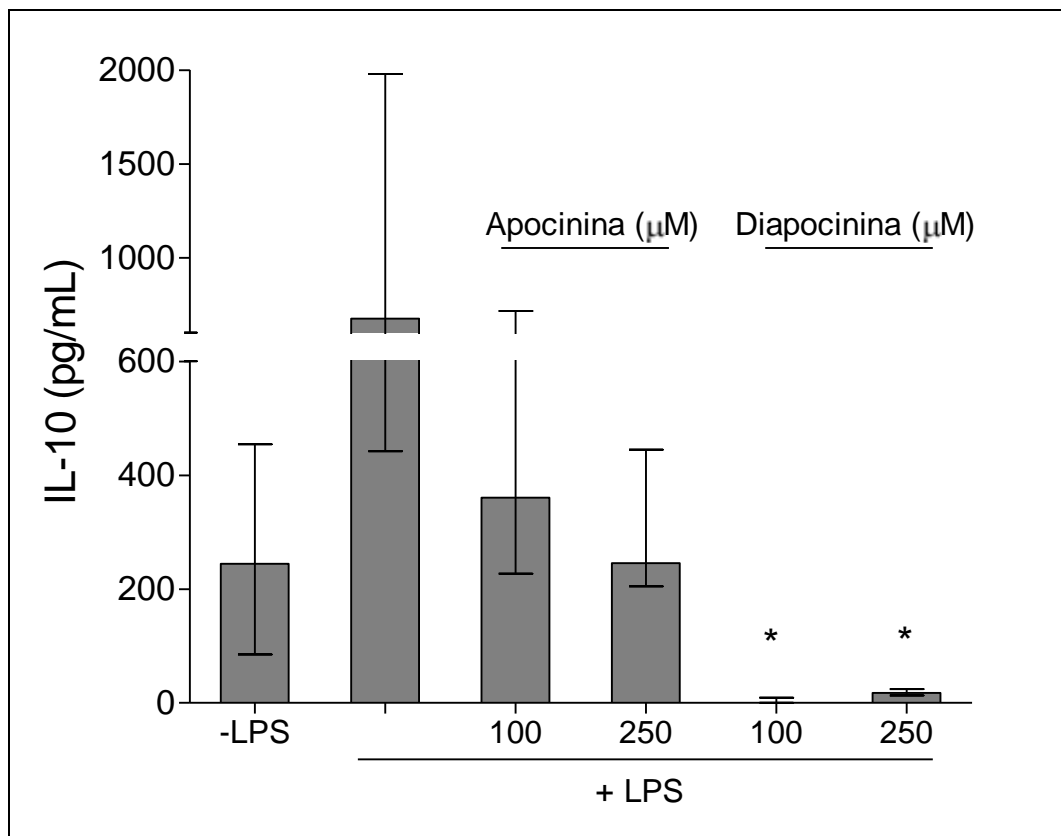
É conhecido que a apocinina é capaz de inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias (LAFEBER et al., 1999; MATTSSON et al., 1996). Assim, decidimos comparar o efeito da apocinina e do dímero sobre a liberação de TNF- $\alpha$  e de IL-10.

A estimulação dos PBMC com LPS (10 $\mu$ g/mL) aumentou significativamente a liberação de TNF- $\alpha$ , sendo que a presença de apocinina ou de dímero foi capaz de inibir significativamente esta liberação. O efeito da apocinina tende a um efeito dose-dependente, o que não foi observado quando o dímero foi adicionado à cultura de PBMC (Figura 15).



**Figura 15:** Inibição da liberação de TNF- $\alpha$  por PBMC estimulados por LPS 10 $\mu$ g/mL. Tanto apocinina como o dímero inibiram significativamente a liberação de TNF- $\alpha$  (\* $p$ <0,05 quando comparado ao controle estimulado com LPS). O dímero foi mais efetivo que a apocinina na concentração de 100 $\mu$ M (# $p$ <0,05 quando comparado a amostra com apocinina 100 $\mu$ M). Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados representam média  $\pm$  SEM de sete experimentos diferentes. A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA seguido de teste de Tukey para múltiplas comparações.

Como pode ser observado na Figura 16, do mesmo modo que com a liberação de TNF- $\alpha$ , o estímulo das células mononucleares periféricas com LPS, aumentou significativamente a liberação de IL-10, que foi suprimida significativamente pela adição de diapocinina. A maior concentração de apocinina (250 $\mu$ M) restabeleceu a liberação de IL-10 ao nível basal.

