

Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara  
Departamento de Análises Clínicas

CAROLINA MARIA QUINELLO GOMES DE FARIA

**ÁCIDO PROTOCATECÚICO E SEUS ÉSTERES ALQUÍLICOS:  
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E SEUS EFEITOS NO  
METABOLISMO OXIDATIVO DE LEUCÓCITOS**

**Araraquara**

**2014**

*CAROLINA MARIA QUINELLO GOMES DE FARIA*

**ÁCIDO PROTOCATECÚICO E SEUS ÉSTERES ALQUÍLICOS:  
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E SEUS EFEITOS NO  
METABOLISMO OXIDATIVO DE LEUCÓCITOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção de título de Doutor

Orientador: Valdecir Farias Ximenes

Coorientador: Luiz Marcos da Fonseca

**Araraquara**

**2014**

**Ficha Catalográfica**

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**F224a**

Faria, Carolina Maria Quinello Gomes

Ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos: propriedades antioxidantes e seus efeitos no metabolismo oxidativo de leucócitos / Carolina Maria Quinello Gomes de Faria. – Araraquara, 2014.  
199 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Orientador: Valdecir Farias Ximenes.  
Coorientador: Luiz Marcos da Fonseca.

1. Ácido protocatecúico. 2. NADPH oxidase. 3. *Burst* oxidativo. 4. Ânion superóxido. 5. TNF- $\alpha$ . I. Ximenes, Valdecir Farias, orient. II. Fonseca, Luiz Marcos da, coorient. III. Título.

**CAPES: 40500005**

***Apresentação***

---

---

*Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Hematologia Clínica do departamento de Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Laboratório de Bioquímica do Departamento de Química da Faculdade de Ciências de Bauru, ambos pertencentes à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e, Laboratório de Investigação Médica – LIM 36 do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, HC-FMUSP.*

*Fomento: FAPESP*

***Dedicatória***

---

---

*A vocês, meus pais (Arly e Marlene), é que dedico este trabalho, por me ensinaram a nunca perder a fé e a paciência. Por muitas vezes abdicarem de seus sonhos, para que pudesse realizar os meus. A vocês, pelos momentos que, em minha ausência, souberam respeitar e valorizar meus esforços, apesar da saudade. Obrigada pela confiança, pelo apoio e pelos momentos que, em silêncio transmitiram amor e compreensão...*

*Muito Obrigada.*

*Vocês são meu alicerce e meu maior exemplo...*

*Amo vocês!*

*Também dedico à minha irmã (Camila), por toda dedicação e esforço oferecidos para me ajudar no decorrer e na finalização deste trabalho.*

*Não importa o tempo, a ausência, os adiantamentos, a distância, as impossibilidades... As palavras que regem nossa relação se resumem em*

*AMOR e CUMPLICIDADE.*

*Obrigada pelo carinho e apoio de sempre.*

*Amo você!*

***Agradecimientos***

---

---



*Agradeço a todos aqueles que colaboraram com a realização deste trabalho.*

*Ao meu orientador Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes, pela oportunidade, suporte e confiança depositados em mim. Por permitir e colaborar com meu avanço pessoal e profissional.*

*Ao meu co-orientador Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca, por ceder gentilmente as dependências do Laboratório de Hematologia Clínica para que eu pudesse realizar parte deste trabalho. Obrigada por ser sempre tão solícito, pela atenção, disponibilidade, ajuda e interesse.*

*Agradeço a Dr. Patricia Palmeira por oferecer as dependências do LIM-36 para que eu pudesse realizar parte deste trabalho. Obrigada pela solicitude, paciência, por todo o aprendizado e pela amizade.*

*Aos professores Jose Carlos Rebuglio Velloso e Iracilda Zeppone Carlos  
por aceitarem o convite de participação como membros da Banca do  
Exame Geral de Qualificação deste trabalho. Obrigada pelas correções e  
sugestões oferecidas.*

*Aos membros da Banca de Defesa de Tese: Maria Luiza Zeraik,  
Alexander Batista Duharte, Alexandra Ivo de Medeiros e Patricia  
Palmeira por contribuírem para a finalização deste trabalho.*

*Aos professores e funcionários do Departamento de Biociências e  
Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas – UNESP.*

*Aos funcionários e alunos dos Laboratórios de Hematologia Clínica –  
Fcfar e do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências de Bauru.  
Aos funcionários e alunos do Laboratório de Investigação Clínica, LIM-36.  
E às funcionárias da Pós-Graduação da Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas – UNESP.*

*Muito obrigada por toda ajuda, atenção e disponibilidade.*

*Agradeço especialmente os amigos dos Laboratórios: Luana Chiquetto Paracatu, Maria Luiza Zeraik, Ana Carolina Nazaré, Maicon Petrônio, Cibele Bonacorsi, Camila Rennó, Laila Lima, Fernanda Macaferri, Claudia Zago, pela solicitude e todo o tempo que disponibilizaram para me ensinar, ajudar... Obrigada pela atenção e interesse; vocês são parte essencial deste trabalho. Obrigada pela amizade.*

*Agradeço também aos meus amigos, os melhores, aqueles que me ajudaram indiretamente, desprendendo sempre muito carinho, apoio e dedicação. Definitivamente, a amizade verdadeira não tem prazo de validade!*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos.*

## CONFIE SEMPRE

*Não percas a tua fé entre as sombras do mundo. Ainda que os teus pés estejam sangrando, segue para a frente, erguendo-a por luz celeste, acima de ti mesmo. Crê e trabalha. Esforça-te no bem e espera com paciência. Tudo passa e tudo se renova na terra, mas o que vem do céu permanecerá. De todos os infelizes os mais desditosos são os que perderam a confiança em Deus e em si mesmo, porque o maior infortúnio é sofrer a privação da fé e prosseguir vivendo. Eleva, pois, o teu olhar e caminha. Luta e serve. Aprende e adianta-te. Brilha a alvorada além da noite. Hoje, é possível que a tempestade te amarfanhe o coração e te atormente o ideal, aguilhoando-te com a aflição ou ameaçando-te com a morte. Não te esqueças, porém, de que amanhã será outro dia.*

(Chico Xavier)

## RESUMO

Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidases são complexos multienzimáticos associados à membrana celular cuja principal função é catalisar a redução de oxigênio molecular a ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Em leucócitos, este é o mecanismo primário pelo qual estas células produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais estão envolvidas tanto nos mecanismos de defesa imune inato, quanto em processos oxidativos deletérios característicos de muitas patologias de cunho crônico inflamatório. Neste trabalho apresentamos os resultados obtidos e proposta de mecanismo de inibição do complexo NADPH oxidase por um conjunto de ésteres alquílicos sintéticos derivados do ácido protocatecúico, sendo este último um ácido fenólico presente em diversas plantas e com destacada capacidade anti-radicalar. Nossa hipótese foi de que o aumento da hidrofobicidade provocado pela esterificação do ácido protocatecúico poderia facilitar o seu acesso à membrana celular e assim alterar seus efeitos biológicos. Esta hipótese se confirmou, pois muito mais do que melhorar a sua capacidade anti-radicalar (modelos *in vitro*), a esterificação provocou uma melhora significativa na capacidade de inibição do complexo NADPH oxidase em leucócitos (modelos *ex vivo*). Este efeito se propagou às EROs decorrentes de ânion superóxido e produzidas por leucócitos como peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso, sem entretanto alterar a sua capacidade fagocítica. Cabe frisar que não se trata de ação supressora sobre estas EROs, mas sim efetiva inibição de sua formação, o que foi demonstrado pelos diversos controles empregados. A esterificação do ácido protocatecúico também causou efetiva melhora na capacidade deste como inibidor das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10 produzidas por leucócitos mononucleares de sangue periférico. Considerando a baixa toxicidade e baixo custo de síntese desses ésteres, propomos que os mesmos poderiam ser utilizados em modelos *in vivo* como promissores fármacos anti-inflamatórios.

**Palavras-chave:** Ácido protocatecúico, NADPH oxidase, *Burst* oxidativo, Ânion superóxido, TNF-  $\alpha$

## ABSTRACT

Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidases are multi-enzymatic complexes associated to the cell membranes whose main function is to catalyze the reduction of molecular oxygen to superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ). In leukocytes, this is the primary mechanism through which these cells produce reactive oxygen species (ROS), which are involved in both the innate immune defense mechanisms and deleterious oxidative processes, which characterizes many chronic inflammatory diseases. In this thesis we present the results and proposed mechanism of inhibition of the NADPH oxidase complex by a group of synthetic alkyl esters derived from protocatechuic acid, a phenolic acid present in many plants with detached antiradical capacity. Our hypothesis was that the increase in hydrophobicity caused by esterification of protocatechuic acid could facilitate their access to the cell membrane and thereby alter their biological effects. This hypothesis was confirmed, since not only its anti-radical activity was increased (*in vitro* models), but also caused a significant improvement in their ability to inhibit NADPH oxidase complex in leukocytes (*ex vivo* models). This effect has spread to ROS derived from superoxide anion and produced by leukocytes such as hydrogen peroxide and hypochlorous acid, without altering their phagocytic capacity. It must be emphasize that the observed cellular effects were not due to simple suppressive action on ROS, but effective inhibition of its formation, which was demonstrated by the various control experiments. The esterification of protocatechuic acid also caused improvement in their capacity as inhibitor of TNF- $\alpha$  and IL-10 production by peripheral blood mononuclear leukocytes. Considering the low toxicity and low cost of synthesis of these esters, we suggest that they could be used in *in vivo* models as promising anti-inflammatory drugs.

**Keywords:** Protocatechuic acid, NADPH oxidase, Oxidative burst, Superoxide anion, TNF-  $\alpha$

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ativação da NADPH oxidase (NOX2). 37
- Figura 2.** Reação da formação das espécies reativas de oxigênio e a ação de antioxidantes. 39
- Figura 3.** Estrutura do ácido protocatecúico e seus derivados. 57
- Figura 4.** Demonstração ilustrativa da separação celular por Histopaque 1077 e 1119. 62
- Figura 5.** Estimação do logaritmo de coeficiente de partição (log P). Estrutura molecular do ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos, e seus índices de hidrofobicidade (log P). 78
- Figura 6.** Medida de voltametria cíclica para obtenção do potencial de redução. 80
- Figura 7.** Ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos como sequestradores de radicais livres. 82
- Figura 8.** Inibição da hemólise oxidativa induzida por AAPH. Ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos na concentração de 50  $\mu\text{M}$ . 84
- Figura 9.** Inibição da hemólise oxidativa induzida por AAPH. Ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos na concentração de 100  $\mu\text{M}$ . 85
- Figura 10.** Inibição da hemólise oxidativa induzida por AAPH. Ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos na concentração de 200  $\mu\text{M}$ . 86
- Figura 11.** Ácido protocatecúico e os seus ésteres alquílicos como inibidores de  $\text{O}_2^{\cdot -}$  produzidos por PMN estimulados com zymosan. Inibição da quimiluminescência dependente de lucigenina. 88

- Figura 12.** Cinética da emissão de luz (RLU) no tempo de 30 minutos para o ácido protocatecúico e seu éster alquílico (P7) nas concentrações de 10  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$ . Células polimorfonucleares (PMN). 88
- Figura 13.** Concentração inibitória ( $\text{IC}_{50}$ ) para o protocateculato de heptila (P7) em células PMN. 89
- Figura 14.** Ácido protocatecuico e os seus ésteres alquílicos como inibidores de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  produzidos por PBMC estimulados com zymosan. Inibição da quimiluminescência dependente de lucigenina. 90
- Figura 15.** Cinética da emissão de luz (RLU) no tempo de 30 minutos para o ácido protocatecúico e seu éster alquílico (P7) nas concentrações de 10  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$ . Células mononucleares do sangue periférico (PBMC). 90
- Figura 16.** Ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos como inibidores do radical ânion superóxido produzido por células PMN ativadas. Redução do WST-1 provocada pelo  $\text{O}_2^{\cdot-}$  liberado por neutrófilos ativados com PMA. 92
- Figura 17.** Cinética de redução do WST-1 induzida pelo radical ânion superóxido liberado por células PMN ativadas com PMA, e o efeito inibidor de P0 e P7. 93
- Figura 18.** Porcentagem de inibição do radical ânion superóxido pelo ácido protocatecúico, P7 e apocinina, com base na presença de cristais de formazana no citoplasma das células (positivas) gerados a partir da redução do NBT pelo  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . 94
- Figura 19.** Fotomicrografias retiradas das lâminas de cytopspin do ensaio de redução do NBT. 95
- Figura 20.** Fotomicrografias retiradas das lâminas de cytopspin para avaliação da morfologia de netrófilos ativados, sob efeito do protocateculato de heptila. 96
- Figura 21.** Ácido protocatecúico e protocateculato de heptila (P7) como inibidores do radical ânion superóxido produzido pelo sistema xantina/xantina oxidase. WST-1 (sonda cromogênica solúvel em água e impermeável a membrana) foi utilizada para revelar a produção de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . 98



- Figura 22.** Ácido protocatecúico e protocateculato de heptila como inibidores da ativação de NADPH oxidase em polimorfonucleares ativados, avaliados pelo consumo de oxigênio molecular. 99
- Figura 23.** Ácido protocatecúico e os seus ésteres alquílicos como inibidores de HOCl produzidos por células PMN ativadas. 101
- Figura 24.** Ácido protocatecúico e os seus ésteres alquílicos como inibidores de HOCl. Efeito sequestrador das substâncias testadas sobre a taurina cloramina quimicamente produzida por HOCl. 102
- Figura 25.** Ácido protocatecúico e os seus ésteres alquílicos como inibidores do HOCl produzido por MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 104
- Figura 26.** Efeito da 5-fluortriptamina e do protocateculato de heptila sobre a atividade clorinante da MPO medida pelo consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 106
- Figura 27.** Ácido protocatecúico e seu éster alquílico P7 como inibidores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberado no meio extracelular por PMN ativados com PMA. 108
- Figura 28.** Ácido protocatecúico e seu éster alquílico P7 como inibidores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberado no meio extracelular por PBMC ativados com PMA. 109
- Figura 29.** *Dot plots* representativos dos *gates* das populações de neutrófilos e monócitos, estimulados ou não com PMA, utilizando como parâmetro o tamanho (*forward scatter*, FSC) e granulosidade celular (*side scatter*, SSC) para análise da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular. 112
- Figura 30.** *Dot plots* representativos dos *gates* da população de neutrófilos, estimulados ou não com *Staphylococcus aureus*, tendo como parâmetro o tamanho (*forward scatter*, FSC) e granulosidade celular (*side scatter*, SSC) para análise da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular. 113
- Figura 31.** Porcentagem de inibição de peróxido e hidrogênio sobre o MFI (Média da intensidade de Fluorescência). 115
- Figura 32.** Porcentagem de inibição de peróxido de hidrogênio sobre a Média da intensidade de Fluorescência (MFI) produzida. Neutrófilos ativados com PMA. 117

- Figura 33.** Porcentagem de inibição de peróxido de hidrogênio sobre a Média da intensidade de Fluorescência (MFI) produzida. Monócitos ativados com PMA. 117
- Figura 34.** Porcentagem de inibição de peróxido de hidrogênio sobre a Média da intensidade de Fluorescência (MFI) produzida. Neutrófilos ativados com *Staphylococcus aureus*. 118
- Figura 35.** *Dot plots* representativos dos *gates* da população de neutrófilos para avaliação da fagocitose de *Staphylococcus aureus* (marcados com PI), na presença ou não do ácido protocatecúico e seus ésteres, tendo como parâmetro o tamanho (*forward scatter*, FSC) e granulosidade celular (*side scatter*, SSC). 120
- Figura 36.** Ácido protocatecúico e protocateculato de heptila e a capacidade de alteração da atividade efetora de neutrófilos (Fagocitose). 122
- Figura 37.** Ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos, na concentração de 200  $\mu\text{M}$ , e a capacidade de alteração da atividade efetora de neutrófilos (Fagocitose). 123
- Figura 38.** Ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos, na concentração de 500  $\mu\text{M}$ , e a capacidade de alteração da atividade efetora de neutrófilos (Fagocitose). 123
- Figura 39.** Quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias no sobrenadante das culturas de monócitos, por ELISA. 125

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<b>AAPH</b>	<i>2,2-azobis amidinopropano dihidroclorido</i>
<b>AEBSF</b>	<i>4-(2-aminoethyl)-benzenesulphonyl fluoride</i>
<b>BPI</b>	Proteína de Aumento da Permeabilidade/Bactericida
<b>CerK</b>	Ceramida quinase
<b>cm<sup>2</sup></b>	Centímetro quadrado
<b>CO<sub>2</sub></b>	Gás carbônico
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DPI</b>	<i>Diphenyliodonium chloride</i>
<b>DHR</b>	Dihidrorodamina-123
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DPPH</b>	<i>1-difenil-2-picrilhidrazil</i>
<b>Epa</b>	Potencial do pico anódico
<b>ERK</b>	<i>Extracellular-signal-regulated kinases</i>
<b>EROs</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<i>et al</i>	E outros
<b>FAD</b>	Flavina Adenina Dinucleotídeo
<b>FSC</b>	<i>Forward scatter</i> (tamanho celular)
<b>fMLP</b>	<i>Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine</i>
<b>GM-CSF</b>	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos)
<b>GSH</b>	Glutathiona
<b>GSH-Px</b>	Glutathiona peroxidase
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>HOCl</b>	Ácido hipocloroso

<b>HRP</b>	<i>Horseradish Peroxidase</i>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<i>Interferon-gama</i>
<b>IgG</b>	Imunoglobulina de classe G
<b>IL-</b>	Interleucina
<b>IP3</b>	Trifosfatoinositol
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixo peso molecular
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>MFI</b>	<i>Mean fluorescence intensity</i> (Média de Intensidade de Fluorescência)
<b>mg</b>	Miligrama
<b>MHC</b>	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>mV</b>	Milivolts
<b><math>\mu</math>g</b>	Micrograma
<b><math>\mu</math>M</b>	Micromolar
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
<b>NBT</b>	Nitro Azul de Tetrazólio
<b>NO<math>\cdot</math></b>	Óxido nítrico
<b>nM</b>	Nanomolar
<b><math>^1\text{O}_2</math></b>	Oxigênio singlete
<b>O<math>2^{\cdot-}</math></b>	Ânion superóxido

<b>OH<sup>·</sup></b>	Radical hidroxila
<b>OONO<sup>-</sup></b>	Peróxinitrito
<b>P0</b>	Ácido protocatecúico
<b>P1</b>	Protocateculato de metila
<b>P2</b>	Protocateculato de etila
<b>P3</b>	Protocateculato de propila
<b>P4</b>	Protocateculato de butila
<b>P7</b>	Protocateculato de heptila
<b>P10</b>	Protocateculato de decila
<b>PAF</b>	Fator Ativador de Plaquetas
<b>PAI-1</b>	Inibidor do Ativador Plasminogênio
<b>PAMPs</b>	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i> (Padrões Moleculares Associados a Patógenos)
<b>PBMC</b>	Células Mononucleares do Sangue Periférico
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada com fosfato
<b>pg</b>	Picograma
<b>PKA</b>	<i>Protein kinase A</i>
<b>PKC</b>	<i>Protein kinase C</i>
<b>PMA</b>	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
<b>PMN</b>	Neutrófilos polimorfonucleares
<b>PR-39</b>	<i>Proline-arginine-rich antimicrobial peptide</i>
<b>PRC</b>	Proteína C Reativa
<b>ROO<sup>·</sup></b>	Radical peroxila
<b>-SH</b>	Grupos sulfidrilas
<b>-SS</b>	Pontes dissulfeto

<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>SSC</b>	<i>Side scatter</i> (granulosidade celular)
<b>TBARS</b>	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
<b>TLR</b>	<i>Toll-Like receptor</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor necrosis fator-alfa</i> (Fator de Necrose Tumoral-alfa)

# SUMÁRIO

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**LISTA DE FIGURAS**

**LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS**

**CAPÍTULO 1**

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>28</b>
	<i>NADPH Oxidases (NOXS)</i>	28
	<i>Fagócitos: Neutrófilos e Monócitos</i>	31
	<i>NOX2: A NADPH oxidase de fagócitos</i>	35
	<i>NADPH oxidase (NOX2): produção EROs</i>	38
	<i>Antioxidantes endógenos e exógenos</i>	42
	<i>NADPH oxidase e EROs: Efeitos fisiológicos e patológicos</i>	43
	<i>Inibidores da NADPH oxidase e o Ácido protocatecúico</i>	47
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>54</b>
2.1.	Objetivos específicos	54
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>56</b>
3.1.	Ética	56
3.2.	Casuística	56

3.3.	Ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos	57
3.4.	Estimação do logaritmo de coeficiente de partição (log P)	57
3.5.	Medidas de Voltametria Cíclica para determinação do potencial de redução	58
3.6.	Estudo do potencial antioxidante (redução do radical estável DPPH)	58
3.7.	Estudo da ação redutora sobre o radical peroxila/(AAPH)	59
3.8.	Inibição da hemólise oxidativa induzida por AAPH	60
3.9.	Separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e neutrófilos polimorfonucleares (PMN)	61
3.9.1.	Contagem dos Neutrófilos em Câmara de Neubauer	62
3.9.2.	Teste de viabilidade celular por exclusão do corante azul de Trypan	63
3.10.	Determinação da produção do radical $O_2^{\cdot-}$ por leucócitos ativados (ensaio quimiluminescente dependente de Lucigenina)	63
3.10.1.	Preparação da suspensão e opsonização do Zymosan (10 mg/mL)	64
3.10.2.	Ensaio de Quimiluminescência dependente de Lucigenina	64
3.11.	Determinação da produção do radical $O_2^{\cdot-}$ por neutrófilos ativados (ensaio do WST-1)	65
3.12.	Ensaio de redução do Nitro Azul de Tetrazólio (NBT)	65
3.13.	Estudo da morfologia de neutrófilos ativados (Ensaio qualitativo)	66
3.14.	Ensaio da xantina/xantina oxidase	67



3.15.	Ensaio de consumo de oxigênio	67
3.16.	Avaliação do efeito inibidor sobre a produção de ácido hipocloroso (HOCl) por neutrófilos ativados	68
3.17.	Produção de HOCl: MPO/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Sistema livre de células) Avaliação do efeito inibidor sobre a ação clorinante da enzima mieloperoxidase (MPO)	69
3.18.	Atividade clorinante da MPO: Ensaio amperométrico	70
3.19.	Determinação da inibição da produção de peróxido de hidrogênio extracelular por Amplex <sup>®</sup> Red	71
3.20.	Determinação da inibição de peróxido de hidrogênio intracelular Ensaio de dihidrorodamina 123 (DHR) por citometria de fluxo	72
3.21.	Ensaio de fagocitose por citometria de fluxo	73
3.22.	Cultura de células mononucleares	74
3.23.	Quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias (ELISA)	75
3.24.	Análises Estatísticas	76
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>78</b>
4.1	Estimação do logaritmo de coeficiente de partição (log P)	78
4.2	Medidas de Voltametria Cíclica para determinação do potencial de redução	79
4.3	Estudo do potencial antioxidante: redução do radical estável DPPH e estudo da ação redutora sobre o radical peroxila/(AAPH)	80
4.4	Inibição da hemólise oxidativa induzida por AAPH	82

4.5	Teste de viabilidade celular por exclusão do corante azul de Trypan	86
4.6	Determinação da produção do radical $O_2^{\cdot-}$ por leucócitos ativados (ensaio quimiluminescente dependente de Lucigenina)	87
4.7.	Determinação da produção do radical $O_2^{\cdot-}$ por neutrófilos ativados (ensaio do WST-1)	91
4.8.	Ensaio de redução do Nitro Azul de Tetrazolio (NBT)	93
4.9.	Estudo da morfologia de neutrófilos ativados (Ensaio Qualitativo)	96
4.10.	Ensaio da xantina/xantina oxidase	97
4.11.	Ensaio de consumo de oxigênio	99
4.12.	Avaliação do efeito inibidor sobre a produção de ácido hipocloroso (HOCl) por neutrófilos ativados	100
4.13.	Produção de HOCl: MPO/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Sistema livre de células)	103
	Avaliação o efeito inibidor sobre a ação clorinante da enzima mieloperoxidase (MPO)	
4.14.	Atividade da MPO: Ensaio amperométrico	104
4.15.	Determinação da inibição da produção de peróxido de hidrogênio extracelular por Amplex <sup>®</sup> Red	107
4.16.	Determinação da inibição de peróxido de hidrogênio intracelular	110
	Ensaio de dihidrorodamina 123 (DHR) por citometria de fluxo	
4.17.	Ensaio de fagocitose por citometria de fluxo	119
4.18.	Quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias (ELISA) no sobrenadante das culturas	124

<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>128</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>156</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>158</b>

## **CAPÍTULO 2**

Artigo Científico

## **APÊNDICE 1**

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

# **CAPÍTULO 1**



## 1. INTRODUÇÃO

### ***NADPH Oxidases (NOXS)***

Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH) oxidases são complexos multienzimáticos de proteínas associadas à membrana cuja principal função é catalisar a redução do oxigênio molecular à ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e/ou peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (BABIOR, 1984; BABIOR, 1999; FOREMAN *et al.*, 2003; BEDARD, LARDY, KRAUSE, 2007; BROWN, GRIENGLING, 2009; DRUMMOND *et al.*, 2011; HURTADO-NEDELEC *et al.*, 2014). A subunidade catalítica deste complexo é conhecida como NOX ou gp91phox, ou DUOX (BROWN, GRIENGLING, 2009).

Sete isoformas de NADPH oxidases foram descritas em mamíferos e cada uma dessas isoformas compreende uma subunidade catalítica e até cinco subunidades regulatórias, entre as quais, proteínas de membrana e citosólicas (DRUMMOND *et al.*, 2011; PANDEY, FULTON, 2011). NOX1, NOX2, NOX3, e NOX5 são proteínas transmembrana que transportam elétrons através da membrana biológica para reduzir oxigênio molecular a  $O_2^{\cdot-}$ . Apesar das semelhanças estruturais comuns entre os sete membros da família NADPH oxidase, NOX4, DUOX1 e DUOX2 não geram ânion superóxido como principal produto. A atividade dessas enzimas resulta na liberação direta de  $H_2O_2$  (CHEN *et al.*, 2008; BROWN, GRIENGLING, 2009; DRUMMOND *et al.*, 2011). Vários estudos sugerem que a dissociação do  $O_2^{\cdot-}$  a partir da subunidade catalítica destas enzimas pode ser retardada, o que permitiria maior tempo para a geração de uma segunda molécula de  $O_2^{\cdot-}$  e sua dismutação subsequente a  $H_2O_2$ , antes que ela seja liberada da enzima (DIKALOV *et al.*, 2008; DRUMMOND *et al.*, 2011; TAKAC *et al.*, 2011).

As isoformas são expressas em diversos tipos celulares e suas espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas têm papel crucial em vários

processos fisiológicos, que incluem sua participação na imunidade inata, modulação de cascatas de sinalização e como cofatores na produção hormonal (DRUMMOND *et al.*, 2011). Ainda, as EROs derivadas de NOXs têm sido implicadas na regulação do remodelamento do citoesqueleto, na expressão de genes, proliferação, diferenciação, migração e morte celular. E estes processos são fortemente controlados e reversíveis (RADA *et al.*, 2008; BROWN, GRIENGLING, 2009).

Dependendo da membrana biológica na qual as diferentes isoformas são expressas, os compartimentos celulares em que estas estão presentes incluem diferentes localizações subcelulares, como núcleo (NOX4), retículo endoplasmático (NOX2, NOX4, NOX5), endossoma (NOX1), fagossoma (NOX2), mitocôndria (NOX4) e a própria membrana plasmática da célula (NOX1, NOX2, NOX5) (LASSEGUE, GRIENGLING, 2010; DRUMMOND *et al.*, 2011).

A expressão das isoformas de NADPH oxidase tem sido descritas em diversos tipos celulares e com algumas particularidades em relação as suas estruturas:

- A NOX1 é expressa em células endoteliais, útero, placenta (CUI *et al.*, 2006), próstata e osteoclastos (LEE *et al.*, 2005; BROWN, GRIENGLING, 2009).
- NOX2 é altamente expressa em fagócitos. Sua expressão também tem sido detectada em células da musculatura lisa vascular, fibroblastos, musculatura esquelética, hepatócitos e em células tronco hematopoiéticas (BEDARD, KRAUSE, 2007; BROWN, GRIENGLING, 2009; PANDEY, FULTON, 2011).
- A NOX3 tem sido detectada em células edoteliais do pulmão (ZHANG *et al.*, 2006) e do tecido auricular interno. Apesar de exigirem maiores investigações, alguns estudos realizados por PCR mostraram que NOX3

foi detectada em células do tecido fetal, como baço, rim, pulmão e crânio (BANFI *et al.*, 2004; CHENG *et al.*, 2001), e indicam que esta isoforma pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento do tecido, mas está desativada no tecido adulto (BROWN, GRIENGLING, 2009).

- A NOX4 é altamente expressa em células renais (GEISZT *et al.*, 2000), nas células da musculatura lisa (HILENSKI *et al.*, 2004), células endoteliais (AGO *et al.*, 2004), fibroblastos (CUCORANU *et al.*, 2005), queratinócitos (CHAMULITRAT *et al.*, 2004), osteoclastos (YANG *et al.*, 2001), neurônios (VALLET *et al.*, 2005) e hepatócitos (CARMONA-CUENCA *et al.*, 2006). A distribuição tecidual da NOX4 é bastante onipresente e altamente expressa em relação a seus outros homólogos NOX (BEDARD, KRAUSE, 2007; BROWN, GRIENGLING, 2009). NOX4 é a única que apresenta um domínio chamado *polymerase  $\delta$ -interacting protein 2* (POLDIP2), responsável pela regulação da sua atividade, que promove uma conexão entre a organização do citoesqueleto e a produção das EROs (BROWN, GRIENGLING, 2009; DRUMMOND *et al.*, 2011).
- NOX5 é expressa em células do tecido linfático, células endoteliais (BELAIBA *et al.*, 2007; BANFI *et al.*, 2001), testículos (BANFI *et al.*, 2001), células da musculatura lisa vascular (JAY *et al.*, 2008; BANFI *et al.*, 2001), pâncreas e útero (CHENG *et al.*, 2001), próstata e células cancerígenas (BRAR *et al.*, 2003). Várias pesquisas indicam que NOX5 desempenha um importante papel na proliferação celular e que talvez este seja o motivo pela qual está altamente expressa em diversas linhagens de células cancerígenas. (BRAR *et al.*, 2003; KAMIGUTI *et al.*, 2005; BEDARD, KRAUSE, 2007; BROWN, GRIENGLING, 2009; PANDEY, FULTON, 2011). Uma curiosidade em relação a esta isoforma, é que entre as NOX, ela é a única que apresenta uma porção amino terminal que codifica quatro sítios de ligação para cálcio. A elevação do



cálcio intracelular é detectada por estes ligantes e isso desencadeia uma mudança conformacional intramolecular, a qual facilita o fluxo de elétrons e a produção de  $O_2^{\cdot-}$  por esta NOX (BANFI *et al.*, 2001; PANDEY, FULTON, 2011).

- DUOX1/DUOX2 são descritas como proteínas de natureza dupla por apresentarem um domínio de peroxidase extracelular, em adição aos domínios de ligação de cálcio (homólogos aos da NOX5) e um domínio homólogo a gp91phox (DE DEKEN *et al.*, 2000; DRUMMOND *et al.*, 2011). Estão presentes na tireoide, onde são responsáveis por produzirem  $H_2O_2$ , que é utilizado na oxidação do iodeto durante a síntese hormonal da tireoide. Algumas pesquisas sugerem que uma mutação na DUOX2 implicaria em Hipotireoidismo (DE DEKEN *et al.*, 2000; PFARR *et al.*, 2006; RIS-STALPERS *et al.*, 2006). DUOX1/DUOX2 também são expressas em células epiteliais das vias aéreas e no trato respiratório. Algumas pesquisas mostram que Interleucina (IL)-4 e IL-13 aumentam a expressão de DUOX1 no epitélio das vias respiratórias, enquanto o aumento de Interferon (INF)- $\gamma$  induz a expressão de DUOX2. O que poderia indicar que DUOX1 é constitutivamente expressa para manter a função epitelial normal, considerando que DUOX2 é induzida em resposta a uma infecção (HARPER *et al.*, 2005; BROWN, GRIENGLING, 2009).

### ***Fagócitos: Neutrófilos e Monócitos***

O primeiro membro da família NADPH oxidase a ser identificado foi a NOX2 oxidase de fagócitos, a qual é expressa em células que compreendem o sistema imune inato, como neutrófilos e monócitos e, conseqüentemente os macrófagos teciduais (BEDARD, LARDY, KRAUSE, 2007; DRUMMOND *et al.*, 2011).

A imunidade inata é um sistema que fornece mecanismos imediatos de defesa contra uma ampla variedade de patógenos, sem exigir uma exposição prévia (VASSELON, DETMERS, 2002). Neutrófilos e monócitos participam desta primeira linha de defesa do organismo, e desempenham um papel essencial na defesa do hospedeiro contra patógenos microbianos e nas reações inflamatórias. As EROs liberadas por estas células fagocíticas, tais como  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ , radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) e o ácido hipocloroso (HOCl), associados aos peptídeos microbianos e as proteases presentes nestas células, constituem um potente arsenal antimicrobiano (EL-BENNA *et al.*, 2005; EL-BENNA, DANG, GOUGEROT-POCIDALO, 2008; FLANNAGAN, COSÍO, GRINSTEIN, 2009).

Os neutrófilos, células polimorfonucleares, compreendem mais de 50% dos leucócitos circulantes e constituem um dos meios mais poderosos de defesa do hospedeiro contra fungos e bactérias (EL-BENNA *et al.*, 2005; EL-BENNA, DANG, GOUGEROT-POCIDALO, 2008). Estes fagócitos englobam e digerem os microrganismos através da ação de proteínas e enzimas microbidas digestivas contidas nos seus grânulos citoplasmáticos (FREIRE, QUELUZ, 1995; RINALDI *et al.*, 2007), portanto, são capazes de hidrolisar polissacarídeos simples e complexos, além de proteínas, lipídeos e outros substratos. Esses grânulos citoplasmáticos incluem peroxidase-positivos primários, também conhecidos como grânulos azurófilos, composto por mieloperoxidase (MPO), proteína de aumento da permeabilidade/bactericida (BPI), defensina, serina protease de neutrófilo, elastase e catepsina G); peroxidase-negativos secundários, também denominados de grânulos específicos (lactoferrina e catelicidina) e peroxidase-negativos terciários (gelatinases e glicoproteínas) (FAURSCHOU, BORREGAARD, 2003; FLANNAGAN, COSÍO, GRINSTEIN, 2009; CHEN *et al.*, 2011).

O processo de digestão do microrganismo envolve basicamente dois eventos celulares: degranulação no vacúolo fagocítico com a formação do

fagolisossomo e o *burst* oxidativo com a produção de EROs (HAMPTON, KETTLE, WINTERBOURN, 1998); seguidos da liberação de citocinas inflamatórias dos fagócitos (BABIOR, KIPNES, CURNUTTE, 1973; BABIOR, COHEN, 2000; FLANNAGAN, COSÍO, GRINSTEIN, 2009).

Os neutrófilos circulantes fluem livremente num estado dormente e com baixa eficiência de captura e prisão de patógenos no endotélio quiescente/repouso. Numa situação de infecção e inflamação, mediadores pró-inflamatórios induzem alterações no endotélio vascular. (EL-BENNA *et al.*, 2005; EL-BENNA, DANG, GOUGEROT-POCIDALO, 2008). A expressão de moléculas de adesão, como selectinas e integrinas, promovem a atração da célula pelo endotélio e garantem a migração dos leucócitos através do endotélio vascular. (PUKA *et al.*, 2005; VON ANDRIAN, MACKAY, 2000). A invasão dos leucócitos através do endotélio ocorre por diapedese e a migração destas células até o sítio de infecção pode ser guiada por moléculas quimiotáticas, como a fração do complemento C5a, peptídeos (fMLP, *N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine* - produzidos por fragmentação bacteriana), Interleucina-8 (IL-8), Fator Ativador de Plaquetas (PAF) e mediadores lipídicos como o Leucotrieno B4 (LTB4) (WITKO-SARSAT *et al.*, 2000; EL-BENNA *et al.*, 2005).

No local da infecção, ocorre a fagocitose do patógeno, que pode ser mediada por opsoninas, tais como a imunoglobulina G (IgG), frações C3b e C3bi (resultantes da ativação do complemento) e receptores de reconhecimento padrão, *Toll-like receptors* (TLR), os quais reconhecem ligantes conservados durante a evolução do patógeno ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs – *Pathogen Associated Molecular Patterns*). Exemplos de TLRs que participam desse processo são o TLR2, que reconhecem ácido lipoteicóico de bactérias Gram-positivas e partículas de zymosan de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*); e TLR4, que reconhecem lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas

(BEUTLER *et al.*, 2003; AKIRA, TAKEDA, 2004; EL-BENNA *et al.*, 2005; FLANNAGAN, COSÍO, GRINSTEIN, 2009).

A internalização do patógeno é caracterizada por uma extensão da membrana plasmática ao redor da partícula. Quando a partícula é imersa através da membrana celular ocorre a formação de um vacúolo (fagossoma) que se funde com as vesículas secretórias e os grânulos formando um fagolisossoma. Isso dá início ao processo de ativação do fagócito que induz a liberação de peptídeos antimicrobianos, proteases e EROs, seguida da destruição do microrganismo e a morte celular (EL-BENNA *et al.*, 2005; EL-BENNA, DANG, GOUGEROT-POCIDALO, 2008; FLANNAGAN, COSÍO, GRINSTEIN, 2009).

Assim como os neutrófilos, monócitos/macrófagos são fagócitos essenciais na imunidade inata. Os monócitos constituem cerca de 5% dos leucócitos totais do sangue. Seu ciclo de vida consiste na sua maturação, na medula óssea, seu deslocamento através do sangue e a migração para os tecidos onde se diferenciam em macrófagos. Diferente dos granulócitos, os monócitos apresentam apenas finas granulações azurófilas no seu citoplasma, cuja formação é iniciada ainda na medula óssea, durante sua maturação celular. E durante seu processo de maturação, onde se diferenciam em macrófagos, adquirem um conteúdo importante de vesículas lisossomais (NICHOLS, BAINTON, FARQUHAR, 1971; KLEBANOFF, 2005). Porém, com relação à MPO, que é o maior constituinte dos grânulos azurófilos citoplasmáticos dos neutrófilos, os monócitos contêm cerca de um terço apenas desta quantidade. Isso porque, apesar de ser altamente expressa em promielócitos, a medida que estas células vão se diferenciando em linhagem granulocíticas e monocíticas, a expressão da MPO diminui nesta última (KLEBANOFF, 2005; HANSSON, OLSSON, NAUSEEF, 2006). Ou seja, os monócitos produzem dois tipos de lisossomas primários durante as diferentes fases do seu ciclo de vida: os grânulos azurófilos (que contêm a

MPO) produzidos por monócitos em fase de maturação na medula óssea e sangue, e as vesículas lisossomais produzidas por macrófagos nos tecidos e cavidades do corpo (NICHOLS, BAINTON, FARQUHAR, 1971; HANSSON, OLSSON, NAUSEEF, 2006).

### ***NOX2: A NADPH oxidase de fagócitos***

Como citado anteriormente, os fagócitos expressam NOX2, o membro mais bem caracterizado da família da NADPH oxidase (PANDEY, FULTON, 2011). Enquanto os fagócitos se movem do sangue para o sítio de infecção a NADPH oxidase se encontra em diferentes estados: repouso, preparada, ativada ou inativada. O estado de repouso é encontrado nas células circulantes, enquanto que o estado de preparação pode ser induzido por uma variedade de processos, entre os quais: a adesão destas células no epitélio vascular, ou agentes como citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- $\alpha$ ), LPS, entre outros. Esta preparação indica a transformação da célula para um fenótipo, por exposição a um agente que não ativa diretamente a célula, mas a torna mais suscetível a ativação. A exposição do fagócito preparado a um segundo estímulo, como fMLP, induz a uma resposta mais rápida e maior do que a resposta induzida pelo mesmo agente na célula em repouso. O estado ativado é encontrado no sítio de inflamação ou infecção. E a ativação pode ser induzida pelo próprio patógeno ou por peptídeos derivados dele. Finalmente, a inativação da NADPH oxidase ocorre no local da inflamação, a fim de limitar a secreção de EROs e a reação inflamatória (SHEPPARD *et al.*, 2005; EL-BENNA, DANG, GOUGEROT-POCIDALO, 2008; HURTADO-NEDELEC *et al.*, 2014).

Todo este processo pode contribuir para uma rápida e eficiente eliminação do patógeno, mas também pode induzir a geração de uma alta quantidade de EROs, devido a hiperatividade da enzima NADPH oxidase, o que pode causar dano tecidual, amplificar a reação inflamatória e induzir a

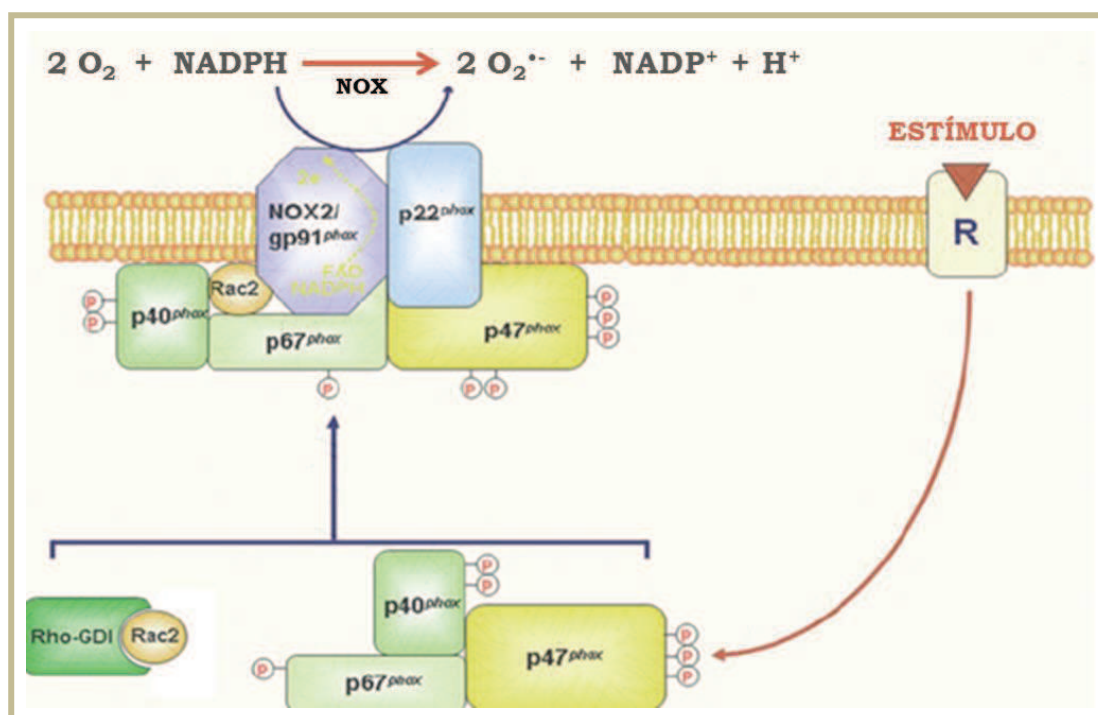
progressão de uma série de processos patológicos (EL-BENNA *et al.*, 2005; EL-BENNA, DANG, GOUGEROT-POCIDALO, 2008; HURTADO-NEDELEC *et al.*, 2014).

Além de ser ativada por um grande número de partículas solúveis e outros fatores, a ativação da NADPH oxidase é acompanhada de três grandes eventos: fosforilação de proteínas, ativação de GTPase e translocação dos componentes citosólicos para a membrana plasmática (EL-BENNA, DANG, GOUGEROT-POCIDALO, 2008).

A NOX2 de fagócitos é composta por várias proteínas que estão agregadas na membrana plasmática e no citosol da célula em repouso. A ativação desta enzima é regulada pela interação entre as subunidades de membrana e as citoplasmáticas (PANDEY, FULTON, 2011).

O Flavocitocromo  $b_{558}$  é o componente central associado à membrana e é composto de duas subunidades: uma subunidade catalítica chamada gp91phox (NOX); e a p22phox, essencial para a maturação e expressão estável do Flavocitocromo  $b_{558}$  (EL-BENNA, DANG, GOUGEROT-POCIDALO, 2008; KLENIEWSKA *et al.*, 2012). A gp91phox contém um sítio de ligação para FAD, NADPH e dois grupos heme, formando assim a cadeia de transferência de elétrons (EL-BENNA *et al.*, 2005; EL-BENNA, DANG, GOUGEROT-POCIDALO, 2008; FLANNAGAN, COSÍO, GRINSTEIN, 2009).

O componente citosólico da enzima é constituído de várias subunidades: p47phox e p40phox (consideradas organizadores citosólicos), p67phox (ativador citosólico) e uma pequena proteína chamada Rac1, em monócitos, ou Rac2, em neutrófilos. Estas últimas não estão associadas ao complexo citosólico, mas sim independentes e ligadas ao seu inibidor rho-GDI (ABO *et al.*, 1994; EL-BENNA, DANG, GOUGEROT-POCIDALO, 2008; DRUMMOND *et al.*, 2011; KLENIEWSKA *et al.*, 2012; HURTADO-NEDELEC *et al.*, 2014). A **Figura 1** ilustra as subunidades de membrana e citosólicas da NADPH oxidase e seu mecanismo de ativação.



**Figura 1.** Ativação da NADPH oxidase (NOX2). Adaptado de El-Benna *et al.*, Cellular and Molecular Life Sciences, 2012.

Quando o *burst* oxidativo é desencadeado pela ligação de um estímulo ao seu receptor específico, como fMLP ou C5a, as informações do receptor são transmitidas através da membrana citoplasmática para proteínas G heterotriméricas acopladas ao receptor, as quais se tornam ativadas. Estas, por sua vez, ativam efetores de membrana para liberarem mensageiros intracelulares e dar início a fosforilação das proteínas citosólicas. PKA (*Protein kinase A*), PKC (*Protein kinase C*), MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinase*) e outras tirosina quinases são ativadas durante a ativação dos fagócitos e fosforilam várias proteínas com importantes funções celulares, incluindo os componentes citosólicos da NADPH oxidase. Em neutrófilos humanos, várias proteínas quinases têm sido implicadas na regulação da atividade da NADPH oxidase, entre as quais a família PKC parece desempenhar um importante papel sobre a ativação por fMLP ou PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*), embora outras quinases como ERK1/2,

p38MAPK e PAK também possam participar (DANG *et al.*, 2001; DANG *et al.*, 2003; EL-BENNA *et al.*, 2005; EL-BENNA, DANG, GOUGEROT-POCIDALO, 2008).