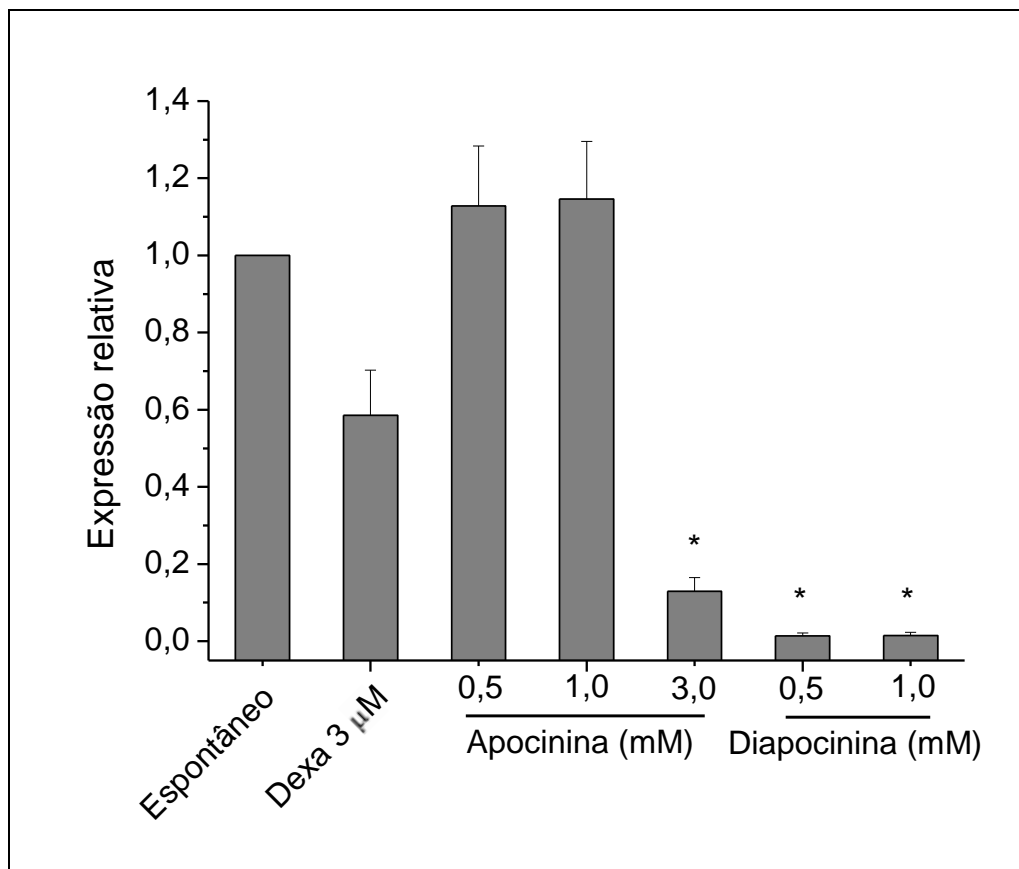


**Figura 16:** Inibição da liberação de IL-10 por PBMC estimulados por LPS 10 $\mu$ g/mL. A diapocinina inibiu significativamente a liberação de IL-10 (\* $p$ <0,05 quando comparado ao controle estimulado com LPS). Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados representam mediana e interquartil de 10 experimentos diferentes. A análise estatística foi realizada utilizando-se a Análise de Variância de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn para múltipla comparação).

#### 4.10 Expressão gênica de gp91<sup>phox</sup> - Reação em cadeia da polimerase em tempo real (real-time PCR)

A apocinina é um conhecido inibidor da NADPH oxidase de células fagocíticas. Assim, investigamos se a apocinina apresentava alguma ação sobre a expressão gênica do componente de membrana gp91<sup>phox</sup> e comparamos com o efeito do dímero de apocinina.

Como se observa na Figura 17, somente na maior concentração estudada (3mM), a apocinina foi capaz de diminuir a expressão de gp91<sup>phox</sup>. Já o dímero apresentou efeito inibitório sobre a expressão gênica, em ambas as concentrações estudadas (0,5 e 1,0mM).



**Figura 17:** Expressão de gp91<sup>phox</sup> em PBMC. Dexametasona 3µM foi utilizada como controle da inibição da expressão gênica. (\*p<0,05 em relação ao controle espontâneo). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados representam média ± SEM de cinco experimentos diferentes. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn.

## **5 DISCUSSÃO**

## 5 Discussão

Este trabalho pode ser dividido em duas etapas: a primeira consistiu no estudo dos metóxi-catecóis como inibidores da NADPH oxidase, sua interação com glutatona e com grupamentos sulfidrilas de proteínas e como isso poderia afetar seu poder inibitório. A segunda etapa consistiu na síntese da diapocinina e na comparação de seu efeito com o da apocinina em neutrófilos e PBMC estimulados, em relação à inibição do surto oxidativo e quanto à liberação de citocinas e expressão do componente de membrana gp91<sup>phox</sup> em PBMC estimulados por LPS.

### 5.1 Proposta de mecanismo de ação da apocinina por meio de sua capacidade em oxidar grupos tióis

Um grande número de antioxidantes de origem natural é capaz de agir como *scavenger* de EROs, no entanto, estes compostos são em sua maioria, inespecíficos e não são capazes de inibir a ativação da NADPH oxidase. A apocinina parece ser exceção nesta gama de compostos, pois é um antioxidante menos potente que a quercetina, resveratrol e curcumina (GUZIK & HARRISON, 2006), mas entre as substâncias de origem natural, se destaca por sua capacidade em inibir o complexo NADPH oxidase.