A produção de EROs é iniciada pela fosforilação da p47phox e a subsequente translocação das subunidades citosólicas. Acredita-se que a p47phox seja responsável pelo transporte do complexo citosólico para a membrana durante a ativação da enzima e por isso é considerada um organizador do complexo ativado da NADPH oxidase. A p67phox também é fosforilada, embora em menor grau e p40phox é fracamente fosforilada. Enquanto todo esse complexo citoplasmático migra para se ligar ao complexo de membrana (flavocitocromo b<sub>558</sub>), Rac1/2 se dissocia do seu inibidor, migra independentemente e interage com p67phox e o flavocitocromo b<sub>558</sub>, resultando na ativação do complexo e na produção de EROs. p67phox é capaz de regular a atividade catalítica da enzima através de uma sequência chamada domínio de ativação. Acredita-se que este sítio presente em p67phox seja capaz de iniciar a transferência de elétrons de NADPH para FAD (EL-BENNA, RUEDI, BABIOR, 1994; NISIMOTO *et al.*, 1999; DANG, CROSS, BABIOR, 2001; EL-BENNA *et al.*, 2005; GROEMPING, RITTINGER, 2005; EL-BENNA, DANG, GOUGEROT-POCIDALO, 2008).

### ***NADPH oxidase (NOX2): produção de EROs***

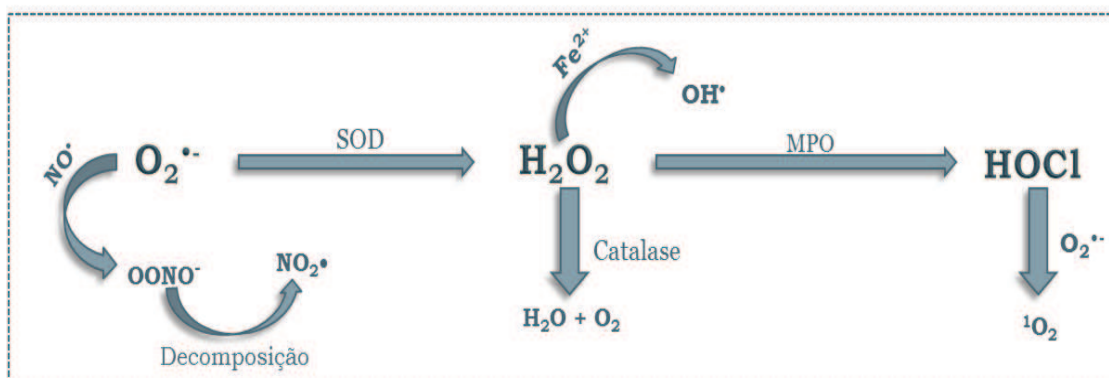
Como dito anteriormente, a NADPH oxidase catalisa a transferência de elétrons do citosol através das membranas biológicas em vários compartimentos, intra e extracelulares. A coenzima NADPH citosólica atua como doador de elétrons para todas as isoformas da enzima e quando esta é ativada, os elétrons são retirados da NADPH e transferidos através da cadeia de transporte de elétrons dentro da subunidade catalítica, que é constituída por uma molécula denominada FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo) ligada a uma cauda carboxi-terminal estendida e dois grupos heme ligados a resíduos



de histidina localizados na região transmembrana da proteína. O oxigênio atua como acceptor final de elétrons, para posterior formação do  $O_2^{\cdot-}$ . (DRUMMOND *et al.*, 2011; PANDEY, FULTON, 2011).



Uma vez gerado, o  $O_2^{\cdot-}$  sofre conversão para outras EROs (HAMPTON, KETTLE, WINTERBOURN, 1998; EL-BENNA *et al.*, 2005; HURTADO-NEDELEC *et al.*, 2014), como mostra a **Figura 2** e como está descrito a seguir:



**Figura 2.** Reação da formação das espécies reativas de oxigênio e a ação de antioxidantes.

- **Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ ):** A maior parte do  $O_2^{\cdot-}$  produzido é convertido a  $H_2O_2$  por dismutação espontânea, ou catalisada pela superóxido dismutase (SOD) (BABIOR, KIPNES, CURNUTTE, 1973; EL-BENNA *et al.*, 2005; BROWN, GRIENDLING, 2009). Apesar de não ser capaz de se difundir através de membranas biológicas, devido sua carga negativa, há evidências de que o transporte de  $O_2^{\cdot-}$  pode ser realizado através de canais. No entanto, devido a presença de SOD na célula, ele é rapidamente convertido a  $H_2O_2$ . E este, por ser uma molécula mais estável é capaz de atravessar membranas biológicas. O  $H_2O_2$  tem atividade

bactericida somente em altas concentrações, e o  $O_2^{\cdot-}$  gerado exogenamente, provavelmente não tem atividade bactericida direta. Portanto, a ação microbicida dos fagócitos é provavelmente devido à ação de oxidantes secundários, produzidos a partir de ambos. Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o  $H_2O_2$  é um metabólito extremamente deletério e altamente tóxico para as células, pois tem vida longa e é capaz de atravessar camadas lipídicas, podendo reagir com membranas biológicas ou com proteínas ligadas ao íon  $Fe^{++}$  (como ocorre, por exemplo, na hemocromatose transfusional) (FERREIRA, MATSUBARA, 1997; BROWN, GRIENGLING, 2009). O  $H_2O_2$  pode ser neutralizado por peroxidases (glutathione peroxidase) ou catalase intracelulares, resultando na produção de água ( $H_2O$ ) e oxigênio ( $O_2$ ) (HAMPTON, KETTLE, WINTERBOURN, 1998; SILVA, 2001).

- **Ácido Hipocloroso (HOCl):** Em fagócitos, a maior parte do  $H_2O_2$  produzido sofre ação da enzima MPO que é liberada dos grânulos azurófilos, originando o intermediário redox MPO I, que oxida o íon cloreto formando o HOCl (HAMPTON, KETTLE, WINTERBOURN, 1998; EL-BENNA *et al.*, 2005). O HOCl é o principal e o mais potente microbicida produzido por essas células (SILVA, 2001). No entanto, é capaz de atacar biomoléculas de importância fisiológica, tais como tióis, aminas, aminoácidos, nucleotídeos e ascorbato, além dos tecidos, visto que células de mamíferos não são capazes de inibir a ação deste radical por via catalítica devido a ausência de defesas enzimáticas contra oxidantes clorados (WEISS, 1989; LAPENNA, CUCCURULLO, 1996; EL-BENNA *et al.*, 2005; BROWN, GRIENGLING, 2009).
- **Oxigênio Singlete ( $^1O_2$ ):** É a forma eletronicamente excitada de oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados. Pode ser produzido

através da reação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  com HOCl, ou pela dismutação espontânea do  $\text{O}_2^-$  (FERREIRA, MATSUBARA, 1997; SILVA, 2001; RADA *et al.*, 2008).

- **Radical Hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ):** Para a produção de  $\text{OH}^\bullet$ , existem dois mecanismos possíveis: a reação de Fenton ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$ ), onde a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  é catalisada por metais de transição apropriados (íons metálicos, como íons férricos); ou pela reação de Haber-Weiss ( $\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{OH}^- + \text{O}_2$ ) (RAMOS *et al.*, 1992; LAURINDO, PEDRO, DA LUZ, 1996; RADA *et al.*, 2008). A combinação extremamente rápida do  $\text{OH}^\bullet$  com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade. Assim, se o radical for produzido próximo ao DNA (ácido desoxirribonucleico) e a este DNA estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA. O  $\text{OH}^\bullet$  pode, também, inativar várias proteínas (enzimas e membrana celular), ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS) e iniciar a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (peroxidação lipídica) (FERREIRA, MATSUBARA, 1997; LIMA, ABDALLA, 2001).
- **Óxido Nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ):** Neutrófilos humanos não produzem grandes quantidades de  $\text{NO}^\bullet$ . Sua produção ocorre apenas quando estes fagócitos são estimulados por determinadas citocinas.  $\text{NO}^\bullet$  é formado por via independente, pela ação da enzima óxido nítrico sintetase (SILVA, 2001; RADA *et al.*, 2008).
- **Peróxinitrito ( $\text{OONO}^\bullet$ ):** Peroxinitrito também pode ser produzido a partir do  $\text{O}_2^-$  que reage com óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), e pode se decompor dando origem a  $\text{OH}^\bullet$  e ao radical dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2^\bullet$ ) (SILVA, 2001; RADA *et al.*, 2008; BROWN, GRIENGLING, 2009). O óxido nítrico é um importante vasodilatador e atua como molécula de sinalização em células endoteliais. Por isso, uma desregulação na atividade de NOX2 pode levar a disfunção

endotelial e contribuir para quadros de hipertensão (BROWN, GRIENGLING, 2009).

### ***Antioxidantes endógenos e exógenos***

A prevenção da toxicidade de EROs inclui mecanismos antioxidantes, entre os quais podem ser compostos de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Ainda, de acordo com o mecanismo de ação sobre os radicais livres, os antioxidantes podem ser denominados “*scavenger*”, quando ele age transformando um radical livre num outro menos reativo, ou “*quencher*” quando consegue neutralizar completamente o radical livre através da absorção de toda a energia de excitação (EVELSON, 2002; HIRATA et al., 2004).

O sistema enzimático constitui uma proteção intrínseca e inclui: SOD, catalase, glutathiona peroxidase (GSH-Px) e glutathiona redutase (GSH-Rd) (através dos quais o organismo mantém a concentração de EROs dentro dos limites fisiológicos), glutathiona S-transferases (que atuam na detoxificação de agentes alquilantes) e a tioredoxina redutase (que age na regulação da expressão de genes redox-sensíveis). Incluem ainda as enzimas que catalisam reações geradoras de equivalentes redutores nos compartimentos citosólico e mitocondrial: glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogluconolactona (SHARMA, MONGAN, 2001; WICKENS, 2001).

Os antioxidantes classificados como não enzimáticos incluem moléculas do próprio organismo e outras exógenas, sintéticas ou naturais, incluindo moléculas lipofílicas e hidrofílicas, as quais são provenientes da dieta. Entre elas, podemos destacar o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides. Os compostos fenólicos apresentam atividade dependente de algumas características estruturais, incluindo a presença de grupamentos fenólicos (BIANCHI, ANTUNES, 1999; DEGÁSPARI,

WASZCZYNSKYJ, 2004). Sua atividade também depende da sua solubilidade e do tipo e solubilidade do catalisador utilizado. Além disso, o pH é um parâmetro determinante na capacidade oxidativa destes compostos, sendo assim, o pH dos tecidos biológicos é um fator que pode influenciar na sua atividade (MORGAN et al., 1997).

Ainda, o sistema de defesa celular pode atuar em duas linhas. Uma delas é constituída por glutathione reduzida (GSH), SOD, catalase, GSH-Px e pela vitamina E, e atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão. A outra linha de defesa, constituída pelo ácido ascórbico, glutathione-redutase, GSH-Px, entre outros, tem a função de reparar a lesão provocada pelos radicais (ROSS, MOLDEUS, 1991, FERREIRA, MATSUBARA, 1997) e está relacionada com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas (EVELSON, 2002).

### ***NADPH oxidase e EROs: Efeitos fisiológicos e patológicos***

A ativação da NADPH oxidase e a produção de EROs são essenciais na destruição de microrganismos fagocitados. Acredita-se que a diminuição da resposta de fagócitos pode contribuir a um aumento da suscetibilidade a determinadas infecções e infecções secundárias (BANDRES *et al.*, 1993; SHALEKOFF *et al.*, 1998). Como ocorre, por exemplo, em alterações hereditárias do complexo NADPH oxidase: a Doença Granulomatosa Crônica (DGC), é uma imunodeficiência primária que afeta fagócitos do sistema imune inato, e é caracterizada por uma susceptibilidade aumentada a infecções bacterianas e fúngicas graves, invariavelmente letais (SHALEKOFF *et al.*, 1998; BROWN, GRIENGLING, 2009; DRUMMOND *et al.*, 2011). A DGC pode ser causada por mutações em um dos quatro genes que codificam as subunidades na NOX2 de fagócitos, induzindo a ausência dessa subunidade ou a ausência da ativação do complexo (BROWN, GRIENGLING, 2009; DRUMMOND *et al.*, 2011).

Mas apesar da sua importância na eliminação de antígenos pelos fagócitos, as EROs representam uma família de moléculas que também estão envolvidas em processos fisiopatológicos (BABIOR, 1999; QUINN *et al.*, 2006). Por isso, a grande importância deste mecanismo é contraposta pela sua efetiva participação em doenças de cunho inflamatório. 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). Este é o caso da gênese e progressão de doenças como aterosclerose, doenças vasculares associadas ao diabetes, artrite reumatóide, falência renal, asma, colite ulcerativa, mal de Alzheimer, hipertensão, entre outras (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1990; CAVE, *et al.*, 2005; GROTE, *et al.*, 2006; BROWN, GRIENGLING, 2009; KLENIEWSKA *et al.*, 2012).

A NOX2 é expressa em níveis baixos na vasculatura durante a fisiologia normal, no entanto, sua expressão é aumentada em ambientes de risco cardiovascular, como hipertensão, diabetes e hiperlipidemia (KLENIEWSKA *et al.*, 2012). No sistema cardiovascular as EROs desempenham um papel fisiológico importante no controle da função endotelial, tônus vascular e função cardíaca e, um papel fisiopatológico na inflamação, hipertrofia, proliferação, apoptose, migração, angiogênese e rarefação, os quais contribuem para a disfunção endotelial e o remodelamento na hipertensão e outras doenças cardiovasculares. O aumento de  $O_2^{\cdot-}$  derivado de polimorfonucleares, e níveis plasmáticos elevados de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e 8-epi-isoprostanos, biomarcadores de peroxidação lipídica, são achados característicos em pacientes com doença cardiovascular e hipertensão. Além disso, pacientes hipertensos também exibem uma produção significativamente aumentada de  $H_2O_2$  (PARAVICINI, TOUYZ, 2008; KLENIEWSKA *et al.*, 2012; MONTEZANO, TOUYZ, 2012). Nestas condições, enquanto o óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) (importante

vasodilatador e regulador do tônus vascular; age no relaxamento da musculatura lisa vascular e na inibição da adesão plaquetária) é reduzido, a produção de EROs é aumentada, resultando na produção de peroxinitrito (PARAVICINI, TOUYZ, 2008; KLENIEWSKA *et al.*, 2012; MONTEZANO, TOUYZ, 2012). Na hipertensão, a atividade e os níveis de enzimas antioxidantes também se encontram reduzidas, incluindo SOD, glutathione-peroxidase e catalase. A diminuição dos níveis de vitaminas A, C e E também tem sido implicada nesta condição (PARAVICINI, TOUYZ, 2008; MONTEZANO, TOUYZ, 2012).

Em humanos, a importância da NADPH oxidase no estresse oxidativo, em doenças cardiovasculares, é suportada por estudos de Zalba e colaboradores (2005) que demonstraram que um polimorfismo nas subunidades da enzima está associado ao aumento da aterosclerose e hipertensão. Em particular, o polimorfismo na subunidade promotora p22phox (-930 A/G CYBA) pode ser um modelo de marcador genético associado à hipertensão (ZALBA *et al.*, 2005; PARAVICINI, TOUYZ, 2008; KLENIEWSKA *et al.*, 2012). Outro polimorfismo (C242T) também encontrado em CYBA, o gene humano que codifica a p22phox, apresentou potencial impacto na atividade de NADPH oxidase associada à hipertensão. Segundo Moreno e colaboradores (2006), pacientes hipertensos carregam prevalentemente o genótipo CC, sendo que o aumento da atividade da NADPH oxidase de fagócitos apresentou-se evidente nestes pacientes em relação a pacientes hipertensos que carregavam o genótipo CT ou TT. E tal polimorfismo exibiu características do estresse oxidativo mediado pela ativação da enzima, incluindo dano endotelial.

A obesidade também é um importante fator que contribui para o desenvolvimento da hipertensão e subsequente doença cardiovascular. Existe uma correlação positiva entre a obesidade e o estresse oxidativo, avaliado pelos níveis urinários de 8-epi-isoprostanos nestes pacientes (KEANEY *et al.*,

2003; FURUKAWA *et al.*, 2004; PARAVICINI, TOUYZ, 2008; MONTEZANO, TOUYZ, 2012). Além disso, pesquisas demonstraram que uma dieta adequada de 4 semanas realizada por pacientes obesos não diabéticos reduz tanto a produção de EROs por células inflamatórias, quanto marcadores do estresse oxidativo sistêmico, sem alterar os níveis plasmáticos de vitaminas antioxidantes. Portanto, a dieta pode atuar como modulador da geração de EROs, visto que o jejum causa uma diminuição aguda na produção destas espécies em indivíduos normais, enquanto a glicose induz ao aumento da produção de EROs por leucócitos (MOHANTY *et al.*, 2000; DANDONA *et al.*, 2001; KOKUBO *et al.*, 2005). Sabe-se também que, em condições como obesidade e diabetes tipo 2, a resistência a insulina pode contribuir para o estresse oxidativo. A administração de insulina em pacientes obesos não diabéticos diminui a produção de EROs e os níveis do inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1), assim como moléculas de adesão intercelular, sugerindo uma ação anti-inflamatória aguda deste hormônio (DANDONA *et al.*, 2001; PARAVICINI, TOUYZ, 2008).

A aterosclerose é uma das doenças mais comumente observadas no que diz respeito a geração excessiva de EROs nas células vasculares (KLENIEWSKA *et al.*, 2012). Nesta condição, o desequilíbrio entre  $\text{NO}^{\bullet}$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , induz a formação de  $\text{OONO}^{\bullet}$ , que participa da oxidação da lipoproteína de baixo peso molecular (LDL). A LDL oxidada aumenta a atividade da enzima e a expressão do mRNA de p22phox, o que acarreta na produção de mais EROs, na inibição de  $\text{NO}^{\bullet}$  e na oxidação de mais proteínas, inclusive LDL. A LDL oxidada também aumenta a expressão de moléculas de adesão (ICAM-1 e P-selectina) e melhora a adesão de monócitos nas células endoteliais. Esse aumento de células ativadas induz a uma inflamação local. O acúmulo de lipídeos nas paredes das artérias e a adesão plaquetária, são seguidos da formação de placas de ateroma (BAI *et al.*, 2009; KLENIEWSKA *et al.*, 2012).



### ***Inibidores da NADPH oxidase e o Ácido protocatecúico***

Inibidores de NADPH oxidase podem bloquear sua transferência de elétrons, podem remover e/ou prevenir o acesso à oxidase pela interação com suas subunidades a nível molecular, podem também reduzir a expressão da proteína e do gene da subunidade e modificar a enzima e/ou seus ativadores (SELEMIDIS *et al.* 2008; KLENIEWSKA *et al.*, 2012). No entanto, atualmente, não existe um inibidor de NOX específico potente e que seja capaz de inibir a produção de EROs em células que expressam NADPH oxidase e preparações de NADPH oxidase livre de células, sem que a produção de EROs por outras fontes, enzimáticas ou não enzimáticas, seja bloqueada (JAQUET *et al.*, 2009; DRUMMOND *et al.*, 2011). Há alguns anos, vários estudos incluem compostos que reduzem o estresse oxidativo através da inibição da produção de EROs pela NADPH oxidase, entre eles, o DPI (*diphenyleneiodonium chloride*), PR-39 (*proline-arginine-rich antimicrobial peptide*), AEBSF (*4-(2-aminoethyl)-benzenesulphonyl fluoride*, ou *Pefabloc*) e Apocinina (*40-hydroxy-30-methoxyacetophenone*). Outros inibidores peptídicos têm sido desenvolvidos como alvos específicos para a enzima. É o caso da gp91ds-tat (DRUMMOND *et al.*, 2011; KLENIEWSKA *et al.*, 2012).

DPI está entre os inibidores de NOX mais comumente estudados. Sua atividade está associada a inibição da flavoproteína, ou seja, atua na retirada de elétrons do transportador FAD, impedindo o fluxo de elétrons através do Flavocitocromo b<sub>558</sub>. No entanto, DPI não tem seletividade para uma isoforma concreta de NADPH oxidase. Ele inibe quase todas as isoformas da família NOX, além de ser inibidor de NADH desidrogenase, óxido nítrico sintetase, glicose fosfato desidrogenase, xantina oxidase, citocromo p450, entre outros (STUEHR *et al.*, 1991; O'DONNELL *et al.*, 1993; O'DONNELL, SMITH, JONES, 1994; DRUMMOND *et al.*, 2011; KLENIEWSKA *et al.*, 2012). Alguns pesquisadores têm observado que este inibidor estimula a captação de glicose nas células musculares esqueléticas e reduz o consumo de oxigênio

(HUTCHINSON *et al.*, 2007). Também pode ser usado como bloqueador neuroprotetor no tratamento de sintomas associados a injúria de reperfusão incluindo acidente vascular cerebral e hemorragia cerebral (LI *et al.*, 2006). No entanto, devido a seus efeitos potencialmente tóxicos e inespecíficos, é inadequado para utilização clínica (DRUMMOND *et al.*, 2011; KLENIEWSKA *et al.*, 2012).

PR-39 (peptídeo) é um inibidor de NADPH oxidase que se liga a p47phox inibindo sua ligação com p22phox. *In vivo*, estimula a angiogênese e tem efeito protetor contra isquemia. No entanto, por ser um peptídeo, seu uso é severamente restrito devido sua susceptibilidade de ligação com outras proteínas que contenham domínios SH3 (SHI *et al.*, 1996; KAWAHARA *et al.*, 2005; DRUMMOND *et al.*, 2011; KLENIEWSKA *et al.*, 2012).

AEBSF é um inibidor não peptídico que bloqueia a montagem da oxidase, impedindo a associação da p47phox com a NOX2. Este bloqueador inibe a produção de  $O_2^{\cdot -}$  dependente de NADPH oxidase de células da musculatura lisa vascular. Não se sabe se AEBSF inibe qualquer homólogo de NADPH oxidase e tampouco se possui efeitos citotóxicos, mas que é um inibidor não seletivo de serina protease e promove uma inibição irreversível destas (DIATCHUK *et al.*, 1997; BEDARD, KRAUSE, 2007; KAHLES *et al.* 2007; DRUMMOND *et al.*, 2011; KLENIEWSKA *et al.*, 2012).

Outro inibidor da montagem da NADPH oxidase é o Gp91ds-tat, um peptídeo de 18 aminoácidos que inibe NOX2 por mimetizar uma sequência dentro da enzima, inibindo sua ligação com p47phox. Não é um inibidor específico para um único isotipo de NOX e apresenta baixa biodisponibilidade oral, além de propensão para induzir respostas imunogênicas (DELEO *et al.*, 1995; REY *et al.*, 2001; DRUMMOND *et al.*, 2011; KLENIEWSKA *et al.*, 2012).

Outros inibidores de NADPH oxidase estudados são as estatinas, as quais inibem a síntese de duas substâncias cruciais para a fixação da Rac à membrana e a montagem da enzima. Também são capazes de diminuir a

expressão de p22phox e NOX1. No entanto, não são inibidores específicos de NADPH oxidase. Elas aumentam a expressão de eNOS e são mais efetivas no tratamento de doença cardiovascular, incluindo pacientes com níveis elevados de colesterol (BOKOCH, PROSSNITZ, 1992; WASSMANN *ET AL.* 2002; KLENIEWSKA *et al.*, 2012).

A apocinina, um composto pertencente à classe dos metóxi-catecóis, (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona), tem sido usada como um eficiente e não tóxico inibidor do complexo NADPH oxidase em muitos modelos experimentais envolvendo células fagocíticas. O mecanismo de inibição da enzima envolve o comprometimento da translocação do componente citosólico do complexo NADPH oxidase, p47phox, para a membrana. Em baixas concentrações, sua atividade não interfere em outros mecanismos de defesa dos polimorfonucleares, como a fagocitose e a morte intracelular (PETERS, HILTERMANN, STOLK, 2001; BARBIERI *et al.*, 2004; STEFANSKA, PAWLICZAK, 2008). Estudos reportam que o mecanismo de ação da apocinina envolve sua metabolização por meio da ação catalítica da MPO e a consequente geração de um produto dimérico. É este que impede a agregação e translocação dos componentes citosólicos do complexo NADPH oxidase para a membrana. *In vitro* e *ex vivo*, os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes da apocinina incluem: a redução do *burst* oxidativo dos fagócitos, a redução da ativação e da quimiotaxia de polimorfonucleares granulócitos (DODD-O *et al.*, 2004), inibição de  $\text{OONO}^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , inibição da destruição de cartilagem mediada por inflamação (LAFEBER *et al.*, 1999; HEUMÜLLER, *et al.*, 2008) e diminuição da expressão de selectinas (RUPIN *et al.*, 2004). Em células não fagocíticas atua como antioxidante e não como inibidor da NADPH oxidase (HEUMÜLLER *et al.*, 2008; DRUMMOND *et al.*, 2011; KLENIEWSKA *et al.*, 2012).

Um simples composto fenólico vem chamando a atenção pelo seu forte potencial antioxidante (UEDA *et al.*, 1996). O ácido protocatecúico (ácido 3,4-

hidroxibenzóico), um derivado do ácido benzóico, pode ser encontrado em frutas, castanhas, legumes, arroz integral, nozes, bebidas derivadas de plantas (por exemplo, chá, vinho de uva branca) e em medicamentos fitoterápicos (BABICH, SEDLETCAIA, KENIGSBURG, 2002). O ácido protocatecúico também pode ser isolado de algumas plantas, como *Hibiscus sabdariffa* (LIU *et al.*, 2002) e *Alpinia Oxyphylla* (SHI *et al.*, 2006).

Além de sua atividade antioxidante, o ácido protocatecúico apresenta propriedades anti-inflamatórias e analgésicas que são comparáveis a medicamentos já padronizados (LENDE *et al.*, 2011). Estudos realizados por Shi e colaboradores (2006) mostraram que após a administração do ácido protocatecúico em ratos idosos foi relatado um aumento da atividade de enzimas antioxidantes como SOD e glutathiona peroxidase (GSH-Px) (capazes de sequestrar ou prevenir a formação de EROs), redução significativa do nível de malondialdeído (MDA) e conseqüentemente, a diminuição da peroxidação lipídica. Entre outros efeitos antioxidantes, a mesma substância extraída de *Uncaria tomentosa* (planta nativa das montanhas do Peru) demonstrou inibir em até 50% a atividade genotóxica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (ROMERO-JIMÉNEZ *et al.*, 2005; ANTER *et al.*, 2011). O ácido protocatecúico é também um potente agente contra dano renal e lesão cardíaca associada a diabetes. Estudos mostraram que o tratamento com a substância diminuiu substancialmente os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , mediadores centrais para a produção de vários marcadores inflamatórios, como proteína C reativa (PCR) e fator de von Willebrand que, conseqüentemente, facilitam a progressão da inflamação, disfunção endotelial e da coagulação e, finalmente, exacerba a gravidade do diabetes (LIN *et al.*, 2009). A sepse também está associada com a indução de diversas citocinas, incluindo mediadores pró e anti-inflamatórios, sendo que a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias pode contribuir significativamente para a mortalidade. Yan e colaboradores (2004) observaram que o éster isopropil do ácido protocatecúico pode ser bastante

eficaz para tratar ou prevenir o choque séptico, já que demonstrou ser capaz de inibir os níveis de TNF- $\alpha$  e aumentar os níveis de IL-10. Ainda, estudos utilizando sistemas livres de células relataram a capacidade do ácido protocatecúico em inibir a peroxidação do ácido linoléico, a auto-oxidação do Fe<sup>2+</sup>, o dano oxidativo do DNA induzido pelo Fe<sup>2+</sup> e a quebra de cadeia do DNA pelo radical hidroxila. *In vitro*, o ácido protocatecúico é capaz de inibir a hemólise induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (UEDA, 1996; BABICH, SEDLETCAIA, KENIGSBURG, 2002). Além de retardar a invasão e a metástase em cinco tipos de células cancerosas e diminuir os níveis de secreção de determinadas citocinas como IL-6 e IL-8, seu potencial apoptótico foi avaliado e Yin e colaboradores (2009) relataram que o ácido protocatecúico, em concentração dose-dependente, é um potente agente anticâncer por causar apoptose.

Várias pesquisas sugerem que o ácido protocatecúico tem atividade tanto antioxidante quanto pró-oxidante (FUKUMOTO, MAZZA, 2000; MAKRIS, ROSSITER, 2001). Nakamura, Torikai e Ohigashi (2001), por meio de ensaios *in vivo* e *in vitro* utilizando pele de rato e células leucêmicas humanas HL-60, demonstraram que a tirosinase ativa o ácido protocatecúico a um composto reativo (provavelmente uma quinona), e este metabólito ativado, aparentemente, esgota a glutatona (GSH) intracelular, promovendo um distúrbio do sistema de desintoxicação celular e o estresse oxidativo, observado pelo aumento de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) - substâncias nocivas provenientes da peroxidação lipídica. Essa redução do nível de GSH ocorre na presença de altas concentrações do ácido protocatecúico. Em contrapartida, o tratamento com baixas dosagens induz efeito protetor, aumentando o nível de GSH (NAKAMURA *et al.*, 2000; NAKAMURA, TORIKAI, OHIGASHI, 2001; ANTER *et al.*, 2011). Portanto, além da lipofilicidade ser um fator importante na ação anti e pró-oxidante do ácido protocatecúico e derivados, seu efeito é dose-dependente e os dados aparentemente contraditórios da literatura sobre sua atividade biológica

podem refletir diferenças no delineamento experimental, especificamente na concentração utilizada (NAKAMURA *et al.*, 2000; NAKAMURA, TORIKAI, OHIGASHI, 2001; LIU *et al.*, 2002; BABICH, SEDLETCAIA, KENIGSBERG, 2002).

Além de outros pesquisadores (CARLOS *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2011; YOU, PARK, 2011), várias pesquisas vem sendo desenvolvidas no laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências de Bauru-UNESP e no laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, as quais demonstraram que a lipofilicidade de determinadas substâncias precursoras em relação a seus ésteres alquílicos pode ser um fator decisivo na ação antioxidante e no que diz respeito a inibição de NADPH oxidase de fagócitos (KANEGAE *et al.*, 2007; XIMENES *et al.*, 2010; FARIA *et al.*, 2012; PETRÔNIO *et al.*, 2013; PARACATU *et al.*, 2014 ). Além disso, várias evidências tem sido acumuladas no que diz respeito a hidrofobicidade dos ácidos fenólicos como sendo um fator decisivo em seus efeitos químicos e biológicos em relação a sua atividade anti-inflamatória, citotoxicidade para células tumorais, antimutagenicidade, antifúngica e efeitos anti-bacterianos (LINDENBAUM, 2001; FENG *et al.*, 2003; KUBO *et al.*, 2004; LOCATELLI *et al.*, 2008; MORAIS *et al.*, 2010; PARACATU *et al.*, 2014).

Compostos fenólicos apresentam grande potencial farmacológico em decorrência de suas propriedades anti e pró-oxidante e seus consequentes efeitos imunomodulatórios sobre diversas linhagens celulares. Chama a atenção o fato de que a lipofilicidade destas substâncias pode ser um fator decisivo em seus efeitos biológicos, mesmo quando o grupo oxidável dos mesmos não é alterado. Sendo assim, estudar os efeitos biológicos em leucócitos causados pelo aumento da lipofilicidade dos ésteres do ácido protocatecúico nos permite avaliar se essas substâncias são candidatas a possíveis agentes terapêuticos promissores no tratamento de doenças inflamatórias crônicas.

***Objetivos***

---

---

## **2. OBJETIVOS**

Estudar as alterações provocadas pela esterificação do ácido protocatecúico em suas propriedades antioxidantes e em seus efeitos biológicos nos leucócitos.

### **2.1. Objetivos específicos**

- I. Avaliar a ação antioxidante do ácido protocatecúico e seus derivados ésteres por meio de ensaios bioquímicos, livre de células
- II. Avaliar a capacidade de inibição das substâncias sobre a produção de EROs liberadas por leucócitos (neutrófilos e monócitos) ativados e o consequente efeito inibidor sobre a enzima NADPH oxidase.
- III. Avaliar o efeito das substâncias sobre a função efetora de fagócitos (Fagocitose).
- IV. Avaliar a possível capacidade imunorreguladora das substâncias em estudo, no que diz respeito a produção/inibição de citocinas pró e anti-inflamatórias.





### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Ética

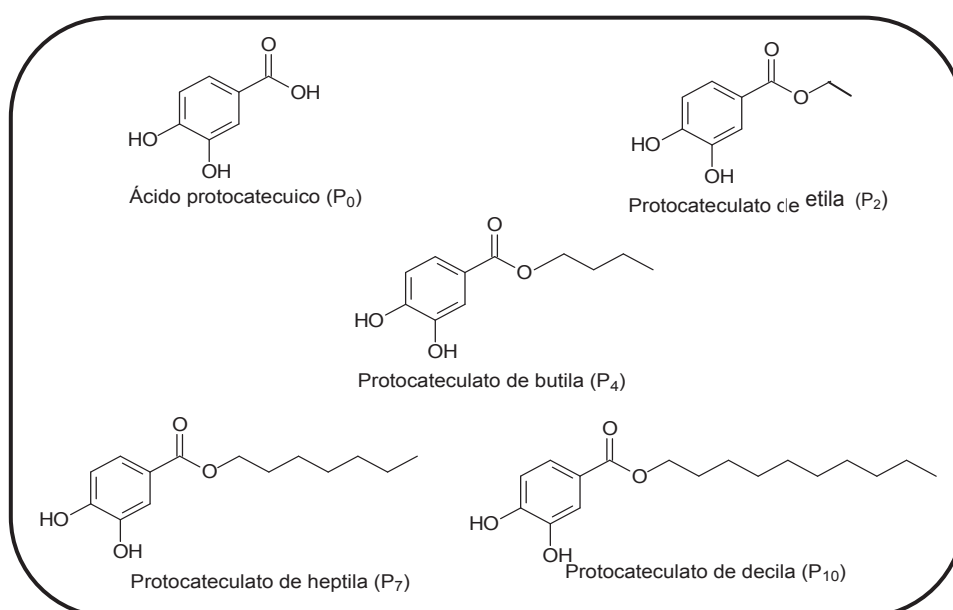
O protocolo de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara – UNESP, para a autorização da coleta de sangue dos voluntários e processamento das amostras para os experimentos *ex vivo*, nos quais se fez necessária a utilização de leucócitos e eritrócitos humanos. Um *pool* de soros também foi feito a partir desse material biológico coletado, para que fosse possível realizar a opsonização do zymosan, estímulo utilizado em alguns dos experimentos *ex vivo* que seguem descritos adiante (Protocolo de aprovação: CEP/FCF/Car nº 26/2011 - conforme documento apresentado no Apêndice 1).

#### 3.2. Casuística

Após esclarecimento do projeto de pesquisa, voluntários saudáveis com idade entre 25 e 45 anos foram submetidos à coleta do material biológico, sangue periférico. As amostras de sangue foram colhidas por punção venosa, utilizando-se sistema de coleta a vácuo ou seringas descartáveis, em tubos estéreis e descartáveis, contendo heparina, como anticoagulante. O volume de sangue colhido foi de 20 mL, destinado à separação de leucócitos e eritrócitos para análises realizadas em ensaios *ex vivo* (avaliação do efeito inibidor do ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos sobre a inibição da enzima NADPH oxidase e a produção de EROs, avaliação da inibição do dano oxidativo na membrana de eritrócitos pelas substâncias em estudo e cultura de células mononucleares). O soro obtido foi destinado à preparação do *pool*, como citado anteriormente.

### 3.3. Ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos

Os ésteres alquílicos (**Figura 3**) foram sintetizados a partir do ácido protocatecúico, pelo grupo de pesquisa da Profa. Dulce Helena Siqueira Silva do Departamento de Química do Instituto de Química – UNESP/Araraquara, e gentilmente fornecidos pela mesma.



**Figura 3.** Estrutura do ácido protocatecúico e seus derivados.

### 3.4. Estimação do logaritmo de coeficiente de partição (log P)

A hidrofobicidade molecular do ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos foram calculadas com base em seus valores de log P (coeficiente de partição em n-octanol/água), baseado no método de fragmentação de Crippen e realizada utilizando ChemDraw *software* (ChemDraw Ultra 7.0.1, CambridgeSoft), segundo Ghose e Crippen (1987).

### 3.5. Medidas de Voltametria Cíclica para determinação do potencial de redução

Estudos voltamétricos foram realizados em colaboração com a Dra. Maria Luiza Zeraik, sob supervisão do Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado, no laboratório de Grupo de Materiais Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos (GMEME), do Instituto de Química da USP de São Carlos. Os potenciais redox foram obtidos utilizando um potenciostato/galvanostato Autolab 30 PGSTAT (Eco-Chemie, Utrecht, Holanda). As curvas voltamétricas foram registradas à temperatura ambiente utilizando uma célula eletroquímica de compartimento único contendo três eletrodos: um eletrodo de referência de Ag/AgCl/KCl 3,0 molar, uma folha de platina de 0,5 cm<sup>2</sup> como contra eletrodos e um eletrodo de trabalho de carbono vítreo com 0,07 cm<sup>2</sup> de área geométrica. A janela de potencial usada foi de  $E_i = -0,2$  V,  $E_{inv1} = +1,3$  V e  $E_{inv2} = -1,2$  V.

A superfície do eletrodo de trabalho foi cuidadosamente polida com 0,5 µm de suspensão de alumina antes de cada experiência e completamente enxaguado com água destilada. Uma solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS) 0,2 M (pH = 7) foi usada como um eletrólito de suporte. As soluções foram purgadas com nitrogênio durante 5 minutos antes de gravar os voltamogramas. As soluções etanólicas (5 mM) das substâncias foram diluídas na célula eletroquímica em concentrações finais de 0,1 mM utilizando a solução de eletrólito de suporte. Os voltamogramas cíclicos foram registrados em uma velocidade de varredura de 5 mV/s.

### 3.6. Estudo do potencial antioxidante (redução do radical estável DPPH)

A capacidade sequestradora de radicais livres do ácido protocatecúico e seus ésteres foi determinada pelo seu potencial de redução sobre o radical *1-difenil-2-picrilhidrazil* (DPPH), como descrito por Brand-Williams, Cuvelier e

Berset (1995). As substâncias testadas foram incubadas durante 30 minutos, no escuro, em solução etanólica de DPPH (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA) (100 µM). A leitura da absorbância foi feita em comprimento de onda de 515 nm em espectrofotômetro UV-Mini 1240 em relação a um branco constituído de álcool etílico. Os experimentos foram efetuados em triplicata e o percentual de inibição do radical DPPH foi calculado tendo como referência o controle, o qual não teve a adição dos antioxidantes:

$$\frac{[(\text{absorbância do controle} - \text{absorbância da amostra}) / (\text{absorbância do controle})] \times 100}{100}$$

A partir dos valores das porcentagens de inibição foi calculado o IC<sub>50</sub> das amostras, ou seja, a capacidade da substância analisada de reduzir 50% do radical DPPH presente.

### **3.7. Estudo da ação redutora sobre o radical peroxila/(AAPH)**

Este experimento foi realizado segundo Campos e colaboradores (2004), com pequenas modificações e se baseia no decaimento da fluorescência da piranina quando submetido à oxidação por radicais peroxila, com o intuito de avaliar a ação redutora das substâncias sobre o radical gerado.

O composto fluorescente piranina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA) 5 µM foi incubado com AAPH (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA) (20 mM) em PBS (pH 7,4) a 37°C na ausência (controle) ou na presença do ácido protocatecúico e seus ésteres em poços de uma microplaca durante 3 horas. O volume final da reação foi de 300 µL. O decaimento de fluorescência da piranina foi monitorado utilizando um leitor de microplacas Spectramax M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) no comprimento de onda de excitação de 456 nm e comprimento de onda de emissão de 510 nm. A fase

de *lag* (tempo de indução) obtido quando os antioxidantes estavam presentes foi medida para várias concentrações de cada substância. Os *slopes* das curvas (fase *lag* versus a concentração) foram usados para medir a reatividade relativa das substâncias com os radicais peroxila derivados do AAPH. A capacidade antioxidante foi avaliada em função do tempo de indução, ou seja, o atraso no decaimento de fluorescência da piranina provocado pela presença das substâncias em estudo.

### **3.8. Inibição da hemólise oxidativa induzida por AAPH**

A avaliação do potencial de inibição do ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos no dano oxidativo na membrana de eritrócitos foi realizado a partir da reação com AAPH (2,2-azobis amidinopropano dihidroclorido), um azo composto hidrossolúvel, o qual se decompõe em temperatura fisiológica (37°C), gerando radicais 2-amidinopropil (C-radical) que, na presença de oxigênio molecular é convertido a radicais peroxila. A metodologia utilizada foi baseada nos estudos de Ko e colaboradores (1997) e Ximenes e colaboradores (2010).

O material biológico, sangue periférico, foi colhido por punção venosa, utilizando-se seringas descartáveis e agulhas descartáveis, em tubos cônicos estéreis e descartáveis contendo heparina como anticoagulante.

O material foi centrifugado (770 g durante 10 minutos) para que ocorresse a sedimentação das hemácias. O plasma e os leucócitos foram descartados e, três lavagens com PBS (pH 7,4) foram realizadas sob centrifugação de 770 g com duração de 10 minutos. Em seguida as hemácias foram ressuspendidas em PBS (pH 7,4) e uma solução de hemácias a 20% foi preparada.

Em microtubos, foram adicionados 500 µL da suspensão de hemácias a 20%, o ácido protocatecúico ou seus ésteres nas concentrações de 50 µM, 100 µM e 200 µM (com exceção dos controles positivos e negativo) e AAPH a

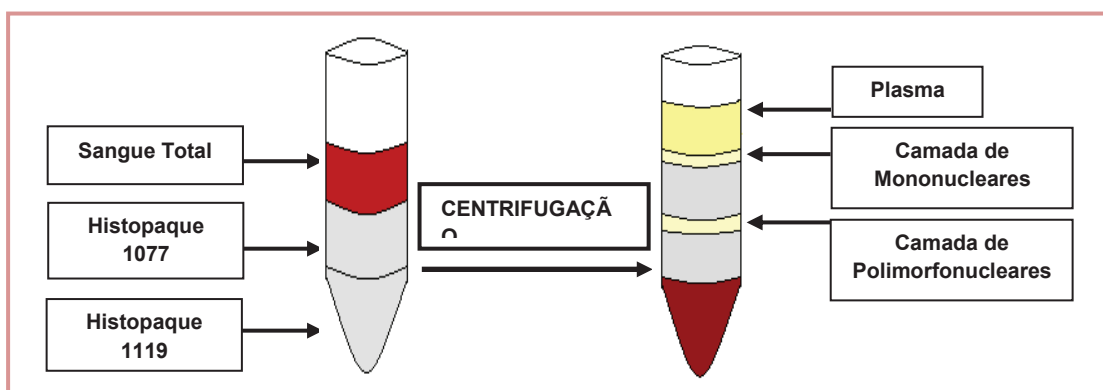
100 nM em PBS (com exceção do controle negativo). As amostras foram feitas em triplicata e os tubos mantidos em estufa de 37°C por 6 horas sob agitação. A cada 2 horas uma alíquota de cada tubo foi retirada e adicionada em tubo limpo contendo PBS (pH 7,4) (diluição 1:20). Centrifugou-se a 3000 x g, durante 10 minutos. Em seguida, 250 µL do sobrenadante foram transferidos para microplaca e a leitura foi feita a 540 nm em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices). Para o branco, foi utilizado PBS e os valores de referência (100% hemólise) foram determinados com a mesma alíquota de eritrócitos do controle negativo, o qual não apresentava o AAPH, porém, a diluição que antecede a leitura foi feita em água destilada, para provocar hemólise total dos eritrócitos. Ainda, durante a adição das substâncias, o mesmo volume de DMSO (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) (10 µL) foi adicionado aos controles negativos (sem AAPH) e controles positivos (com AAPH), no início do experimento, já que o ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos foram dissolvidos em DMSO.

### **3.9. Separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e neutrófilos polimorfonucleares (PMN)**

Assim como citado anteriormente, a coleta do sangue periférico foi feita por punção venosa, utilizando-se seringas descartáveis e agulhas descartáveis, em tubos cônicos estéreis e descartáveis contendo heparina como anticoagulante.

Conforme descrito por English e Andersen (1974), em um tubo cônico limpo e estéril de 15 mL foram adicionados cuidadosamente 3 mL de Histopaque 1119 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), 3 mL de Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) e 5 mL do sangue total do indivíduo. Centrifugou-se a 700 x g durante 30 minutos. O soro e o Histopaque foram desprezados utilizando uma pipeta Pasteur. Tanto a camada de células mononucleares quanto a de células polimorfonucleares

foram transferidas separadamente para dois novos tubos cônicos limpos e estéreis de 15 mL, aos quais foram adicionados 10 mL de PBS 10 mM, pH 7,4 e em seguida centrifugadas à 700 x g durante 10 minutos. Esta etapa corresponde a primeira lavagem. Após a centrifugação, o sobrenadante de ambos os tubos cônicos foi descartado. Dez mililitros de PBS foram adicionados e a centrifugação foi feita novamente a 700 x g durante 10 minutos (segunda lavagem). Desprezou-se o sobrenadante e as células foram ressuspendidas em 1,0 mL de PBS suplementado com cloreto de cálcio (1,0 mM), cloreto de magnésio (0,5 mM) e glicose (1,0 mg/mL). A **Figura 4** ilustra a metodologia utilizada para a separação de neutrófilos do sangue total através da centrifugação com o Histopaque de diferentes gradientes de densidade.



**Figura 4.** Demonstração ilustrativa da separação celular por Histopaque 1077 e 1119. Após a centrifugação ocorre a separação de determinadas linhagens celulares dando origem a uma camada de células mononucleares e a outra camada de células polimorfonucleares.