O uso da apocinina baseia-se em sua capacidade de inibir a translocação da p47<sup>phox</sup> para a membrana, impedindo assim, a ativação enzimática (BARBIERI et al., 2004). Esta mesma propriedade já foi descrita para outras substâncias como *N*-etilmaleimida e produtos de oxidação do 1-naftol, que geram quinonas eletrofílicas capazes de conjugar com resíduos tióis da p47<sup>phox</sup>, através da reação de adição de Michael (CLARK et al., 1990, HART et al., 1990). Esta reação, no entanto, não ocorre com a apocinina, uma vez que, um trabalho recente do nosso grupo

encontrou resultados semelhantes aos de Johnson e colaboradores, ou seja, a apocinina ou o dímero resultante de sua oxidação não conjugam com GSH (JOHNSON et al., 2002, XIMENES et al., 2007). Além disso, foi demonstrado que o radical de apocinina, gerado durante sua oxidação catalisada pela peroxidase, é capaz de oxidar compostos tiólicos. Com base neste resultado, foi proposto que este poderia ser o modo de interação da apocinina com resíduos tióis da subunidade citosólica da NADPH oxidase e a conseqüente inibição da ativação da mesma (XIMENES et al., 2007). Alguns trabalhos reforçam esta hipótese, entre eles: a apocinina diminuiu acentuadamente a razão glutatona reduzida/ glutatona oxidada (GSH/GSSG) em monócitos estimulados (BARBIERI et al., 2004) e a adição de  $\beta$ -mercaptoetanol foi capaz de prevenir o efeito inibitório da apocinina em neutrófilos estimulados (STOLK et al., 1994).

Os resultados aqui obtidos reforçam as evidências de que o modo de ação da apocinina possa estar ligado à sua capacidade em oxidar grupos tióis. De fato, foi possível verificar uma relação direta entre esta propriedade pró-oxidante de alguns metóxi-catecóis com a sua potência relativa como inibidores da ativação do complexo NADPH oxidase; ou seja, os metóxi-catecóis portadores de grupos doadores de elétrons (MC-D), que não foram capazes de oxidar GSH ou resíduos de cisteína da ovalbumina durante a reação de oxidação pela MPO, também se apresentaram como fracos inibidores do complexo multienzimático. Acreditamos que a baixa eficiência dos MC-D se deva ao seu baixo potencial de redução, quando comparados aos MC-A (AM BUSCH et al., 2005). Deste modo, os radicais dos MC-D não são capazes de oxidar grupos SH essenciais à NADPH oxidase. Reforçando nossa hipótese, somente flavonóides com potencial de redução maior que 850mV (potencial de redução do par  $GS^-/GS^{\cdot}$ ) foram capazes de oxidar GSH quando se



estudou a sua capacidade de gerar ânion superóxido, via GS<sup>•</sup> (radical glutationila), durante a oxidação catalisada por HRP (*horseradish peroxidase*) (GALATI et al., 1999). Nossos resultados demonstram claramente, que tanto GSH como resíduos de cisteína da ovalbumina reduziram os radicais gerados durante a oxidação dos MC-A, mas não dos MC-D; ou seja, a diminuição do potencial de redução causada pelo grupo doador de elétrons adicional, impediu a ação dos MC-D como inibidores da NADPH oxidase.

Sugerimos, portanto, que a capacidade da apocinina e dos metóxi-catecóis análogos em inibir a agregação do complexo NADPH oxidase deve estar relacionada à oxidação de grupos SH essenciais à fração citosólica da NOX e esta propriedade é dependente da oxidação da molécula da apocinina (JOHNSON et al., 2002).

Considerando que todos os metóxi-catecóis estudados são moléculas muito semelhantes no que se refere à lipossolubilidade, a diferença na capacidade de inibir a enzima não está relacionada à permeabilidade celular. Do mesmo modo, não houve diferença quanto à reatividade com peroxidase, um critério importante para a ação da apocinina como inibidor da NADPH oxidase. Assim, a única diferença entre os compostos estudados é o baixo potencial de redução dos MC-D (etil e metil), o que os torna incapazes de oxidar grupamentos SH. Consideramos que esta propriedade deve ser considerada no desenvolvimento de novos e específicos inibidores da NADPH oxidase.