### 3.9.1. Contagem dos Neutrófilos em Câmara de Neubauer

Para a contagem das células na Câmara de Neubauer foi feita uma diluição 1/20, sendo 10 µL da solução contendo as células polimorfonucleares ou mononucleares e 190 µL do Líquido de Lázarus. Foram contadas as células presentes nos 4 quadrantes utilizados para a contagem de leucócitos



e partir do número de células contadas foi feito um ajuste para que estivessem presentes  $2,5 \times 10^6$  células/mL ou  $5 \times 10^6$  células/mL, de acordo com a necessidade de cada ensaio a que se destinavam o uso destas células.

### **3.9.2. Teste de viabilidade celular por exclusão do corante azul de Trypan**

O teste de viabilidade celular por exclusão do corante azul de Trypan, descrito por Strober (2001), foi realizado para a determinação das concentrações do ácido protocatecúico e de seus ésteres a serem utilizadas nos ensaios *ex vivo*, a fim de garantir que as células estivessem viáveis durante os ensaios na presença de determinadas concentrações das substâncias de estudo e evitar possível citotoxicidade devido a altas concentrações das mesmas. As células ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram incubadas em PBS (pH 7,4) na presença ou na ausência (controle da reação) do ácido protocatecúico e seus ésteres nas concentrações de 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 1  $\mu$ M. O ensaio foi realizado em três tempos diferentes: 30 minutos, 1 hora e 1 hora e 30 minutos de incubação. O volume final da reação foi de 250  $\mu$ L. Decorridos os tempos de incubação, 50  $\mu$ L da solução da reação foram adicionados a 20  $\mu$ L de solução azul de Trypan. Cem células foram contadas em câmara de Neubauer e a partir do resultado, obteve-se a porcentagem de células vivas (não coradas, portanto íntegras e viáveis) e mortas (aquelas que se apresentavam azuis, devido à permeabilização da membrana que permite a entrada do corante).

### **3.10. Determinação da produção do radical $O_2^{\cdot -}$ por leucócitos ativados (ensaio quimiluminescente dependente de Lucigenina)**

A determinação da produção do radical  $O_2^{\cdot -}$  por leucócitos ativados foi realizada de acordo com de Almeida e colaboradores (2011), a fim de avaliar

o efeito inibidor do ácido protocatecúico e seus ésteres sobre este radical e consequentemente sobre o complexo NADPH oxidase.

### **3.10.1. Preparação da suspensão e opsonização do Zymosan (10 mg/mL)**

Vinte miligramas de zymosan (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA) foram adicionados a um tubo cônico contendo 20 mL de PBS (pH 7,4). O tubo foi incubado em banho-maria durante 30 minutos, após fervura, para dissolução completa do zymosan. Em seguida, o tubo foi centrifugado por 5 minutos a 700 x g e o sobrenadante foi desprezado. Ao tubo, foi adicionado 1 mL de um *pool* de soro diluído em 1 mL de PBS (pH 7,4) e novamente deixado em banho-maria à 37°C. Decorridos 30 minutos, a mistura foi centrifugada a 200 x g durante 5 minutos a 0°C. Desprezou-se o sobrenadante, 20 mL de PBS (pH 7,4) foi adicionado e novamente submetido a centrifugação. Esta lavagem foi feita duas vezes. Em seguida, o sedimento foi ressuspenso em 2 mL de PBS (pH 7,4). Foram feitas alíquotas em microtubos que foram armazenados à -20°C até o momento do uso.

### **3.10.2. Ensaio de Quimiluminescência dependente de Lucigenina**

Em microplaca, células PMN e PBMC ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram pré-incubadas a 37°C durante 15 minutos em PBS suplementado na presença do ácido protocatecúico ou seus ésteres (concentrações finais de 10  $\mu$ M e 1  $\mu$ M). Em seguida, lucigenina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA) (10  $\mu$ M) e zymosan opsonizado (1,0 mg/mL) foram adicionados e a emissão de luz foi medida durante 30 minutos, a 37°C, utilizando um luminômetro de placas (Centro Microplate Luminometer LB960, Berthold Technologies, Oak Ridge, TN, USA). O volume final da reação foi de 250  $\mu$ L. A emissão de luz integrada foi utilizada como um parâmetro analítico para o  $O_2^{\cdot-}$  produzido pelas células estimuladas. O potencial de inibição foi calculado utilizando a área sob a

curva da emissão de luz gerada *versus* tempo, pelo controle positivo, no qual as células ativadas por zymosan foram incubadas na ausência das substâncias testadas.

### **3.11. Determinação da produção do radical $O_2^{\cdot-}$ por neutrófilos ativados (ensaio do WST-1)**

O ensaio foi realizado segundo Tan e Berridge (2000) com pequenas modificações a fim de determinar o potencial de inibição das substâncias sobre o  $O_2^{\cdot-}$  produzido por células ativadas. Para tanto, o WST, solúvel em água e impermeável a membrana, foi utilizado como sonda cromogênica. A produção de  $O_2^{\cdot-}$  foi determinada pela quantidade de formazana produzida a partir da decomposição da sonda pelo radical.

Em microplaca, células PMN ( $0,5 \times 10^6$  células/mL) foram pré-incubadas a  $37^\circ\text{C}$  durante 15 minutos em PBS suplementado na presença do ácido protocatecúico ou seus ésteres (concentrações finais de  $10 \mu\text{M}$  e  $1 \mu\text{M}$ ). Em seguida, WST-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) ( $500 \mu\text{M}$ ) foi adicionado à placa. PMA (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA) ( $100 \text{ nM}$ ) foi utilizado para estimular a produção do radical ânion superóxido pelas células e a redução do WST-1 foi medida espectrofotometricamente a  $450 \text{ nm}$  durante 30 minutos, a uma temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , utilizando um leitor de placas (SpectraMax M2, Molecular Devices). O potencial de inibição foi calculado utilizando a absorbância do controle, o qual as células foram estimuladas com PMA e incubadas na ausência das substâncias testadas.

### **3.12. Ensaio de redução do Nitro Azul de Tetrazólio (NBT)**

O ensaio de NBT foi realizado como descrito por Ciarlini e colaboradores (2005) com o objetivo de avaliar a inibição da produção de  $O_2^{\cdot-}$  pelas substâncias. O ensaio se baseia na redução do NBT pelo radical

produzido pelas células ativadas, para produzir cristais de formazana, os quais são visíveis a microscopia óptica. Em microtubos foram adicionados PBS (pH 7,4), células PMN ( $1 \times 10^6$  células/mL), o ácido protocatecúico ou seus ésteres (concentrações finais de 10  $\mu$ M e 1  $\mu$ M) e PMA (100 nM). A reação foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Decorrido este tempo, o NBT (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA) (1,22 mM) foi adicionado e uma incubação de 30 minutos foi realizada. Em seguida, 100  $\mu$ L da reação foram utilizados para fazer uma lâmina de CytoSpin (Cytospin, FANEM, SP, Brazil), através de centrifugação, a qual foi corada com corante hematológico (May Grounwald/Giemsa). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico com objetiva de imersão (100x). Cem células foram contadas, onde foram observadas as células positivas, as quais apresentavam grânulos escuros de formazana no seu citoplasma (NBT reduzido pelo radical ânion superóxido) e as células negativas, as quais não apresentavam esta granulação, em seguida foi feito um cálculo de porcentagem de inibição, para avaliar o efeito inibitório das substâncias sobre o  $O_2^{\cdot -}$  produzido; sempre levando em consideração a morfologia celular em relação aos controles positivo e negativo, os quais apresentavam ou não, o estímulo (PMA 100 nM), respectivamente.

### **3.13. Estudo da morfologia de neutrófilos ativados (Ensaio qualitativo)**

Em microtubos foram adicionados PBS (pH 7,4), células PMN ( $1 \times 10^6$  células/mL), o ácido protocatecúico ou seus ésteres (concentrações finais de 10  $\mu$ M e 1  $\mu$ M) e PMA (100 nM). Uma incubação de 30 minutos a temperatura ambiente foi realizada e em seguida, 100  $\mu$ L da reação foram utilizados para fazer uma lâmina em centrífuga Cytospin (Cytospin, FANEM, SP, Brasil). A coloração da lâmina foi feita com corante hematológico (May Grounwald/Giemsa). A leitura foi realizada em microscópio óptico com objetiva de imersão (100x). A morfologia celular (vacuolização, núcleo celular

e integridade da membrana celular) foi avaliada e comparada em relação aos controles positivo e negativo, os quais apresentavam ou não, o estímulo (PMA 100 nM), respectivamente.

### **3.14. Ensaio da xantina/xantina oxidase**

A determinação da inibição do  $O_2^{\cdot-}$  (pelas substâncias de estudo) produzido a partir da enzima xantina oxidase foi realizada utilizando o sal tetrazólio sulfonado (WST-1) como sonda cromogênica. Esse ensaio baseia-se na redução do WST-1 pelo radical liberado no meio, produzindo formazana solúvel, que pode ser medida por absorção a 450 nm, segundo Tan e Berridge (2000).

O ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos (10  $\mu$ M) foram incubados a 37°C em PBS (pH 7,4) com WST-1 (500  $\mu$ M) e xantina (100  $\mu$ M). A reação foi iniciada pela adição da xantina oxidase (0,05 u/mL) e a redução do WST-1 pelo  $O_2^{\cdot-}$  foi medida por espectrofotômetro em 450 nm durante 15 minutos a 37°C, utilizando um leitor de placa (SpectraMax M2, Molecular Devices). Para o branco, além das substâncias, a xantina oxidase também não foi adicionada.

O resultado foi obtido a partir da determinação da produção de  $O_2^{\cdot-}$  no controle positivo, ao qual não foi adicionada nenhuma das substâncias de estudo, em relação à inibição do radical nas amostras, onde as substâncias foram adicionadas a reação. E o resultado foi expresso a partir da cinética de produção do radical no tempo de 15 minutos.

### **3.15. Ensaio de consumo de oxigênio**

O ensaio foi realizado para avaliar a capacidade das substâncias em estudo de inibirem a produção de EROs a partir do monitoramento do decaimento do consumo de oxigênio, segundo Kanegae e colaboradores

(2007). Em resumo, este ensaio baseia-se na monitoração do oxigênio molecular consumido pela ativação do *burst* oxidativo em neutrófilos via eletrodo específico para oxigênio, sem a utilização de sondas cromogênicas, fluorescentes ou quimiluminescentes.

Em recipiente contendo PBS (pH 7,4) foram adicionadas  $1 \times 10^7$  células/mL (PMN) e o ácido protocatecúico ou seus ésteres alquílicos na concentração de 100  $\mu$ M. Em seguida, PMA (0,5  $\mu$ M) foi adicionado à reação para a estimulação das células. Rapidamente, um eletrodo específico para  $O_2$  dissolvido (Yellow Spring Instruments Model 5300 Biological Oxygen Monitor, Ohio, USA acoplado a um registrador Flatbed Recorder, Kipp & Zonen, Holanda) foi inserido e o monitoramento do consumo de oxigênio foi feito durante 20 minutos, sob agitação. Um controle positivo (isento da adição de qualquer substância em estudo) foi realizado, para que pudéssemos observar o consumo total de oxigênio na reação a fim de calcularmos a diferença da concentração de  $O_2$  dissolvido no meio, em ambas as situações e, determinar a capacidade de inibição da produção de EROs do ácido protocatecúico e seus ésteres. Os resultados foram expressos como consumo de oxigênio dissolvido por tempo.

### **3.16. Avaliação do efeito inibidor sobre a produção de ácido hipocloroso (HOCl) por neutrófilos ativados**

A fim de avaliarmos o efeito inibidor das substâncias em estudo sobre a produção do HOCl, foi realizado um ensaio onde a quantidade de HOCl produzido foi medido pela quantidade de taurina-cloramina produzida após reação da taurina com o ácido hipocloroso liberado no meio. A taurina-cloramina é capaz de oxidar o TMB, revelador utilizado neste ensaio. Em microtubos, foram adicionados PBS (pH 7,4) contendo taurina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA) (10 mM), as células PMN ( $1 \times 10^6$  células/mL) e o ácido protocatecúico ou seus ésteres (10  $\mu$ M e 1  $\mu$ M). Uma pré-incubação

foi realizadas em estufa de 37°C, durante 15 minutos. Em seguida, as células foram estimuladas com PMA (100 nM) e nova incubação em estufa de 37°C foi realizada, durante 30 minutos com homogeneização dos tubos a cada 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de catalase (20 µg/mL) e os tubos foram centrifugados a 300 x g. Duzentos microlitros do sobrenadante foram transferidos para uma placa de 96 poços e 50 µL de uma solução de TMB a 10 mM foram adicionados. A leitura foi realizada a 655 nm. O potencial de inibição foi calculado em relação a medida da quantidade de taurina cloramina produzida no controle, no qual as células foram incubadas na ausência das substâncias testadas.

Como controle adicional, num ensaio puramente químico, foi avaliado o efeito sequestrador direto (de HOCl) do ácido protocatecúico e seus ésteres sobre a taurina cloramina quimicamente produzida por HOCl. Para isso, em microplaca foram adicionados PBS (pH 7,4) contendo taurina 10 mM e HOCl (40 µM) para produção de taurina cloramina. As substâncias testadas (50 µM) foram adicionadas ao meio e a reação foi incubada por 30 minutos a 37°C. Em seguida, o TMB foi adicionado e foi feita a leitura a 655 nm. A diminuição da absorbância foi medida e comparada com a do controle, o qual foi incubado na ausência das substâncias testadas.

Por fim, para ambos os ensaios, os resultados foram expressos pela porcentagem de inibição do HOCl produzido em relação ao controle, ao qual nenhuma das substâncias de estudo foram adicionadas.

### **3.17. Produção de HOCl: MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sistema livre de células)**

#### **Avaliação do efeito inibidor sobre a ação clorinante da enzima mieloperoxidase (MPO)**

A medida da produção de HOCl pela oxidação do cloreto catalisada pela MPO foi baseada na reação do HOCl com taurina, para produzir taurina cloramina, a qual oxida o TMB. O experimento foi realizado de acordo com

Ximenes e colaboradores (2009). Em placa de 96 poços, onde foram adicionados PBS (pH 7,4) contendo taurina (5 mM), o ácido protocatecúico ou seus ésteres nas concentrações de 10  $\mu$ M e MPO (Planta Natural Products, Vienna, Austria) (50 nM).

As reações foram desencadeadas pela adição de  $H_2O_2$  (50  $\mu$ M). A placa foi deixada sob agitação durante 5 minutos e em seguida realizou-se uma incubação de 25 minutos a 37°C. O volume final da reação foi de 200  $\mu$ L. Decorrido o tempo de incubação, as reações foram interrompidas pela adição de catalase (20  $\mu$ g/mL) e o acúmulo de taurina cloramina foi medido após a adição de 50  $\mu$ L da solução de TMB a 10 mM. A leitura foi feita espectrofotometricamente a 655 nm utilizando um leitor de placas (SpectraMax M2, Molecular Devices). A capacidade de inibição da atividade clorinante (consequente inibição da produção de ácido hipocloroso) da MPO foi calculada considerando-se a quantidade de taurina cloramina produzida em relação ao controle, ao qual as substâncias testadas não foram adicionadas. Uma curva padrão foi gerada pela adição de HOCl em PBS contendo taurina e usada para calcular a quantidade de HOCl produzido pela MPO.

### **3.18. Atividade clorinante da MPO: Ensaio amperométrico**

A fim de eliminar uma possível interferência com qualquer sonda cromogênica, o consumo de  $H_2O_2$  pela atividade catalítica da MPO foi monitorado usando um detector amperométrico e um biossensor específico para peróxido de hidrogênio (TBR 4100 Free Radical Analyzer, World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA). O experimento foi realizado segundo Zeraik e colaboradores (2012). Em recipiente contendo PBS 0,1 M (pH 7,4) as substâncias (na concentração de 10  $\mu$ M) foram adicionadas juntamente com MPO (Planta Natural Products, Vienna, Austria) (50 nM). A reação foi iniciada pela adição de  $H_2O_2$  (50  $\mu$ M) a 25°C e o eletrodo foi



rapidamente inserido ao meio. O monitoramento do consumo de  $H_2O_2$  foi feito durante aproximadamente 10 minutos. Os resultados foram expressos como consumo de  $H_2O_2$  por tempo.

### **3.19. Determinação da inibição da produção de peróxido de hidrogênio extracelular por Amplex<sup>®</sup> Red**

Este ensaio teve como objetivo avaliar o potencial de inibição das substâncias em estudo, sobre o  $H_2O_2$  extracelular liberado por polimorfonucleares (PMN) e células mononucleares do sangue periférico (PBMC) ativadas utilizando o Amplex<sup>®</sup> Red (*10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine* – Invitrogen, Eugene, Oregon, USA), uma sonda altamente estável e sensível que, na presença de uma peroxidase, é capaz de reagir com  $H_2O_2$ , resultando num produto vermelho altamente fluorescente, a resorufina.

Baseada na metodologia descrita por Rinaldi e colaboradores (2007), em microplaca, foram adicionados PBS suplementado com cloreto de cálcio (1,0 mM), cloreto de magnésio (0,5 mM) e glicose (1,0 mg/mL) e  $1 \times 10^5$  células/mL (PMN ou PBMC), as quais foram incubadas na presença do ácido protocatecúico ou seus ésteres alquílicos, ou ainda, na ausência destes (controle positivo e negativo). A incubação foi mantida durante 15 minutos em estufa a 37°C. Em seguida, as células foram estimuladas com PMA (0,5  $\mu$ M) (com exceção do controle negativo) e o Amplex Red (0,5 mM) foi adicionado. A leitura foi realizada em leitor de placas (Synergy Hybrid Reader, Biotek) durante 30 minutos em excitação e emissão máxima de 530/590 nm.

Para PBMC, HRP (*Horseradish Peroxidase* - Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA) (0,1  $\mu$ M) foi adicionada antes da incubação devido a quantidade reduzido de MPO presente nesta célula.

### **3.20. Determinação da inibição de peróxido de hidrogênio intracelular Ensaio de dihidrorodamina 123 (DHR) por citometria de fluxo**

A avaliação da inibição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular produzido por neutrófilos e monócitos ativados com PMA ou *Staphylococcus aureus* foi realizada utilizando o DHR (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA), o qual pode ser oxidado por peróxido de hidrogênio produzindo rodamina 123, que é altamente fluorescente e pode ser detectada por citometria de fluxo. O ensaio foi realizado de acordo com Richardson e colaboradores (1998) e algumas modificações.

A coleta do material biológico (sangue periférico) foi feita com material estéril e descartável, em tubos contendo heparina. Estes foram submetidos à contagem de células através de um contador automático (Abbott Cell-Dyn CD-1700 Hematology Analyzer).

O sangue total foi adicionado à placa, de modo que cada poço apresentasse 3x10<sup>5</sup> leucócitos/mL. Em seguida, o ácido protocatecúico ou seus ésteres foram adicionados e uma incubação de 30 minutos foi feita em estufa a 37°C. Os estímulos, PMA (2 µM) ou *Staphylococcus aureus* (na proporção de 10 microrganismos para 1 célula), foram adicionados e foi feita uma incubação de 20 minutos nas mesmas condições anteriores. Posteriormente, o DHR (20 µg/mL) foi adicionado. O volume final da reação totalizou 100 µL, sendo que a quantidade suficiente para tal volume foi completada com PBS (pH 7,4). Decorridos 7 minutos de incubação a 37°C, fez-se uma lavagem com *Staining Buffer* (PBS 7,4 acrescido de 1% de SFB e 0,1% de azida sódica), onde uma centrifugação foi feita a 630 x g durante 7 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as hemácias foram lisadas com BD FACS<sup>™</sup> *Lysing Solution*, permanecendo na ausência de luz durante 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, duas lavagens foram realizadas utilizando *Staining Buffer*. As células foram ressuspensas em 300 µL da mesma solução e este volume resultante em cada poço da placa foi

transferido para seus respectivos tubos com filtro, específicos para citometria de fluxo, preparados previamente. A aquisição pelo citômetro de fluxo FACS LRS II Fortessa (BD Biosciences) foi realizada em seguida, de acordo com os seguintes parâmetros: as células foram analisadas de modo que as populações de monócitos e neutrófilos estivessem delimitadas através de *gates*, utilizando como parâmetros o tamanho (*forward scatter*, FSC) e a granulosidade celular (*side scatter*, SSC). Foram salvos 2000 eventos no *gate* de monócitos e os dados obtidos foram analisados no *software FlowJo*. Os resultados foram expressos pela Média de Intensidade de Fluorescência (MFI, *mean fluorescence intensity*) e porcentagem de células produtoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A partir destes, o cálculo de porcentagem de inibição foi determinado pelo resultado de cada amostra em relação a seu controle. Sendo que este último foi isento da adição das substâncias em estudo. Um controle negativo para cada reação também foi realizado, o qual foi isento da adição tanto das substâncias em estudo quanto de qualquer estímulo, a fim de verificarmos a produção espontânea de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelas células. Os valores obtidos nesta produção espontânea foram descontados durante as análises no *software FlowJo*.

### **3.21. Ensaio de fagocitose por citometria de fluxo**

O ensaio do DHR nos possibilitou avaliar conjuntamente a atividade fagocítica de neutrófilos estimulados com *Staphylococcus aureus* conforme descrito por Hasui e colaboradores (1989). Portanto, foi possível determinar se o tratamento prévio com o ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos poderia resultar numa possível inibição ou interferência desta função efetora. Para tanto, vale ressaltar que no ensaio descrito no item 3.20. foram utilizadas bactérias *Staphylococcus aureus* marcadas com iodeto de propídio. A bactéria marcada com iodeto de propídio foi cedida ao grupo de pesquisa da Dra. Patricia Palmeira do Laboratório de Investigação Médica (LIM-36) do

Instituto da Criança do Hospital das Clínicas – FMUSP pela Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera do Departamento de Clínica Médica – VCM da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. A eficácia da marcação bacteriana foi previamente confirmada pelo grupo de pesquisadores do LIM-36, por citometria de fluxo e microscopia confocal confirmando a presença de *S. aureus* no interior dos fagócitos. Os núcleos dos fagócitos foram marcados em azul com fluorocromo DAPI (4-6-diamidino-2-fenilindol) e as bactérias em vermelho com iodeto de propídio (resultados não mostrados).

A fagocitose de *S. aureus* por neutrófilos ativados foi avaliada juntamente ao ensaio de DHR e, portanto as células foram delimitadas através de *gates*, utilizando como parâmetros o tamanho (*forward scatter*, FSC) e a granulosidade celular (*side scatter*, SSC). Os resultados foram expressos pela Média de Intensidade de Fluorescência (MFI, *mean fluorescence intensity*), que corresponde à média da quantidade total de bactérias internalizadas por cada célula e pela porcentagem, que corresponde à quantidade de células com capacidade fagocítica. A partir destes, o cálculo de porcentagem de inibição da fagocitose foi determinado pelo resultado de cada amostra em relação a seu controle (estimulado com *S. aureus*). Sendo que este último foi isento da adição das substâncias em estudo. Um controle negativo para cada reação também foi realizado, o qual foi isento da adição das substâncias em estudo e da bactéria, a fim de descartarmos qualquer fluorescência espontânea das células, durante as análises no *software FlowJo*.

### **3.22. Cultura de células mononucleares**

A coleta do sangue periférico foi feita em tubos contendo heparina e as células mononucleares foram separadas por gradiente de densidade (Histopaque 1077, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA). Em placas de 12

*wells*, as células ( $1 \times 10^6$  células/mL por poço) foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco<sup>®</sup>, Life Technologies, Foster City, CA, USA) suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) a 10% (Sigma, St. Louis, MO, USA). As placas foram mantidas em estufa de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, *overnight*, para aderência dos monócitos à sua superfície. No segundo dia, foi feita uma lavagem para a retirada das células não aderidas à placa e o meio (RPMI-1640 + SFB) foi trocado. As substâncias de estudo, o ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos nas concentrações de 20 µM e 70 µM, foram adicionados a seus respectivos poços (com exceção dos controles positivo e negativo) e as placas foram mantidas novamente em estufa de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Decorridas 5 horas de incubação as células foram estimuladas com *Staphylococcus aureus* (na proporção de 10 microrganismos para 1 célula), com exceção do controle negativo, o qual foi composto apenas de monócitos e isento de qualquer substância de estudo. Novamente as placas foram mantidas em estufa de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C e após 18 horas os sobrenadantes foram transferidos para microtubos estéreis e estocados a -80°C, para posterior dosagem de citocinas.

### **3.23. Quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias (ELISA)**

A quantificação de citocinas foi realizada para avaliar possível ação imunorreguladora das substâncias em estudo. As citocinas pró- e anti-inflamatórias, TNF- $\alpha$  e IL-10, foram quantificadas por Ensaio Imunoenzimático (ELISA) utilizando o kit BD OptEIATM Human TNF ELISA Set (Cat. N° 555212) e BD OptEIATM Human IL-10 ELISA Set (Cat. N° 555157), respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, anticorpos monoclonais específicos para TNF- $\alpha$  ou IL-10 (anticorpos de captura) foram adsorvidos em placas de microtitulação contendo 96 *wells* (3590, Corning, NY, USA) e deixadas *overnight* a 4°C, em

câmara úmida. Cada etapa do ensaio foi precedida por 4 lavagens com solução de PBS pH 7,4-Tween 20 a 0,1% (PBS-T). Tampão de Bloqueio (PBS, pH 7,4 + 10% de BSA) foi adicionado às placas e estas mantidas a temperatura ambiente durante 1 hora. Tanto a curva padrão de TNF- $\alpha$  quanto a de IL-10 foram diluídas seriadamente nas placas e os sobrenadantes das culturas de monócitos (mencionados acima) foram diluídos quando necessário. Decorrido o tempo de incubação (2 horas, a 37°C) para a ligação das citocinas a seus anticorpos de captura específicos, o anticorpo detector conjugado com streptavidina-HRP foi adicionado à placa. Após 1 hora de incubação o substrato (TMB) foi adicionado à placa, o qual produziu uma coloração azul diretamente proporcional a quantidade de citocinas presentes nas amostras. A reação foi interrompida após 30 minutos com uma solução de Ácido Sulfúrico 2,5 N, o qual promoveu a mudança de coloração do meio para amarelo, e a intensidade dessa coloração foi medida espectrofotometricamente a 450 nm utilizando um leitor de placas (LabSystems, Finland).

As densidades ópticas foram calculadas através da interpolação com a curva padrão e os resultados expressos em pg/ml.

### **3.24. Análises Estatísticas**

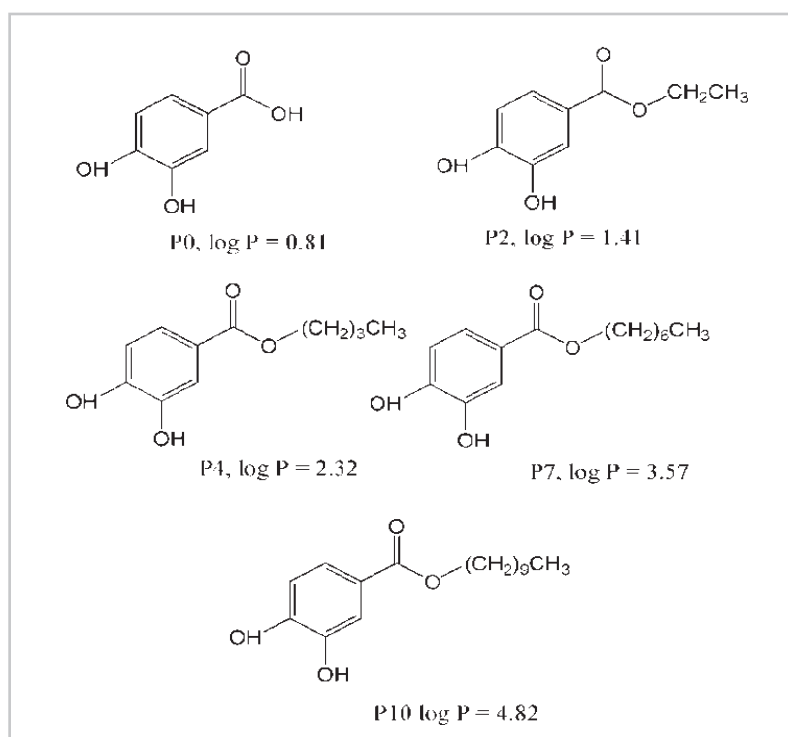
Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Durante os ensaios, todas as amostras foram testadas em duplicata ou triplicata e cada ensaio repetido pelo menos 3 vezes. Para os ensaios com leucócitos foram utilizadas amostras de doadores de sangue diferentes. A diferença estatística foi determinada por One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey, utilizando o controle como uma referência. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Estimação do logaritmo de coeficiente de partição (log P)

Na procura de uma relação entre a atividade estrutural do ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos e sua capacidade de inibição do *burst* oxidativo em leucócitos, os ésteres do ácido protocatecúico contendo 4 (P4), 7 (P7) e 10 (P10) carbonos, foram sintetizados e purificados utilizando reações de esterificação padrão. Este procedimento foi realizado no NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais), do Instituto de Química – UNESP, sob orientação da Profa. Dulce Helena Siqueira Silva e fornecidos pela mesma. O protocateculato de etila (etil-3,4-diidroxibenzoato) comercializado pela Sigma Chemical (St. Louis, MO), identificado como P2, também foi utilizado neste estudo.



**Figura 5.** Estimação do logaritmo de coeficiente de partição (log P). Estrutura molecular do ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos, e seus índices de hidrofobicidade (log P).



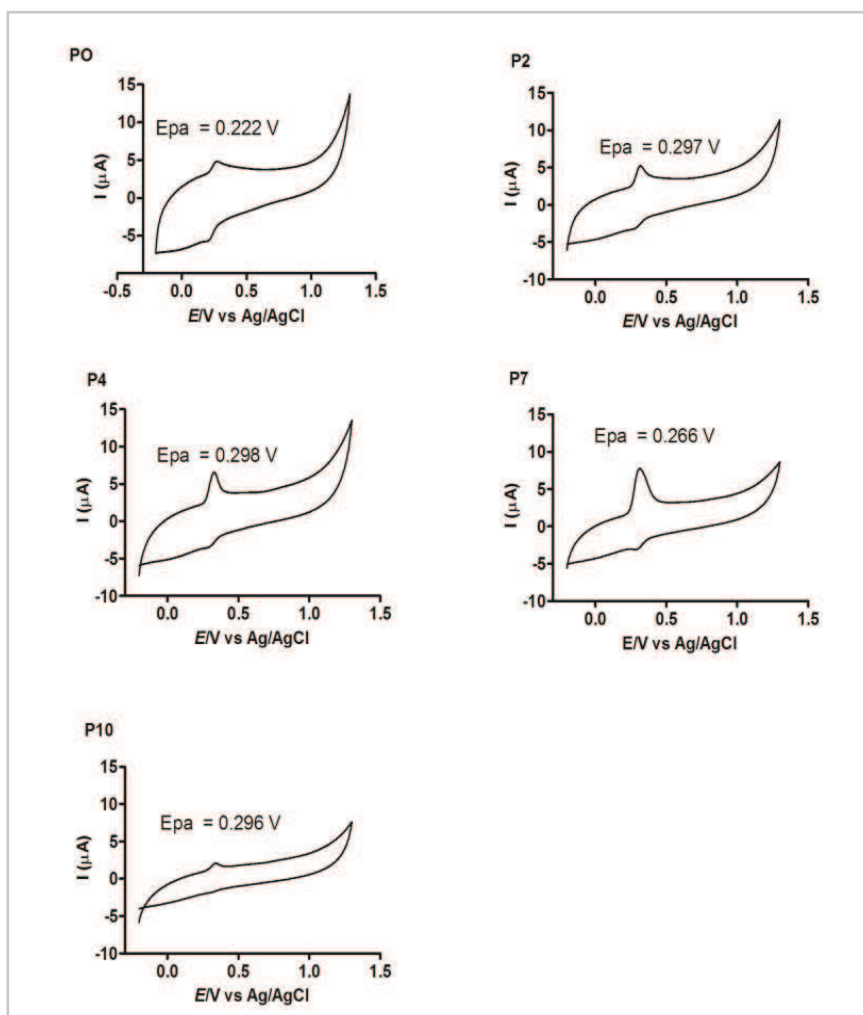
Na **Figura 5**, é possível observar que a esterificação do ácido protocatecúico provocou uma alteração significativa na hidrofobicidade calculada pelo Log P (coeficiente de partição n-octano/água) (Ghose, Crippen, 1987).

#### **4.2. Medidas de Voltametria Cíclica para determinação do potencial de redução**

O ácido protocatecúico e seus ésteres foram investigados por voltametria cíclica utilizando um eletrodo de trabalho de carbono para identificar a correlação entre o potencial antioxidante, medido pelo potencial do pico anódico (Epa) e a inibição de NADPH oxidase e/ou atividade anti-radicais livres. Portanto, as substâncias foram diluídas na célula eletroquímica e foi feita uma varredura para avaliar o potencial antioxidante pela medida do potencial de Epa utilizando um potencial elétrico (pulso elétrico).

Os voltamogramas cíclicos (**Figura 6**) dos ésteres obtidos em pH 7,0 mostram um pico anódico bem definido, no intervalo entre 0,222 e 0,298 V.

A alquilação do ácido protocatecúico provocou um aumento da hidrofobicidade das substâncias, de modo que o aumento das cadeias carbônicas determinou o aumento do valor de log de P, onde P10 apresentou o resultado mais significativo (log P = 4,82). No entanto, essa esterificação não induziu um aumento significativo do potencial de redução das substâncias, de modo que os resultados apresentados não determinaram diferenças entre os ésteres.



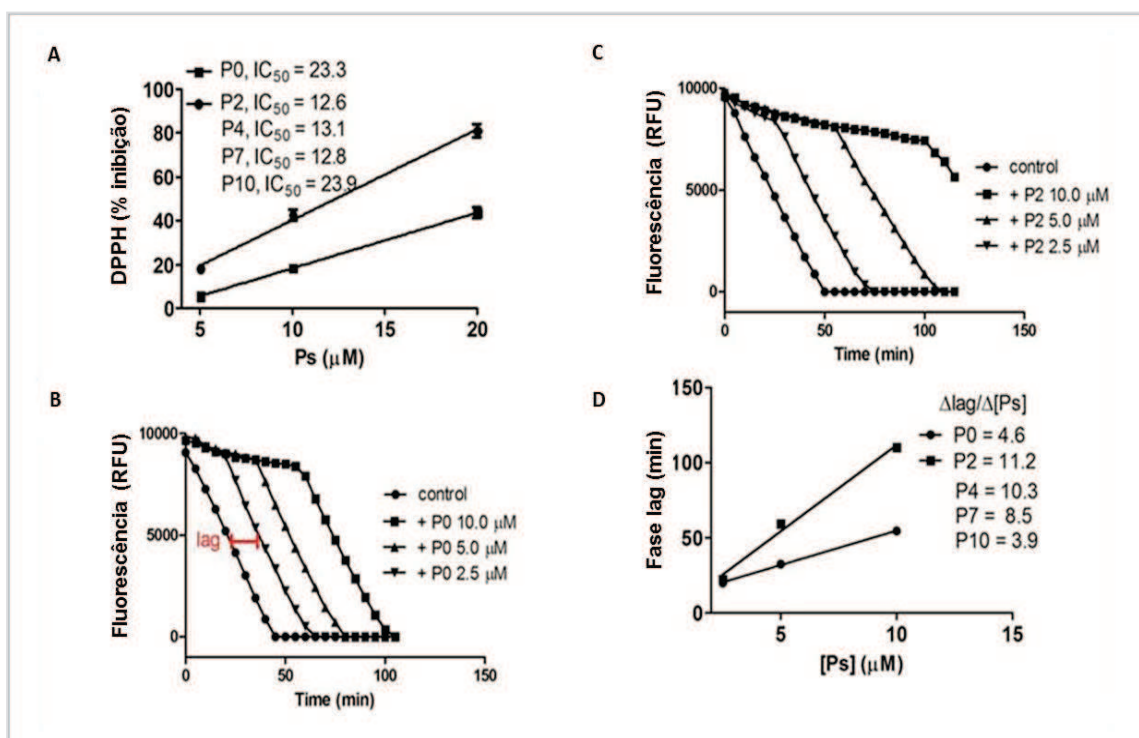
**Figura 6.** Medida de voltametria cíclica para obtenção do potencial de redução. Voltametria Cíclica para o ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos obtida em PBS (pH 7,0). Pulso com amplitude de 50 mV, incremento de potencial de 0,45 mV e varredura de potenciais à 5 mV s<sup>-1</sup>. Potencial inicial de -0,2 V e potencial final de 1,5 V.

#### 4.3. Estudo do potencial antioxidante: redução do radical estável DPPH e estudo da ação redutora sobre o radical peroxila/(AAPH)

Embora o potencial de oxidação não tenha sido significativamente alterado, como mostraram os resultados de voltametria cíclica, o aumento da hidrofobicidade dos ésteres provocou um aumento da sua eficiência como sequestradores de radicais livres, quando comparado ao seu precursor. Os resultados apresentados na **Figura 7A** mostram que, com exceção do P10,

os ésteres foram duas vezes mais eficientes do que o ácido em relação a capacidade sequestradora do radical estável DPPH.

A reatividade do ácido protocatecúico e seus ésteres com os radicais peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ) derivados do AAPH também foi estudada. O azo-composto AAPH se decompõe a uma temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , em solução aquosa, para gerar um radical alquila ( $\text{R}^\bullet$ ), que na presença de oxigênio molecular é convertido a  $\text{ROO}^\bullet$  (NIKI, 1990). A intensidade de fluorescência diminui à medida que ocorre a decomposição da piranina (uma sonda fluorescente) pelos radicais, no entanto, a presença de um antioxidante promove o retardo desse processo, por sequestrar os radicais livres ( $\text{ROO}^\bullet$ ) responsáveis pelo mecanismo de degradação da sonda. Neste ensaio, a reatividade relativa dos antioxidantes com os radicais peroxila foram avaliados pela fase *lag* no decaimento da fluorescência da piranina (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER, BERSET, 1995). As **Figuras 7B e 7C** mostram o decaimento da fluorescência da piranina provocada pela sua oxidação por  $\text{ROO}^\bullet$  na ausência (controle) ou na presença do P0 e P2. A relação linear entre a fase *lag* e a concentração das substâncias testadas foi usada para medir sua reatividade com  $\text{ROO}^\bullet$ . Ainda, o *slope* (inclinação) da curva é proporcional à eficiência do antioxidante como sequestrador de  $\text{ROO}^\bullet$ . A **Figura 7D** mostra a correlação linear entre concentração e fase *lag* para P0 e P2, e os *slopes* ( $\Delta\text{lag}/\Delta[\text{Ps}]$ ) para todas as substâncias testadas. Como pode ser observado, com exceção ao P10, os ésteres também foram mais eficientes como sequestradores de  $\text{ROO}^\bullet$  quando comparados ao ácido precursor. A menor eficiência do P10 pode ser explicada pela sua baixa solubilidade em solução aquosa.



**Figura 7.** Ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos como sequestradores de radicais livres. **A)** redução do radical estável DPPH; **B,C)** Decaimento da fluorescência da piranina por radicais peroxila e a fase *lag* provocada pela adição de P0 e P2; **D)** Correlação entre a fase *lag* e a concentração das substâncias. Os resultados são a média e o desvio padrão das triplicatas. Ps: ácido protocatecúico e seus ésteres.

#### 4.4. Inibição da hemólise oxidativa induzida por AAPH

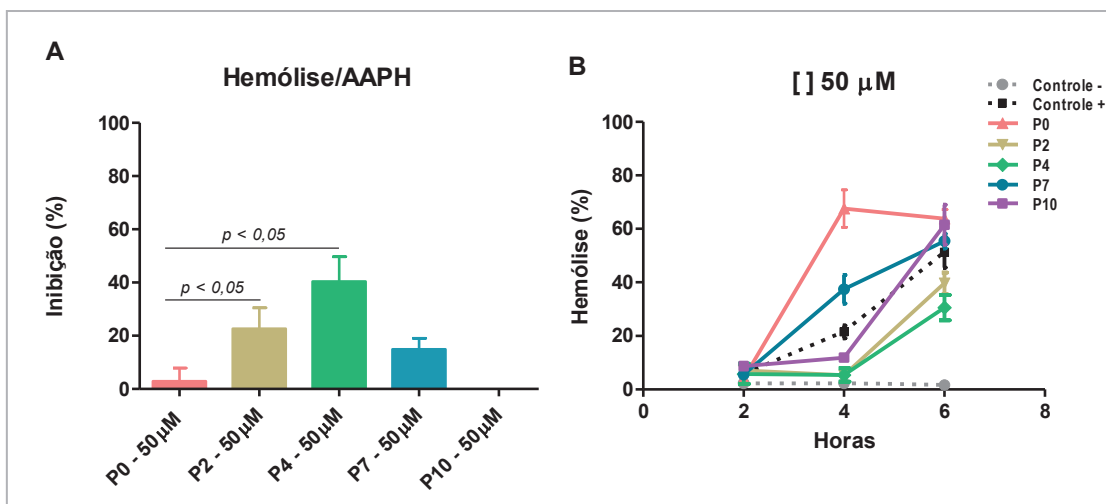
A fim de complementarmos nossos resultados obtidos anteriormente em ensaios de avaliação do potencial antioxidante do ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos, decidiu-se estudar o efeito protetor destas substâncias frente a hemólise de eritrócitos induzida por AAPH. Sabendo que este azo composto se decompõe a 37°C, produzindo radicais peroxila ( $ROO^{\cdot}$ ), os quais podem induzir a hemólise de eritrócitos (SCHMITZ *et al.*, 2008; XIMENES *et al.*, 2010), avaliamos o efeito protetor das substâncias de estudo em três concentrações diferentes para observarmos se estas são capazes de sequestrar os radicais livres produzidos durante a reação e retardar o processo hemolítico.

Uma suspensão de hemácias a 20%, foi incubada com o ácido protocatecúico ou seus ésteres nas concentrações de 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$  (com exceção dos controles positivo e negativo) e AAPH a 100 nM (com exceção do controle negativo). A incubação foi mantida por 6 horas a 37°C sob agitação, porém a cada 2 horas uma alíquota foi retirada de cada tubo e uma leitura foi feita a 540 nm em espectrofotômetro.

A porcentagem de inibição da hemólise foi calculada tomando como referência a hemólise total (100%) causada pela incubação dos eritrócitos em água gelada ao invés de PBS. Por sua vez, o cálculo de porcentagem de hemólise foi realizado tomando como referência a hemólise causada pela amostra contendo AAPH em PBS.

Assim como o aumento da hidrofobicidade dos ésteres provocou um aumento da eficiência como sequestradores de radicais livres, neste ensaio, o aumento as cadeias carbônicas, ou seja, a esterificação do ácido protocatecúico, também induziu maior proteção em relação ao seu ácido precursor, quanto à hemólise de eritrócitos. Ainda, podemos observar nas **Figuras 8, 9 e 10** que este efeito é dose dependente.

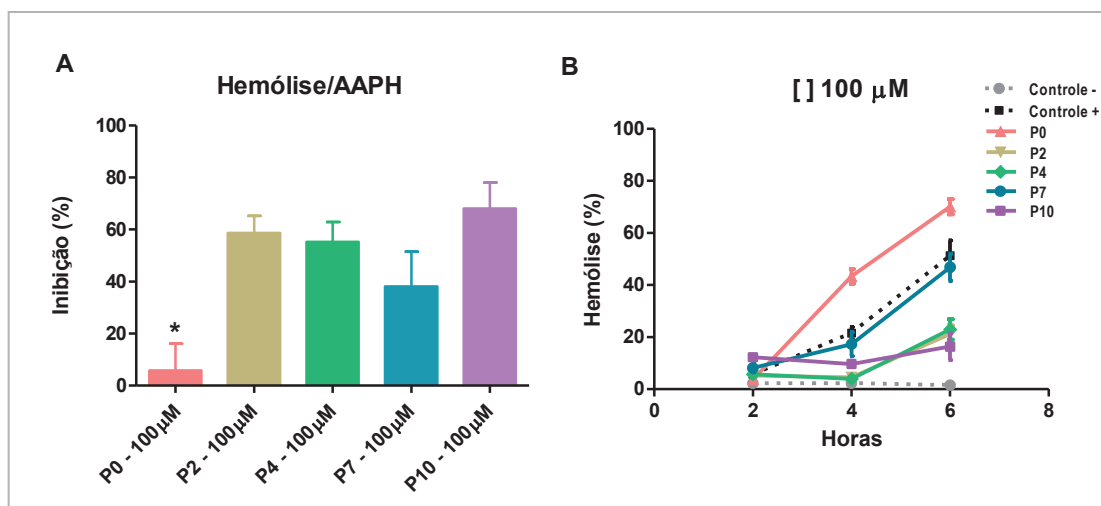
A **Figura 8A** mostra que os ésteres P2 e P4 tiveram maior atividade protetora do que seu ácido precursor ( $p < 0,05$ ). Embora os valores de inibição não tenham chegado a 50% quando a suspensão de hemácias foram tratadas com as substâncias a 50  $\mu\text{M}$ , P4 mostrou ser significativamente melhor inibidor da hemólise quando comparado aos outros ésteres nesta mesma concentração ( $p < 0,05$ , dados não mostrados). Na **Figura 8B**, apesar de ser observada hemólise de apenas aproximadamente 5% para P2 e P4 e, 12% para P10 após 4 horas de incubação, estes ésteres não foram capazes de manter o efeito protetor após 6 horas. P0 e P7 mostraram valores de hemólise maiores que o controle positivo após 4 horas, demonstrando uma possível indução da hemólise nesta concentração. Após 6 horas, os valores se equivalem ao do controle positivo.



**Figura 8.** Inibição da hemólise oxidativa induzida por AAPH. Ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos na concentração de 50 µM. Suspensão de hemácias a 20% na presença de AAPH a 100 nM foi incubada durante 6 horas a 37°C com as substâncias de estudo a 50 µM. **A)** Porcentagem de inibição da hemólise de eritrócitos após 6 horas de incubação tomando o controle positivo como referência. Os dados representam a média e o desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. (One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey). **B)** Cinética da hemólise oxidativa induzida por AAPH após 2, 4, e 6 horas de incubação a 37°C e o efeito protetor das substâncias. Resultados correspondem a média e desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Controle negativo (ausência de AAPH), controle positivo (presença de AAPH).