## **5.2 Apocinina versus diapocinina como inibidores pré e pós-transcricionais**

Apesar das evidências e de seu extenso uso como inibidor da NADPH oxidase, o mecanismo de ação da apocinina não é totalmente conhecido (WILLIAMS & GRIENGLING, 2007). Existem controvérsias quanto à sua eficiência em células não fagocíticas, como células endoteliais e células musculares lisas, mas em fagócitos, os resultados encontrados são consistentes e devem-se, à presença de peroxidase (mieloperoxidase – MPO) (HEUMULLER et al., 2008). Como já citado anteriormente, esta enzima é capaz de oxidar a apocinina, gerando um produto dimérico, a diapocinina, que parece ser o real inibidor da NADPH oxidase (JOHNSON et al., 2002). Um estudo recente mostrou que a diapocinina inibiu a atividade da NADPH oxidase em células endoteliais de veias de cordão umbilical (HUVEC), de modo mais intenso que a apocinina. Por serem células não fagocíticas, estas células não possuem MPO (STEFFEN et al., 2008). Estes resultados sugerem que em células em que a MPO está ausente ou presente em baixa concentração, como nas HUVEC ou nos PBMC, respectivamente, a diapocinina é mais eficiente que a apocinina, pois não necessita de metabolização para exercer seu efeito na atividade da NOX. Estes dados confirmam nossos resultados, uma vez que, a diapocinina foi mais eficiente que a apocinina na inibição da liberação de superóxido por PBMC ativados, mas não em neutrófilos. Embora o ZO e o PMA estimulem a liberação de ânion superóxido através da ativação da NADPH oxidase, eles o fazem através de mecanismos distintos (McPHAIL & SNYDERMAN, 1983). O uso de ZO leva à liberação considerável de MPO dos grânulos celulares (NIESSEN et al., 1991), facilitando, portanto, a oxidação dos MC e sua ação como inibidores das NOX. Nesta etapa do trabalho, o objetivo era avaliar como a presença ou não de MPO afetaria a ação da

apocinina, assim, utilizamos o PMA como estímulo celular, de modo a não intensificar a liberação de MPO. Os PBMC possuem menos MPO que os neutrófilos (ARNHOLD, 2004) e isto poderia estar por trás de sua maior susceptibilidade à diapocinina se comparado à apocinina. Assim nossa proposta é de que os PBMC são mais susceptíveis à ação da diapocinina que os neutrófilos, pois estes últimos podem facilmente produzir diapocinina por meio da ação catalítica da MPO.

A apocinina é capaz não só de inibir a ativação da NOX, como também de suprimir a expressão de RNAm de  $p47^{phox}$  e de  $gp91^{phox}$  em aorta e rins de ratos tratados com aldosterona (PARK et al., 2008) e de aumentar o efeito inibitório da testosterona na expressão de RNAm da  $p47^{phox}$  em células THP-1 diferenciadas com PMA (JULIET et al., 2004). Aqui, verificamos que em concentrações relativamente elevadas de apocinina, foi possível inibir a expressão de RNAm de  $gp91^{phox}$  em PBMC; no entanto, com a diapocinina houve significativa inibição já em baixas concentrações. Estes resultados comprovam que estas substâncias, além de inibir a NADPH oxidase, também são capazes de inibir a expressão de seus componentes.

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina multifuncional, envolvida numa série de processos celulares, como sobrevivência, proliferação, diferenciação e morte celular. Também apresenta efeitos importantes em processos sistêmicos como o desenvolvimento corporal e imunidade e em processos patológicos como inflamação, progressão de tumores, rejeição a transplantes, artrite reumatóide e choque séptico (AGGARWAL, 2003). Observamos, que tanto a apocinina como a diapocinina inibiram a liberação de TNF- $\alpha$  por PBMC estimulados por LPS, entretanto, a diapocinina se mostrou mais eficiente que a apocinina na dose de 100 $\mu$ M. O TNF- $\alpha$  participa do processo de estresse oxidativo, através da ativação da NADPH oxidase em diferentes tipos celulares, incluindo plaquetas e

células musculares lisas de aorta humana (UNGVARI et al., 2003, ZHANG & WANG, 2006). A inibição da liberação desta citocina seria mais uma contribuição das drogas em estudo na inibição do processo oxidativo.

Em contradição com o que já foi descrito para células THP-1 diferenciadas (PERIANAYAGAM et al., 2005), a apocinina apresentou uma tendência na inibição da liberação de IL-10 por PBMC estimulados. Este efeito foi mais acentuado quando a substância em estudo foi a diapocinina. A IL-10 consiste numa citocina antiinflamatória e imunossupressora produzida por monócitos, macrófagos, células dendríticas, células B, células T CD8, células T regulatórias (Tregs), células Th1, e Th17 (O’GARRA & VIEIRA, 2007). Independente da fonte celular, a função principal da IL-10 consiste na contenção e na supressão da resposta inflamatória por meio da inibição da expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias (IL-12) e outros mediadores solúveis, comprometendo, deste modo, a manutenção da inflamação. Apesar de o sistema imune ser especializado e altamente eficiente, alguns patógenos desenvolveram a habilidade de explorá-lo para seu próprio benefício, tornando-se capazes de persistir no organismo hospedeiro, levando à infecção crônica; podendo causar conseqüências graves como imunodeficiência, câncer e morte (MAYNARD & WEAVER, 2008). Tentativas de elucidar as causas do enfraquecimento da imunidade antiviral apontam para o papel da citocina imunomodulatória IL-10, como agente da persistência deste microorganismo. A indução da produção, pelo hospedeiro, de IL-10, durante a infecção crônica, parece ser um dos meios utilizados pelos vírus para alterar a classe da resposta imune antiviral e induzir supressão imune generalizada (FILIPPI & VON HERRATH, 2008). Trabalhos recentes mostram que é possível ressuscitar a imunidade aos vírus, interferindo com a via de sinalização da IL-10 (EJRNAES et al.,

2006; BROOKS et al., 2006). Outrossim, moléculas homólogas à IL-10 são codificadas pelos genomas de diversos vírus e têm a função de se ligar aos receptores de IL-10, promovendo, deste modo, a inibição da resposta imune (FLEMING et al., 1997, KOTENKO et al., 2000, LOCKRIDGE et al., 2000, MOORE et al., 1990). Este fenômeno representa uma possível resposta adaptativa viral que visa à evasão do sistema imune (FILIPPI & VON HERRATH, 2008). A tendência da apocinina e o efeito inibitório marcante da diapocinina discordam dos efeitos dos antioxidantes clássicos, que mantêm os níveis de IL-10 durante as respostas inflamatórias (LI et al., 2009, NOVOSELOVA et al., 2009, YANG et al., 2008). A resposta inflamatória crônica, gerada por uma infecção viral, pode ser danosa ao organismo, dificultando sua cura e podendo até mesmo levar à morte. Assim, a apocinina e a diapocinina poderiam ser úteis em combater esta situação.

## **6 CONCLUSÕES**

## 6 Conclusões

- Os metóxi-catecóis portadores de grupos doadores de elétrons (MC-D) reagem fracamente com GSH e grupamentos sulfidríla de proteínas;
- Essa fraca reatividade relaciona-se diretamente com a capacidade de inibição do complexo NADPH oxidase, ou seja, os MC-D são inibidores menos eficientes que os MC portadores de grupos aceptores de elétrons;
- A diminuição do potencial de redução causada pelo grupo doador de elétrons adicional presente nos MC-D, leva a um decréscimo na sua ação como inibidores da NADPH oxidase;
- A diapocinina inibe a ativação da NADPH oxidase de modo mais eficiente que a apocinina em PBMC estimulados por PMA; no entanto, em neutrófilos, o efeito das duas substâncias é semelhante;
- Tanto a apocinina como a diapocinina inibem significativamente a liberação de TNF- $\alpha$ ;
- A diapocinina é capaz de inibir de forma intensa a liberação de IL-10;
- Somente na maior concentração estudada a apocinina inibiu a expressão de RNAm de gp91<sup>phox</sup>, entretanto, a diapocinina apresenta efeito inibitório acentuado nas duas concentrações estudadas.

## **7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## 7 Referências bibliográficas

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. *Imunologia celular e molecular*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 580p.

AGGARWAL, B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nat Rev Immunol**, v. 3(9), p. 745-56, 2003.

ALLEN, R.C. Phagocytic leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence: a kinetic approach to analysis. **Methods Enzymol**, v. 133, p. 449-93, 1986.

AM BUSCH, M.S., KNAPP, E.W. One-electron reduction potential for oxygen and sulfur-centered organic radicals in protic and aprotic solvents. **J Am Chem Soc**, v. 127, p. 15730–7, 2005.

ARNHOLD, J. Free radicals: friends or foe. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 69(1), p. 4-9, 2004.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v.93(5), p.1464-76, 1999.

BABIOR, B.M., COHEN, H.J. Measurement of neutrophil function: phagocytosis, degranulation, the respiratory burst and bacterial killing. In: CLINE, M.J. **Methods in hematology: leukocyte function**. New York: Churchill Livingstone, 1981. v. 13.

BARBIERI, S. S., CAVALCA V., ELIGINI, S., BRAMBILLA, M., CAIANI, A., TREMOLI, E., COLLI, S. Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms. **Free Radic Biol Med**, v.37(2), p.156-65, 2004.

BAUEROVA, K., BEZEK, S. Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. **Gen Physiol Biophys**, v.18, p.15–20, 1999.

BEDARD, K., KRAUSE, H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol Rev**, v.87(1), p.245-313, 2007.

BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scand J Clin Lab Invest Suppl**, v.97, p.77-89, 1968.

BRESTEL, E.P. Co-oxidation of luminol by hypochlorite and hydrogen peroxide implications for neutrophil chemiluminescence. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 126, p. 482-88, 1985.

BROOKS, D.G., TRIFILO, M.J., EDELMANN, K.H., TEYTON, L., MCGAVERN, D.B., OLDSTONE, M.B. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. **Nat Med**, v. 12(11), p. 1301-9, 2006.

CAI, H., GRIENGLING, K.K., HARRISON, D.G. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. **Trends Pharmacol Sci**, v. 24, p. 471-478, 2003.

CAVE, A., GRIEVE, D., JOHAR, S., ZHANG, M., SHAH, A.M. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in cardiac pathophysiology. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.360(1464), p.2327-34, 2005.

CHENEVIER-GOBEAUX, C., LEMARECHAL, H., BONNEFONT-ROUSSELOT, D., POIRAUDEAU, S., EKINDJIAN, O.G., BORDERIE, D. Superoxide production and NADPH oxidase expression in human rheumatoid synovial cells: regulation by interleukin-1b and tumour necrosis factor-a. **Inflamm Res**, v. 55, p. 483-90, 2006.