Para os ensaios utilizando o ácido protocatecúico e seus ésteres na concentração de 100 µM (**Figura 9A**), observamos que os últimos apresentaram melhores resultados de proteção quando comparados com seu ácido precursor ( $p < 0,05$ ). E quando comparamos os resultados obtidos entre os ésteres, os únicos que apresentaram diferença significativa entre eles são P7 e P10 ( $P7 < P10$ , onde  $p < 0,05$ , resultado não mostrado). Quanto à cinética mostrada na **Figura 9B**, P0 ainda demonstra porcentagem de hemólise maior que o controle positivo em 4 horas de incubação. Na presença de P2, P4 e P10 observou-se baixa porcentagem de hemólise após 4 horas, porém não foram capazes de manter estes valores após 6 horas de incubação, mostrando aproximadamente metade da porcentagem de hemólise obtida no controle positivo. E na presença de P7 houve baixa eficiência em relação aos

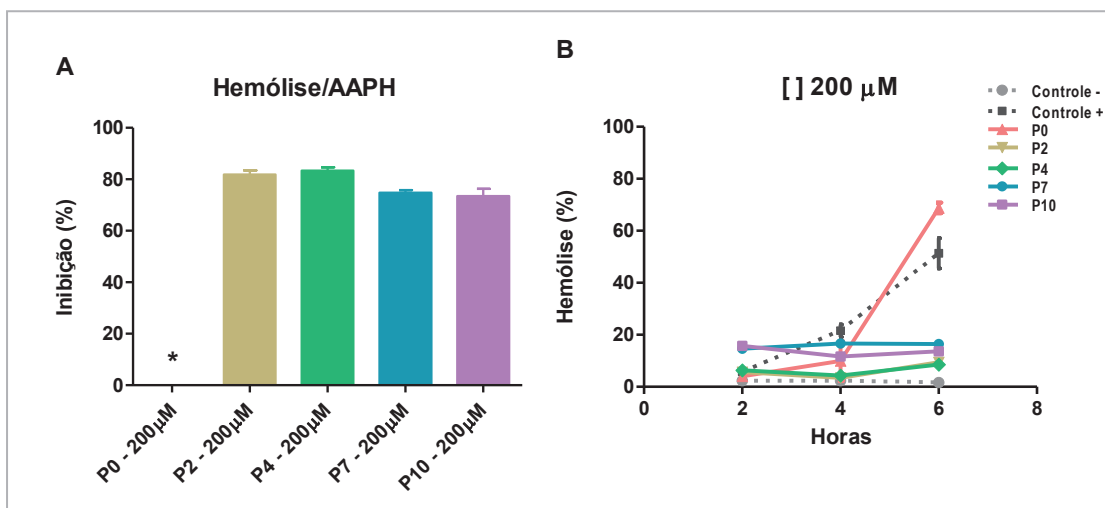
ésteres citados acima, tanto após 4 horas quanto após 6 horas de incubação a 37°C.



**Figura 9.** Inibição da hemólise oxidativa induzida por AAPH. Ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos na concentração de 100 µM. Suspensão de hemácias a 20% na presença de AAPH a 100 nM foi incubada durante 6 horas a 37°C com as substâncias de estudo a 100 µM. **A)** Porcentagem de inibição da hemólise de eritrócitos após 6 horas de incubação. Os dados representam a média e o desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. \*: valor significativamente menor quando comparado aos ésteres ( $p < 0,05$ ). (One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey). **B)** Cinética da hemólise oxidativa induzida por AAPH após 2, 4, e 6 horas de incubação a 37°C e o efeito protetor das substâncias. Resultados correspondem a média e desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Controle negativo (ausência de AAPH), controle positivo (presença de AAPH).

Na **Figura 10A** observamos que todos os ésteres do ácido protocatecúico em 200 µM foram mais eficazes na inibição da hemólise induzida por AAPH quando comparado ao seu precursor (P0), com diferença significativa de  $p < 0,05$ . A análise estatística também mostrou diferença significativa dos resultados obtidos entre os ésteres, após 6 horas de incubação, onde P2 e P4 apresentaram melhor potencial de inibição em relação a P7 e P10 ( $p < 0,05$ ). Em concordância, a cinética (**Figura 10B**), mostrou que estes resultados também ocorreram anteriormente, ou seja, após 4 horas de incubação, onde P2 e P4 apresentaram hemólise de apenas 4%, e

P7 e P10, aproximadamente o dobro deste valor. P0 também demonstrou atividade semelhante a estes dois últimos ésteres, porém não foi capaz de manter o efeito protetor após 6 horas de incubação.



**Figura 10.** Inibição da hemólise oxidativa induzida por AAPH. Ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos na concentração de 200 µM. Suspensão de hemácias a 20% na presença de AAPH a 100 nM foi incubada durante 6 horas a 37°C com as substâncias de estudo a 200 µM. **A)** Porcentagem de inibição da hemólise de eritrócitos após 6 horas de incubação. Os dados representam a média e o desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. \*: valor significativamente menor quando comparado aos ésteres ( $p < 0,05$ ). (One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey). **B)** cinética da hemólise oxidativa induzida por AAPH após 2, 4, e 6 horas de incubação a 37°C e o efeito protetor das substâncias. Resultados correspondem a média e desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Controle negativo (ausência de AAPH), controle positivo (presença de AAPH).

#### 4.5. Teste de viabilidade celular por exclusão do corante azul de Trypan

Após a separação celular, realizada a partir de dois gradientes de densidades diferentes (Histopaque 1077 e 1119), para a separação de células polimorfonucleares (PMN) e células mononucleares do sangue periférico (PBMC), como mostra a **Figura 4** em “Materiais e Métodos”, realizou-se o ensaio de viabilidade celular, o qual nos garantiu definir as concentrações adequadas do ácido protocatecúico e seus ésteres para sua utilização nos

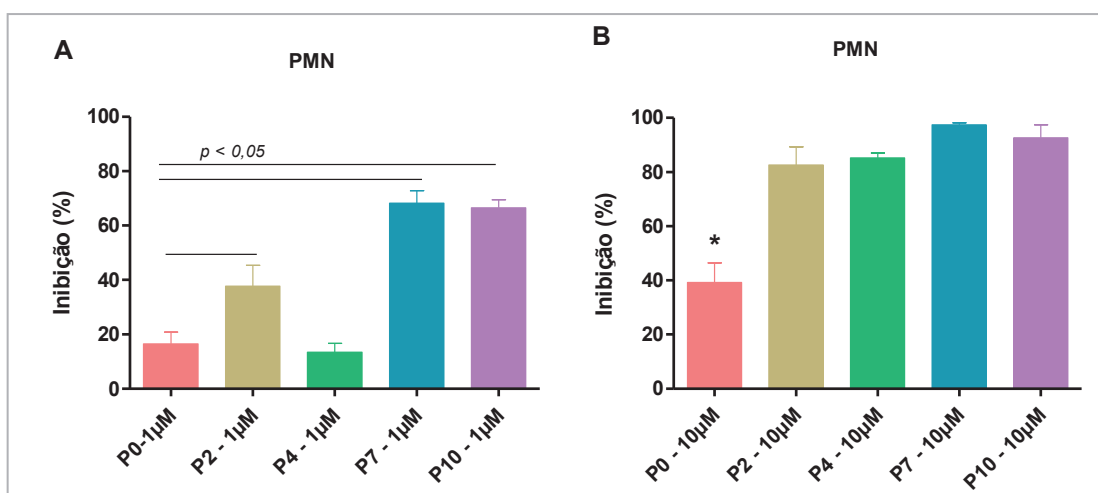


ensaios com células. Para ambas as populações celulares, as substâncias foram testadas nas concentrações de 100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$  para um total de  $1 \times 10^6$  células/mL, e revelaram não serem citotóxicas, garantindo resultados de 97% e 98% de viabilidade celular na maior concentração testada (100  $\mu\text{M}$ ), com exceção do P7 e P10. Portanto, decidiu-se utilizar inicialmente, nos ensaios que se seguiram, as concentrações de 10  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$  para todas as substâncias, por terem apresentado viabilidade celular entre 97% e 99% para os três tempos do ensaio (30 minutos, 1 hora, 1 hora e 30 minutos).

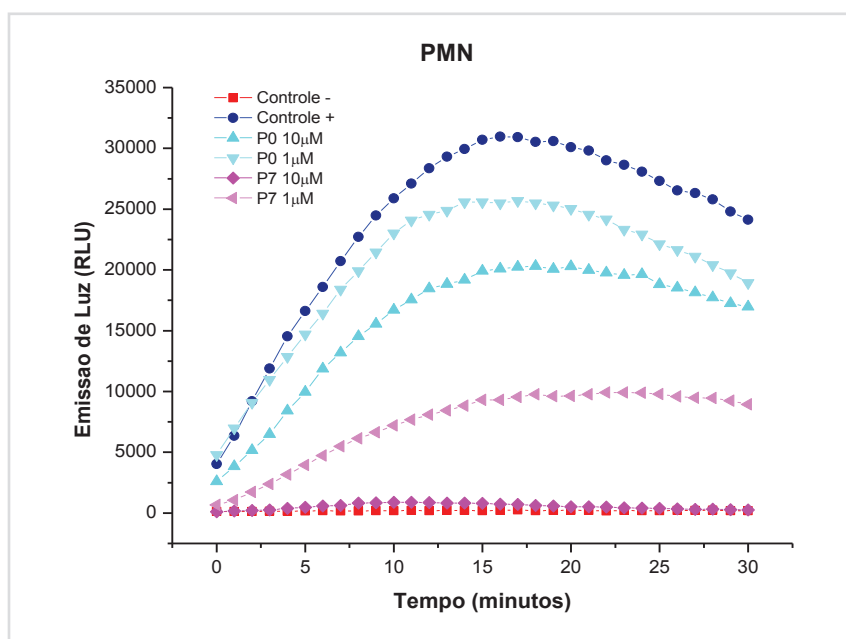
#### **4.6. Determinação da produção do radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ por leucócitos ativados (ensaio quimiluminescente dependente de Lucigenina)**

A quimiluminescência dependente de lucigenina é um ensaio utilizado especificamente para quantificação da geração de ânion superóxido no *burst* oxidativo de neutrófilos e outras células (GASBARRINI *et al.*, 1998; ALVES *et al.*, 2003). Nesta reação, o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  reduz a lucigenina produzindo um radical cátion, o qual reage com um segundo  $\text{O}_2^{\cdot-}$  para formar uma molécula de dioxetano rica em energia, a qual se decompõe, emitindo luz (MÜNZEL *et al.*, 2002).

Os resultados apresentados na **Figura 11** mostram a porcentagem de inibição do ácido protocatecúico e seus ésteres, nas concentrações de 1  $\mu\text{M}$  (**Figura 11A**) e 10  $\mu\text{M}$  (**Figura 11B**), sobre a produção do radical ânion superóxido por PMN ativados com zymosan (resultado obtido pela leitura da emissão de luz gerada pela decomposição da lucigenina, proporcional a quantidade de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  gerado no meio). O ácido protocatecúico mostrou uma capacidade de inibição menor quando comparado com seus ésteres, para as duas concentrações testadas, sendo que os resultados apresentados pelos ésteres mostraram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao seu precursor, com exceção do P4 na concentração de 1  $\mu\text{M}$ .

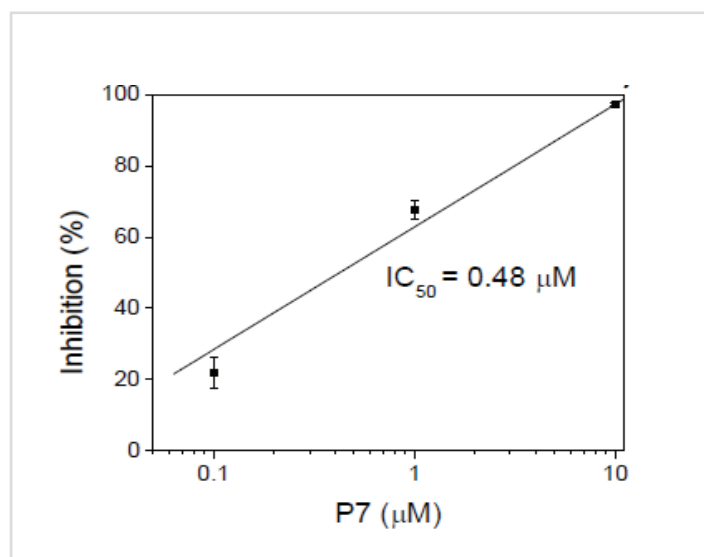


**Figura 11.** Ácido protocatecuico e os seus ésteres alquílicos como inibidores de  $O_2^{\cdot -}$  produzidos por PMN estimulados com zymosan. Inibição da quimiluminescência dependente de lucigenina.  $1 \times 10^6$  células/mL foram pré-incubadas em PBS suplementado (pH 7,4) com as substâncias testadas durante 10 minutos. As reações foram iniciadas pela adição de 1,0 mg/mL de zymosan opsonizado. Os dados representam a média e desvio padrão de pelo menos 3 experimentos diferentes realizados em duplicata. **A)** Ácido protocatecuico e seus ésteres alquílicos testados nas concentrações de 1  $\mu$ M e **B)** 10  $\mu$ M. \*: valor significativamente menor quando comparado aos ésteres ( $p < 0,05$ ). (One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey).



**Figura 12.** Cinética da emissão de luz (RLU) no tempo de 30 minutos para o ácido protocatecuico e seu éster alquílico (P7) nas concentrações de 10  $\mu$ M e 1  $\mu$ M. Células polimorfonucleares (PMN).

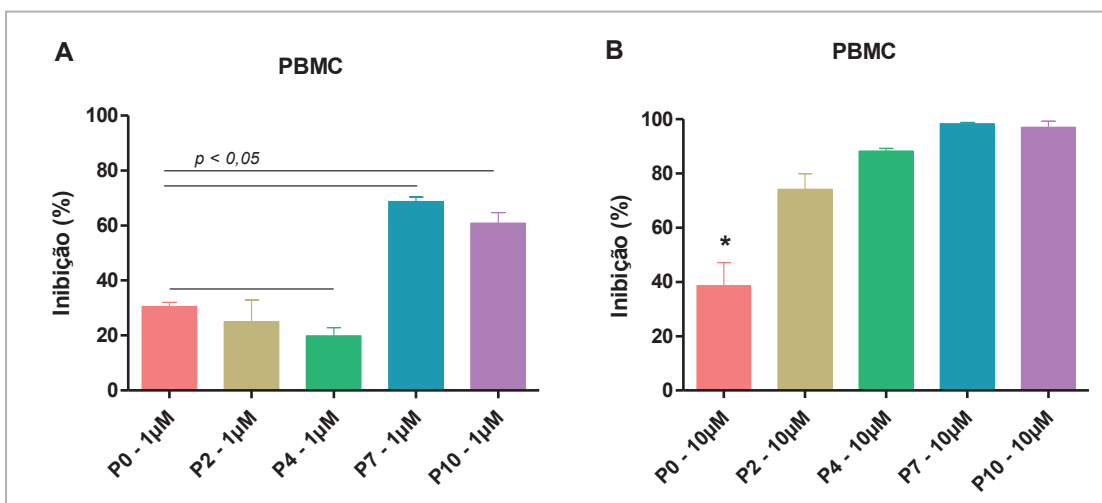
A **Figura 13** mostra a concentração inibitória ( $IC_{50}$ ) para o P7, em células PMN.



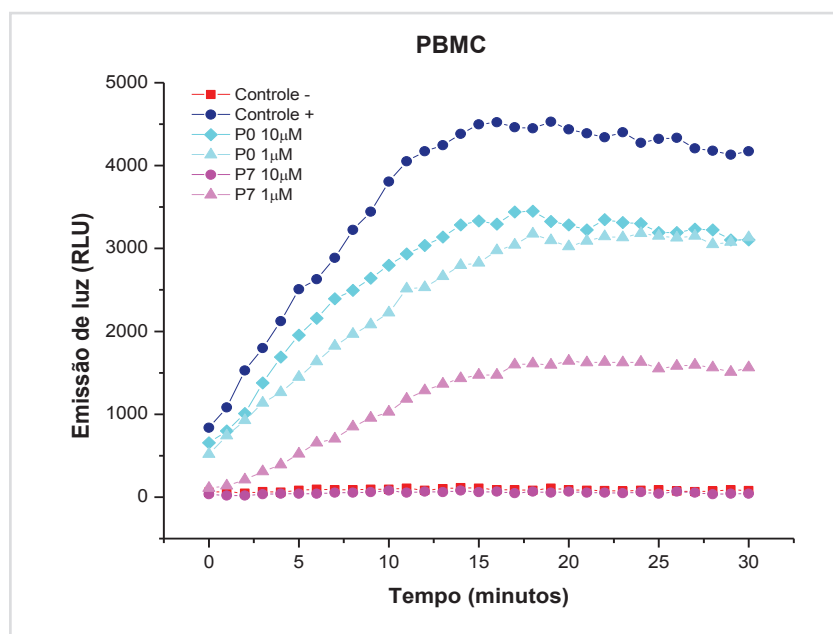
**Figura 13.** Concentração inibitória ( $IC_{50}$ ) para o protocatelato de heptila (P7) em células PMN. Resultado obtido a partir das concentrações de 10, 1 e 0,1  $\mu\text{M}$  utilizadas no ensaio de quimiluminescência dependente de lucigenina.

Resultados similares foram obtidos para PBMC, mostrados na **Figura 14A** e **14B**, onde os ésteres também demonstraram maior eficiência na inibição do  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Lembrando que os efeitos inibitórios não foram resultado de um efeito citotóxico sobre os leucócitos, como verificado pelo ensaio de exclusão com Azul de Trypan, já que na maior concentração utilizada para os estudos de leucócitos, a viabilidade celular foi maior que 97%.

A **Figura 15** mostra a cinética da emissão de luz no tempo de 30 minutos, tanto para o ácido protocatecúico quanto para seu éster P7, no ensaio realizado com PBMC, o qual apresentou resultados similares ao ensaio realizado com células PMN.



**Figura 14.** Ácido protocatecuico e os seus ésteres alquílicos como inibidores de  $O_2^-$  produzidos por PBMC estimulados com zymosan. Inibição da quimiluminescência dependente de lucigenina.  $1 \times 10^6$  células/mL foram pré-incubadas em PBS suplementado (pH 7,4) com as substâncias testadas durante 10 minutos. As reações foram iniciadas pela adição de 1,0 mg/mL de zymosan opsonizado. Os dados representam a média e desvio padrão de pelo menos 3 experimentos diferentes realizados em duplicata. **A)** Ácido protocatecuico e seus ésteres alquílicos testados nas concentrações de 1  $\mu$ M e **B)** 10  $\mu$ M. \*: valor significativamente menor quando comparado aos ésteres ( $p < 0,05$ ). (One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey).



**Figura 15.** Cinética da emissão de luz (RLU) no tempo de 30 minutos para o ácido protocatecuico e seu éster alquílico (P7) nas concentrações de 10  $\mu$ M e 1  $\mu$ M. Células mononucleares do sangue periférico (PBMC).

Ainda com relação ao ensaio de quimiluminescência dependente de lucigenina, o gráfico de cinética (**Figura 12**) mostra a emissão de luz (RLU) no tempo de leitura de 30 minutos (para células PMN) para o ácido protocatecúico e o P7, o qual mostrou melhores resultados de inibição em relação ao seu precursor, do que os outros ésteres. É possível observar que P7 na concentração de 10  $\mu\text{M}$  inibiu significativamente a emissão de luz em relação ao ácido a 10  $\mu\text{M}$ , sendo o resultado muito similar ao controle negativo, o qual não apresentava nenhuma substância e nem o estímulo (zymosan). O mesmo ocorreu com a substância na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , onde a emissão de luz para P7 foi menor quando comparada ao ácido, mostrando que ainda em baixas concentrações, o éster apresenta maior capacidade de inibição do  $\text{O}_2^{\cdot-}$  quando comparado ao ácido precursor na concentração de 10  $\mu\text{M}$ .

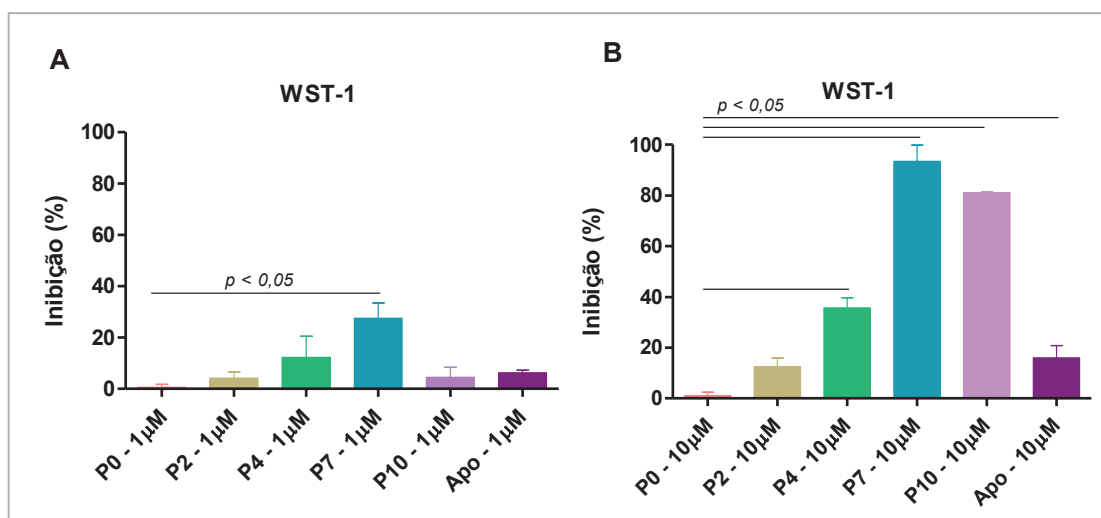
#### **4.7. Determinação da produção do radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ por neutrófilos ativados (ensaio do WST-1)**

Considerando a semelhança na capacidade de inibição do ânion superóxido entre P7 e P10, no entanto, a baixa solubilidade aquosa para P10, decidiu-se realizar um ensaio de confirmação desses resultados em relação à inibição da produção do radical por células PMN ativadas.

Para este propósito, o sal tetrazólio sulfonado (WST-1), o qual é solúvel em água e impermeável a membrana, foi utilizado como sonda cromogênica para o radical ânion superóxido liberado no meio extracelular. Esse ensaio se baseia na redução do WST-1 pelo radical, produzindo formazana solúvel, que pode ser medida por absorção a 450 nm (TAN, BERRIDGE, 2000).