CLARK, R.A., VOLPP, B.D., LEIDAL, H.G., NAUSEEF, W.M. Two cytosolic components of the human neutrophil respiratory burst oxidase translocate to the plasma membrane during cell activation. **J Clin Invest**, v. 85, p. 714–21, 1990.

CONDINO-NETO, A., WHITNEY, C., NEWBURGUER, P.E. Dexamethasone but not indomethacin inhibits human phagocyte nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity by down-regulating expression of genes encoding oxidase components. **J Immunol**, v. 161(9), p. 4960-7, 1998.

COSTA, C.A., AMARAL, T.A., CARVALHO, L.C., OGNIBENE, D.T., DA SILVA, A.F., MOSS, M.B., VALENÇA, S.S., DE MOURA, R.S., RESENDE, A.C. Antioxidant treatment with tempol and apocynin prevents endothelial dysfunction and development of renovascular hypertension. **Am J Hypertens**, v. 22(12), p. 1242-9, 2009.

DODD-O, J. M., WELSH, L. E., SALAZAR, J.D., WALINSKY, P.L., PECK, E.A., SHAKE, J.G., CAPARRELLI, D.J., ZIEGELSTEIN, R.C., ZWEIER, J.L., BAUMGARTNER, W.A., PEARSE, D.B. Effect of NADPH oxidase inhibition on cardiopulmonary bypass-induced lung injury. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.287(2), p.H927-36, 2004.

EJRNAES, M., FILIPPI, C.M., MARTINIC, M.M., LING, E.M., TOGHER, L.M., CROTTY, S., VON HERRATH, M.G. Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. **J Exp Med**, v. 203(11), p. 2461-72, 2006.

EL-BENNA, J., DANG, P.M., GOUGEROT-POCIDALO, M.A., ELBIM, C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v.53(3), p.199-206, 2005.

ENGLISH, D., ANDERSEN, B. R. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. **J Immunol Methods**, v.5(3), p.249-52, 1974.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. In: BEUTLER, E.; LICHTMAN, M.A.; KAUSHANSKY, K.; KIPPS, T.J.;

PRCHAL, J.T.; SELIGSOHN, U. (Ed.) **Williams Hematology**. 7<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill, 2006. p. 224.

FEARON, I.M., FAUX, S.P. Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight. **J Mol Cell Cardiol**, v. 47(3), p. 372-81, 2009.

FILIPPI, C.M., VON HERRATH, M.G. IL-10 and the resolution of infections. **J Pathol**, v. 214(2), p. 224-30, 2008.

FLEMING, S.B., MCCAUGHAN, C.A., ANDREWS, A.E., NASH, A.D., MERCER, A.A. A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus. **J Virol**, v. 71(6), p. 4857-61, 1997.

GALATI, G., CHAN, T., WU, B., O'BRIEN, P.J. Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase catalyzed redox cycling of flavonoids. **Chem Res Toxicol**, v.12, p. 521-5, 1999.

GROEMPING, Y., RITTINGER, K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. **Biochem J**, v. 386, p. 401-16, 2005.

GROTE, K., ORTMANN, M., SALGUERO, G., DOERRIES, C., LANDMESSER, U., LUCHTEFELD, M., BRANDES, R.P., GWINNER, W., TSCHERNIG, T., BRABANT, E.G., KLOS, A., SCHAEFER, A., DREXLER, H., SCHIEFFER, B. Critical role for p47phox in renin-angiotensin system activation and blood pressure regulation. **Cardiovasc Res**, v.71(3), p.596-605, 2006.

GUZIK, T.J., HARRINSON, D.G. Vascular NADPH oxidase as drug targets for novel antioxidant strategies. **Drug Discov Today**, v. 11, p. 524-33, 2006.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford University Press. 1988

HARMAN, D. Aging - A theory based on free-radical and radiation-chemistry. **J Gerontol**, v.11, p.298-300, 1956.

HART, B.A., SIMONS, J.M., RIJKERS, G.T., HOOGVLIET, J.C., VAN DIJK, H., LABADIE, R.P. Reaction products of 1-naphthol with reactive oxygen species prevent NADPH oxidase activation inactivated human neutrophils, but leave phagocytosis intact. **Free Radic Biol Med**, v. 8, p. 241-9, 1990.

HEUMÜLLER, S., WIND, S., BARBOSA-SICARD, E., SCHMIDT, H.H., BUSSE, R., SCHRÖDER, K., BRANDES, R.P. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. **Hypertension**, v. 51(2), p. 211-7, 2008.

INTENGAN, H.D., SCHIFFRIN, E.L. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation and fibrosis. **Hypertension**, v. 38, p. 581-87, 2001.

JOHNSON, D. K., SCHILLINGER, K. J., KWAIT, D.M., HUGHES, C.V., MCNAMARA, E.J., ISHMAEL, F., O'DONNELL, R.W., CHANG, M.M., HOGG, M.G.,

DORDICK, J.S., SANTHANAM, L., ZIEGLER, L.M., HOLLAND, J.A. Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. **Endothelium**, v.9, n.3, p.191-203, 2002.

JULIET, P.A.R., HAYASHI, T., DAIGO, S., MATSUI-HIRAI, H., MIYAZAKI, A., FUKATSU, A., FUNAMI, J., IGUSHI, A., IGNARRO, L.J. Combined effect of testosterone and apocynin on nitric oxide and superoxide production in PMA-differentiated THP-1 cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1693(3), p. 185-191, 2004.

JURKOWSKA, M., BERNATOWSKA, E., BAL, J. Genetic and biochemical background of chronic granulomatous disease. **Arch Immunol Ther Exp**, v.52(2), p.113-20, 2004.

KO, F. N., HSIAO, G., KUO, Y.H. Protection of oxidative hemolysis by demethyl-diisoeugenol in normal and beta-thalassemic red blood cells. **Free Radic Biol Med**, v.22, p.215-22, 1997.

KOTENKO, S.V., SACCANI, S., IZOTOVA, L.S., MIROCHNITCHENKO, O.V., PESTKA, S. Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 97(4), p. 1695-700, 2000.

LAFEBER, F. P., BEUKELMAN, C. J., VAN DEN WORM, E., VAN ROY, J.L., VIANEN, M.E., VAN ROON, J.A., VAN DIJK, H., BIJLSMA, J.W. Apocynin, a plant-derived, cartilage-saving drug, might be useful in the treatment of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 38(11), p.1088-93, 1999.

LAMBETH, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nat Rev Immunol**, v. 4, p. 181–189, 2004.

LI, H., GONG, X., ZHANG, L., ZHANG, Z., LUO, F., ZHOU, Q., CHEN, J., WAN, J. Madecassoside attenuates inflammatory response on collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. **Phytomedicine**, v. 16(6-7), p. 538-46, 2009.

LOCKRIDGE, K.M., ZHOU, S.S., KRAVITZ, R.H., JOHNSON, J.L., SAWAI, E.T., BLEWETT, E.L., BARRY, P.A. Primate cytomegaloviruses encode and express an IL-10-like protein. **Virology**, v. 268(2), p. 272-80, 2000.

LOJEK, A., KUBALA, L., CÍZOVÁ, H., CÍZ, M. A comparison of whole blood neutrophil chemiluminescence measured with cuvette and microtitre plate luminometers. **Luminescence**, v. 17(1), p. 1-4, 2002.

LUCHTEFELD, R., LUO, R., STINE, K., ALT, M.L., CHERNOVITZ, P.A., SMITH, R.E. Dose formulation and analysis of diapocynin. **J Agric Food Chem**, v.56(2), p.301-6, 2008.

MALDONADO, P.D., MOLINA-JIJÓN, E., VILLEDA-HERNANDEZ, J., GALVÁN-ARZATE, S., SANTAMARÍA, A., PEDRAZA-CHAVERRÍ, J. NADPH oxidase contributes to neurotoxicity in an excitotoxic/ prooxidant model of Huntington's

disease in rats: protective role of apocynin. **J Neurosci Res**, DOI: 10.1002/jnr.22240, 2009.

MARCH, J. **Advanced Organic Chemistry**. New York: John Wiley & Sons. 1982

MATTSSON, E., VAN DIJK, H., VAN KESSEL, K., VERHOEF, J., FLEER, A., ROLLOF, J. Intracellular pathways involved in tumor necrosis factor- $\alpha$  release by human monocytes on stimulation with lipopolysaccharide or staphylococcal peptidoglycan are partly similar. **J Infect Dis**, v.173(1), p.212-8, 1996.

MAYNARD, C.L., WEAVER, C.T. Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation. **Immunol Rev**, v. 226, p. 219-33, 2008.

McPHAIL, L.C., SNYDERMAN, R. Activation of respiratory burst enzyme in human polymorphonuclear leukocytes by chemoattractants and other soluble stimuli: evidence that the same oxidase is activated by different transductional mechanisms. **J Clin Invest**, v. 72, p. 192-200, 1983.

McINTYRE, M., BOHR, D.F., DOMINICZAK, A.F. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. **Hypertension**, v. 34, p. 53-45, 1999.

MOORE, K.W., VIEIRA, P., FIORENTINO, D.F., TROUNSTINE, M.L., KHAN, T.A., MOSMANN, T.R. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. **Science**, v. 248(4960), p. 1230-4, 1990.

MULVANI, M.J. Small artery remodeling in hypertension. **Curr Hypertens Rep**, v. 4, p. 49-55, 2002.

NIESSEN, H.W., KUIJPERS, T.W., ROOS, D., VERHOEVEN, A.J. Release of azurophilic granule contents in fMLP-stimulated neutrophils requires two activation signals, one of which is a rise in cytosolic free  $Ca^{2+}$ . **Cell Signal**, v. 3(6), p. 625-33, 1991.

NOVOSELOVA, E.G., LUNIN, S.M., NOVOSELOVA, T.V., KHRENOV, M.O., GLUSHKOVA, O.V., AVKHACHEVA, N.V., SAFRONOVA, V.G., FESENKO, E.E. Naturally occurring antioxidant nutrients reduce inflammatory response in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 615(1-3), p. 234-40, 2009.

O'GARRA, A., VIEIRA, P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. **Nat Rev Immunol**, v. 7(6), p. 425-8, 2007.

PARK, Y.M., LIM, B.H., TOUYZ, R.M., PARK, J.B. Expression of NADPH oxidase subunits and their contribution to cardiovascular damage in aldosterone/ salt-induced hypertensive rats. **J Korean Med Sci**, v. 23(6), p. 1039-45, 2008.

PERIANAYAGAM, M.C., MORENA, M., JABER, B.L., BALAKRISHNAN, V.S. Antioxidants reverse uraemia-induced down-regulation of mitochondrial membrane potential and interleukin-10 production. **Eur J Clin Invest.**, v. 35, p. 148-153, 2005.

PICHORNER, H., METODIEWA, D., WINTERBOURN, C.C. Generation of superoxide and tyrosine peroxide as a result of tyrosyl radical scavenging by glutathione. *Arch Biochem Biophys*, v.323(2), p.429-37, 1995.

QUINN, M.T., AMMONS, M.C., DELEO, F.R. The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction. *Clin Sci*, v. 111(1), p. 1-20, 2006.

REY, F.E., CIFUENTES, M.E., KIARASH, A., QUINN, M.T., PAGANO, P.J. Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O<sub>2</sub> and systolic blood pressure in mice. *Circ Res*, v. 89, p. 408–414, 2001.

ROSS, R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *New Eng J Med*, v. 340, p.904-13, 1999.

RUPIN, A., PAYSANT, J., SANSILVESTRI-MOREL, P., LEMBREZ, N., LACOSTE, J.M., CORDI, A., VERBEUREN, T.J. Role of NADPH oxidase-mediated superoxide production in the regulation of E-selectin expression by endothelial cells subjected to anoxia/reoxygenation, *Cardiovasc. Res.* v.63, p. 323-30, 2004.

STEFFEN, Y., GRUBER, C., SCHEWE, T., SIES, H. Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys*, v. 469(2), p. 209-19, 2008.

STOLK, J., HILTERMANN, T.J., DIJKMAN, J.H., VERHOEVEN, A.J. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v.11(1), p.95-102, 1994.

't HART, B. A., SIMONS, J.M., KNAAN-SHANZER, S., BAKKER, N.P., LABADIE, R.P. Antiarthritic activity of the newly developed neutrophil oxidative burst antagonist apocynin. *Free Radic Biol Med*, v.9(2), p.127-31, 1990.

TIEN, M. Myeloperoxidase-catalyzed oxidation of tyrosine. *Arch Biochem Biophys*, v.367(1), p.61-6. 1999.

UNGVARI, Z., CSISZAR, A., EDWARDS, J.G., KAMINSKI, P.M., WOLIN, M.S., KALEY, G., KOLLER, A. Increased superoxide production in coronary arteries in hyperhomocysteinemia: role of tumor necrosis factor-alpha, NAD(P)H oxidase, and inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 23, p. 418–424, 2003.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T., MAZUR, M., TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 39(1), p. 44-84, 2007.

VAN DEN WORM, E., BEUKELMAN, C. J., VAN DEN BERG, A.J., KROES, B.H., LABADIE, R.P., VAN DIJK, H. Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils. *Eur J Pharmacol*, v.433, p.225-30, 2001.

VAN DER PLANCKEN, I., VAN LOEY, A., HENDRICKX, M.E. Changes in sulfhydryl content of egg white proteins due to heat and pressure treatment. **J Agric Food Chem**, v.53(14), p.5726-33, 2005.

WILLIAMS, H.C., GRIENGLING, K.K. NADPH oxidase inhibitors: new antihypertensive agents? **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 50, p. 9-16, 2007.

[www.molbio1.princeton.edu/facility/flowcyt/viability.html](http://www.molbio1.princeton.edu/facility/flowcyt/viability.html)

XIMENES, V. F., KANEGAE, M.P.P., RISSATO, S.R., GALHIANE, M.S. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: proposal for NADPH oxidase inhibition. **Arch Biochem Biophys**, v.457(2), p.134-41, 2007.

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**, v. 118, p. 480-86, 2005.

YANG, T.C., ZHANG, S.W., SUN, L.N., WANG, H., REN, A.M. Magnolol attenuates sepsis-induced gastrointestinal dysmotility in rats by modulating inflammatory mediators. **World J Gastroenterol**, v. 14(48), p. 7353-60, 2008.

ZHANG, H.S., WANG, S.Q. Salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-induced MMP-2 upregulation in human aortic smooth muscle cells via suppression of NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. **J Mol Cell Cardiol**, v. 41(1), p. 138-48, 2006.

ZHANG, Y., CHAN, M.M.K., ANDREWS, M.C., MORI, T.A., CROFT, K.D., MCKENZIE, K.U., SCHYVENS, C.G., WHITWORTH, J.A. Apocynin but not allopurinol prevents and reverses adrenocorticotrophic hormone-induced hypertension in the rat. **Am J Hypertens**, v. 18(7), p. 910-16, 2005.