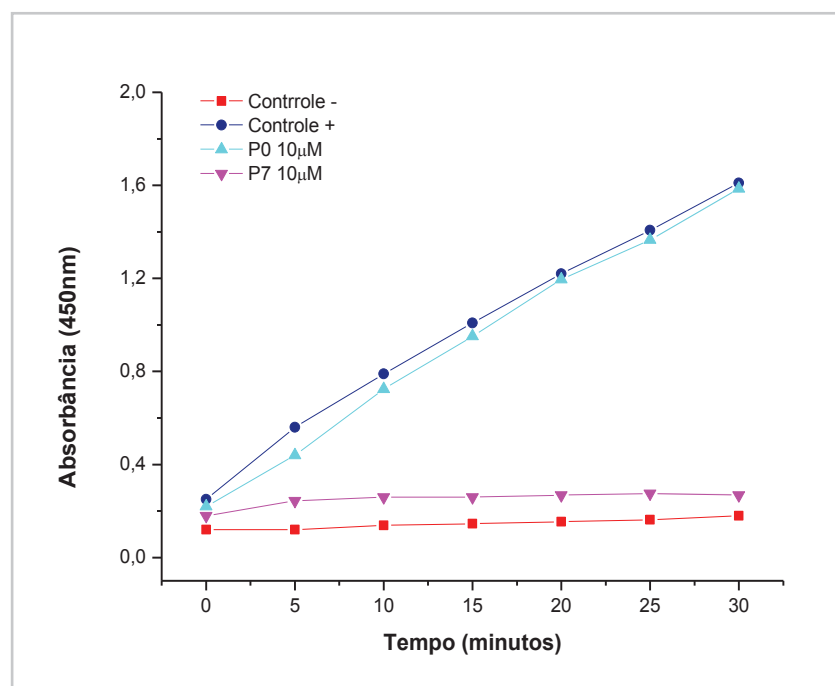
Os resultados mostrados na **Figura 16** confirmam a eficácia do efeito inibitório de P7, a falta deste efeito para P0, e ainda mostram a diferença significativa da capacidade de inibição do P7 em relação a apocinina (Apo), um metoxi-catecol que tem sido amplamente utilizado como inibidor de

NADPH oxidase (PETERS, HILTERMANN, STOLK, 2001; BARBIERI *et al.*, 2004; STEFANSKA, PAWLICZAK, 2008, CASTOR, LOCATELLI, XIMENES, 2010), e que para este ensaio foi utilizado como padrão. A apocinina apresentou uma capacidade de inibição do radical ânion superóxido nitidamente menor do que o P7, nas concentrações de 10  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$ .



**Figura 16.** Ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos como inibidores do radical ânion superóxido produzido por células PMN ativadas. Redução do WST-1 provocada pelo  $\text{O}_2^-$  liberado por neutrófilos ativados com PMA. As células ( $0,5 \times 10^6$ ) foram pré-incubadas em PBS suplementado (pH 7,4) com as substâncias durante 10 minutos. As reações foram iniciadas pela adição de PMA (100 nM). Os dados representam a média e o desvio padrão de pelo menos 3 diferentes ensaios realizados em duplicata. **A)** Ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos testados nas concentrações de 1  $\mu\text{M}$  e **B)** 10  $\mu\text{M}$ . (One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey).

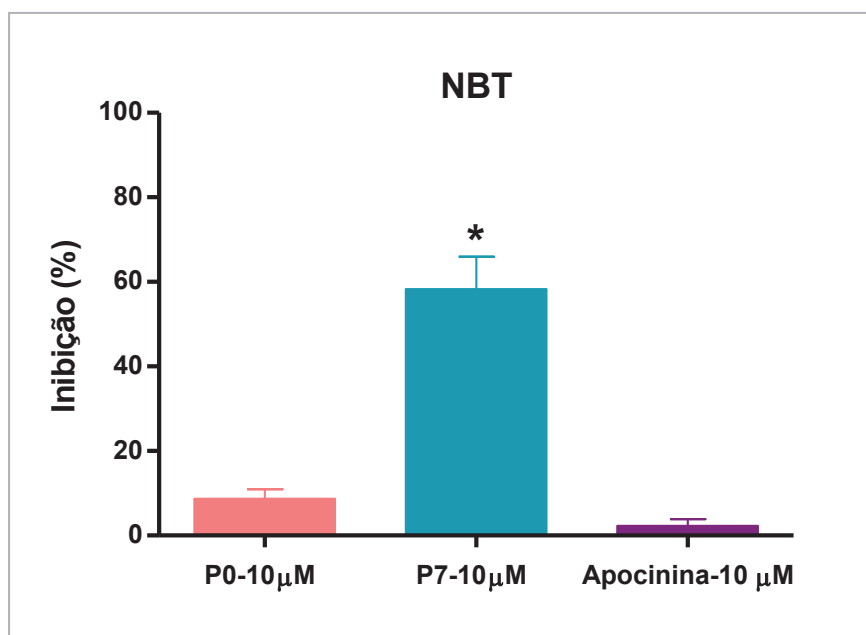
A **Figura 17** mostra a cinética da redução do WST-1 num tempo de 30 minutos de reação, para o ácido protocatecúico e seu éster P7. As curvas mostram que o P7 é capaz de inibir quase totalmente a produção de  $\text{O}_2^-$ , impedindo, portanto, a redução da sonda cromogênica (WST-1) a formazana solúvel. Nota-se o aumento da absorbância para P0, indicando uma grande quantidade de formazana solúvel no meio, devido sua baixa capacidade de inibição do radical, que reduz o WST-1.



**Figura 17.** Cinética de redução do WST-1 induzida pelo radical ânion superóxido liberado por células PMN ativadas com PMA, e o efeito inibidor de P0 e P7.

#### 4.8. Ensaio de redução do Nitro Azul de Tetrazolio (NBT)

Para comparar o efeito inibidor do ácido protocatecúico e do P7 sob o radical ânion superóxido, também foi realizado o ensaio de redução de NBT. O NBT é reduzido pelo  $O_2^{\cdot-}$  a cristais de formazana, que se depositam no citoplasma da célula (OLIVEIRA *et al.*, 2009). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico com objetiva de imersão (100x), onde 100 células foram contadas. A **Figura 18** mostra a porcentagem de inibição do radical calculada em relação as células positivas presentes, ou seja, que apresentaram grânulos em seu citoplasma. Quanto maior a quantidade de células positivas, menor a capacidade de inibição do  $O_2^{\cdot-}$ , já que este é o responsável pela redução do NBT.



**Figura 18.** Porcentagem de inibição do radical ânion superóxido pelo ácido protocatecúico, P7 e apocinina, com base na presença de cristais de formazana no citoplasma das células (positivas) gerados a partir da redução do NBT pelo  $O_2^{\cdot-}$ . As células PMN ( $1 \times 10^6$ ) foram pré-incubadas em PBS (pH 7,4) com as substâncias e o PMA (100 nM) durante 30 minutos. Nova incubação de 30 minutos foi realizada após a adição de NBT (1,22 mM). Os dados representam a média e o desvio padrão de pelo menos 3 diferentes ensaios realizados em duplicata. \*: valor de P7 significativamente maior quando comparado às outras substâncias ( $p < 0,05$ ). (One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey).

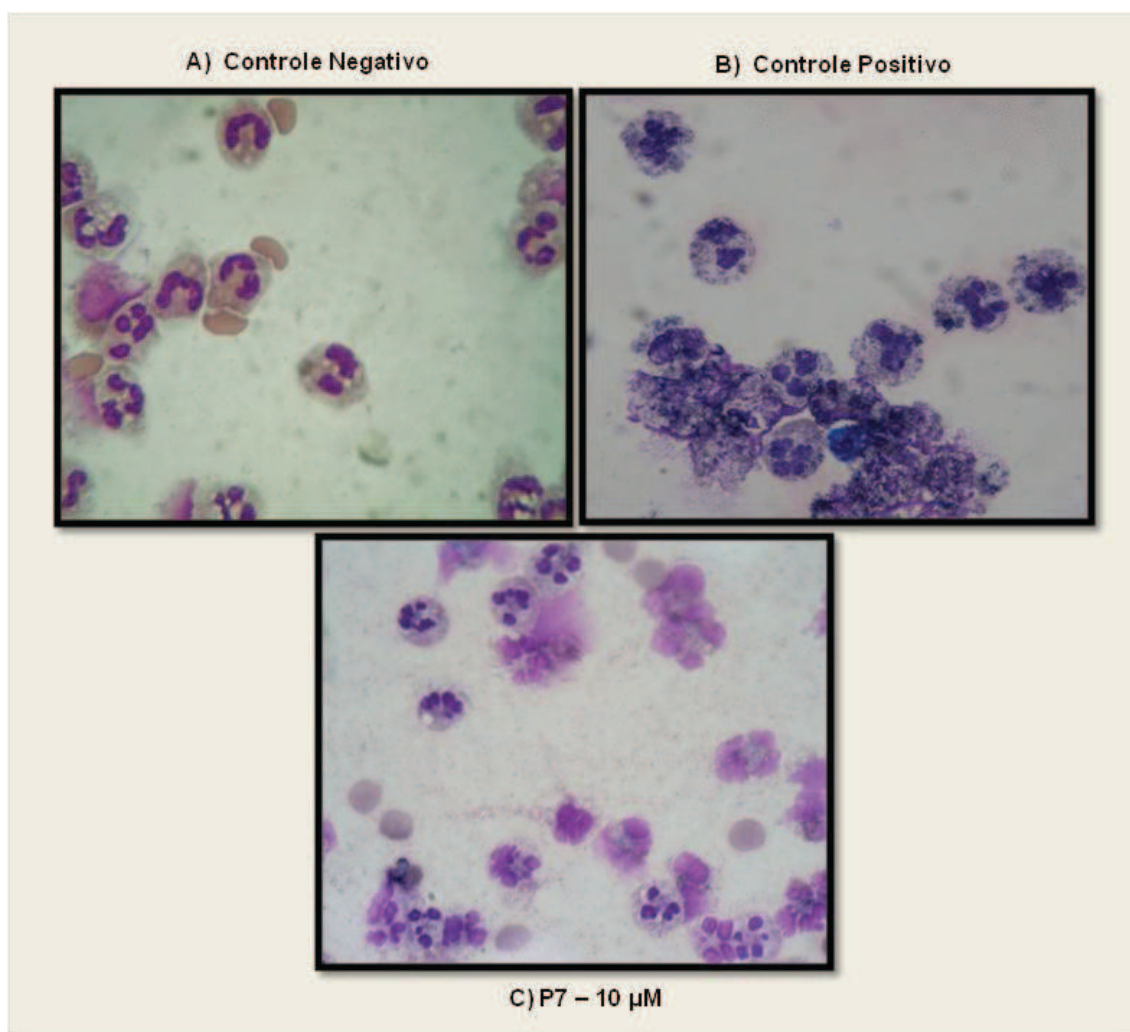
Visto que para este ensaio P7 também apresentou uma capacidade inibidora maior que seu ácido precursor, com diferença significativa de  $p < 0,05$ , utilizou-se a apocinina como padrão, já que sua capacidade inibidora de NADPH oxidase está bem estabelecida (PETERS, HILTERMANN, STOLK, 2001; BARBIERI *et al.*, 2004; STEFANSKA, PAWLICZAK, 2008, CASTOR, LOCATELLI, XIMENES, 2010). O éster P7 também apresentou uma eficiência de inibição significativamente maior quando comparada a apocinina ( $p < 0,05$ ), confirmando o experimento do WST-1.

A **Figura 19A**, **19B** e **19C** a seguir, apresenta fotomicrografias obtidas a partir das lâminas do ensaio de redução do NBT, lembrando que a atividade



oxidativa é mensurada pelo percentual de células contendo precipitados negros de formazana, no citoplasma do neutrófilo.

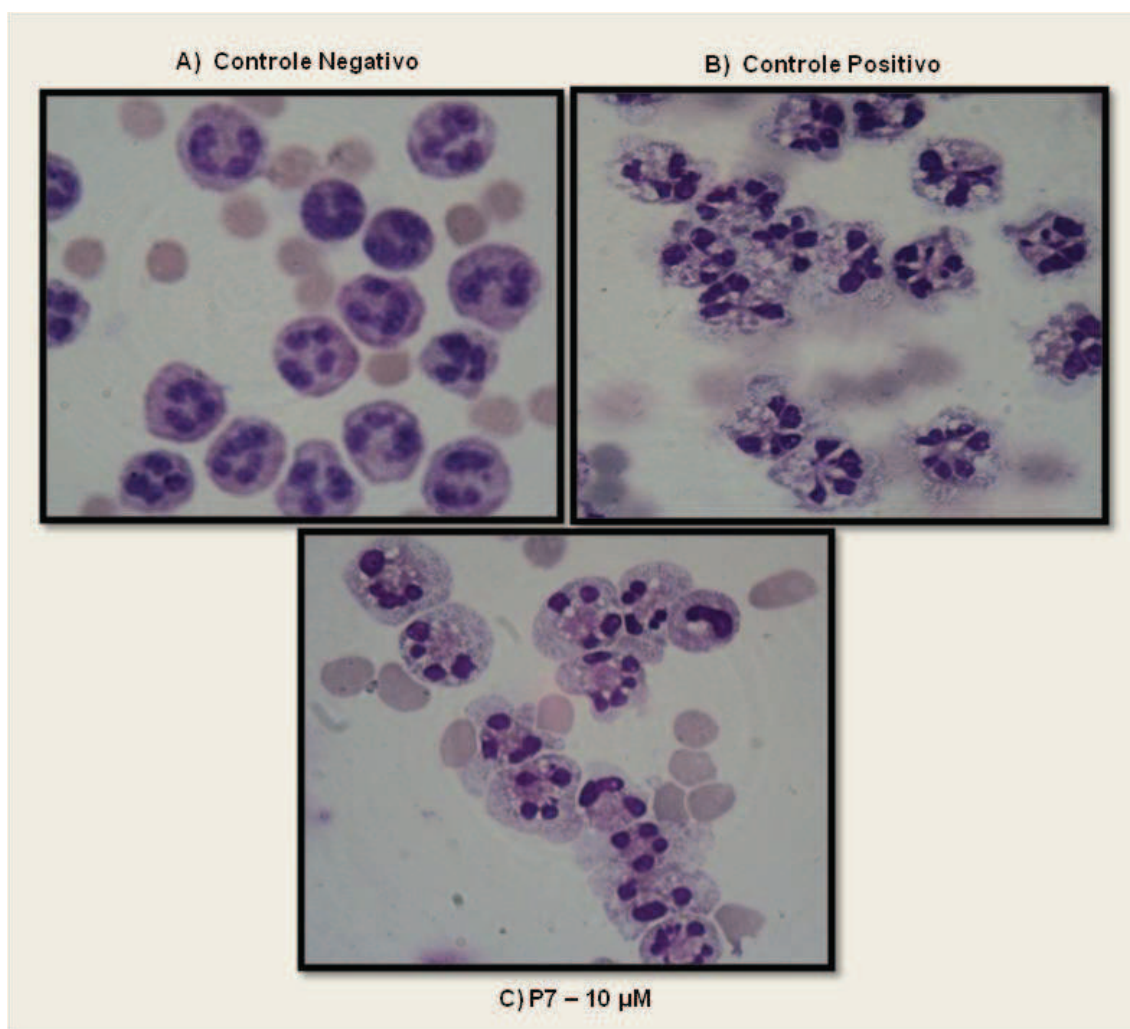
Na **Figura 19C**, é possível observar a ausência desses precipitados negros quando P7 foi adicionado à reação. P7 inibiu a redução do NBT a cristais de formazana, por inibir a produção de  $O_2^{\cdot -}$  por neutrófilos ativados.



**Figura 19.** Fotomicrografias retiradas das lâminas de cytopsin do ensaio de redução do NBT. **A)** Controle negativo composto de PBS (pH 7,4), células PMN ( $1 \times 10^6$  células/mL) e NBT (1,22 mM); **B)** Controle positivo composto por células PMN ( $1 \times 10^6$  células/mL) estimulados com PMA (100 nM). Presença de precipitados negros no citoplasma das células produzidos pela redução do NBT e células destruídas; **C)** Células PMN ( $1 \times 10^6$  células/mL) incubadas com protocateculato de heptila (P7), estimuladas com PMA (100 nM).

#### 4.9. Estudo da morfologia de neutrófilos ativados (Ensaio Qualitativo)

Visto que, além da capacidade de inibição de P7 sob a liberação do radical ânion superóxido por neutrófilos ativados, este também foi capaz de manter a integridade celular. Um ensaio de morfologia foi feito para melhor detalhamento desta proteção, em relação à membrana e núcleo de células ativadas ou não, e sob o efeito do éster.



**Figura 20.** Fotomicrografias retiradas das lâminas de cytospin para avaliação da morfologia de neutrófilos ativados, sob efeito do protocatecolato de heptila. **A)** Controle negativo composto de células PMN ( $1 \times 10^6$  células/mL) em PBS (pH 7,4); **B)** Controle positivo composto por células PMN ( $1 \times 10^6$  células/mL) estimulados com PMA (100 nM). Notam-se alterações de núcleo e intensa vacuolização citoplasmática; **C)** Células PMN ( $1 \times 10^6$  células/mL) incubadas com protocatecolato de heptila (P7), estimuladas com PMA (100 nM).

A **Figura 20** apresenta fotomicrografias das lâminas de cytospin obtidas após incubação das células PMN ( $1 \times 10^6$ ) estimuladas ou não com PMA (100 nM), na presença ou não da substância (P7 - 10 $\mu$ M) em PBS (pH 7,4). Foi possível observar um aumento da vacuolização no citoplasma, além de alteração nuclear provocada pela ativação da NADPH oxidase. Nota-se que P7 tem efeito protetor sob essas alterações, indicando seu efeito inibidor sobre a ativação da enzima e conseqüentemente a manutenção da integridade celular.

#### **4.10. Ensaio da xantina/xantina oxidase**

De acordo com os resultados obtidos em ensaios anteriores para a avaliação do efeito inibidor do ácido protocatecúico e seus ésteres sobre a produção de  $O_2^{\cdot-}$  pelo complexo NADPH oxidase, determinou-se que os ésteres, em especial o P7, mostraram resultados significativamente melhores quando comparados ao seu precursor ácido ( $p < 0,05$ ). Para tanto, foram realizados os ensaios de determinação da produção do radical  $O_2^{\cdot-}$  por leucócitos ativados através de quimiluminescência dependente de Lucigenina, WST-1 e redução do Nitro Azul de Tetrazólio (NBT).

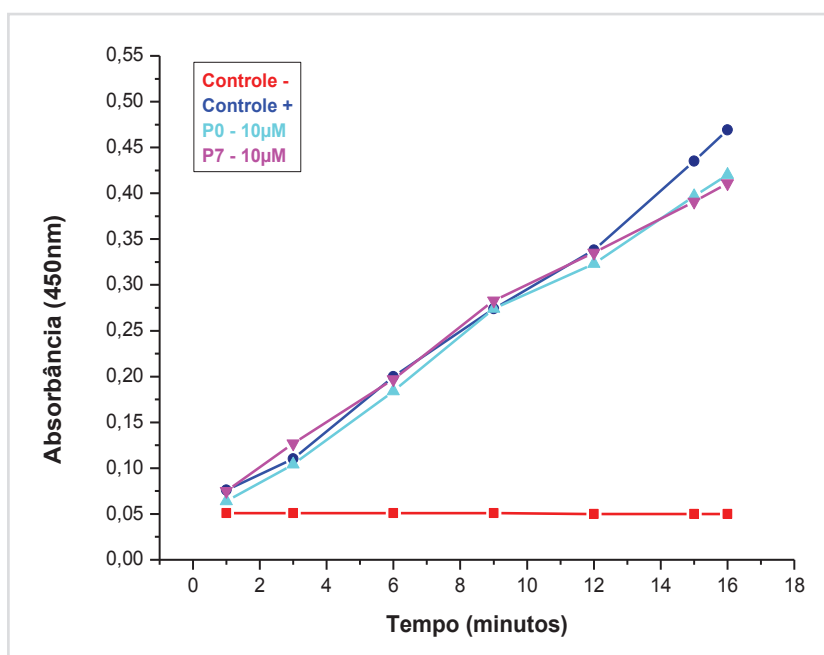
Considerando que estes resultados podem ser consequência direta do sequestro do radical ânion superóxido e não da inibição da produção deste pelas células, P0 e P7 foram submetidos a um ensaio livre de células para determinar se também são capazes de inibir a produção do radical gerado a partir do sistema enzimático xantina/xantina oxidase.

Para este ensaio, utilizou-se o WST-1, como sonda cromogênica. A redução do WST-1 pelo  $O_2^{\cdot-}$  liberado no meio extracelular permitiu avaliar o potencial de inibição das substâncias na produção do radical a partir do sistema enzimático xantina/xantina oxidase. P0 e P7 (10  $\mu$ M) foram incubados

a 37°C com a sonda (500 µM) e xantina (100 µM). A reação foi iniciada pela adição de xantina oxidase (0,05 u/mL).

A **Figura 21** mostra a cinética da produção de ânion superóxido produzido pelo sistema xantina/xantina oxidase e o efeito do ácido protocatecúico e protocateculato de heptila (P7) como inibidores deste radical.

Tanto P0 quanto P7, na mesma concentração utilizada em outros ensaios desta categoria, não foram capazes de reagir com o  $O_2^{\cdot-}$  produzido por um sistema independente de NADPH oxidase. Esse resultado eliminou a possibilidade de uma ação sequestradora destas substâncias em estudo e confirmou seu potencial de inibição da produção do radical induzido provavelmente pela inibição da ativação da enzima NADPH oxidase.

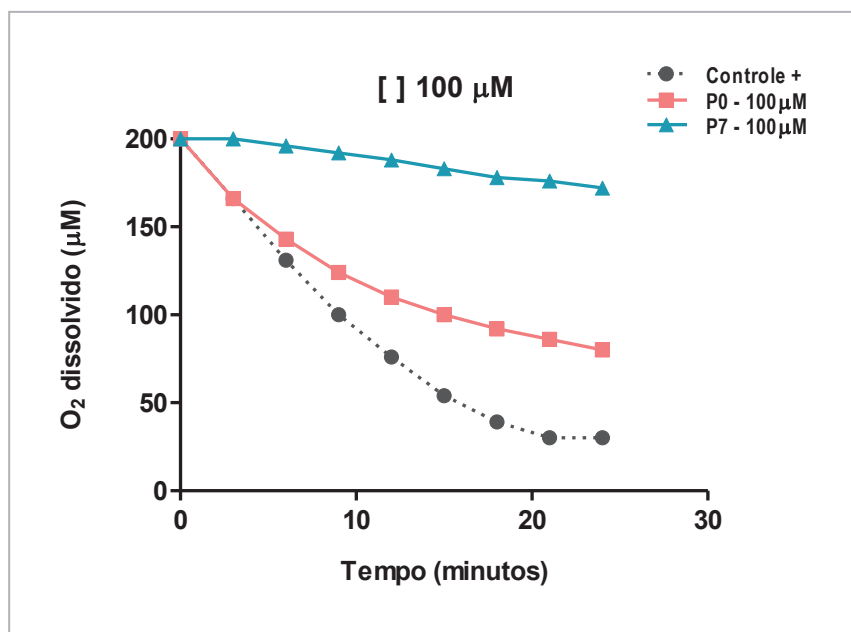


**Figura 21.** Ácido protocatecúico e protocateculato de heptila (P7) como inibidores do radical ânion superóxido produzido pelo sistema xantina/xantina oxidase. WST-1 (sonda cromogênica solúvel em água e impermeável a membrana) foi utilizada para revelar a produção de  $O_2^{\cdot-}$ .

#### 4.11. Ensaio de consumo de oxigênio

A fim de confirmarmos os resultados obtidos anteriormente, os quais indicaram o P7 como potencial inibidor da ativação da enzima NADPH oxidase quando comparado ao seu ácido precursor (P0), realizou-se um experimento adicional para estudarmos a ação direta destas substâncias sobre o consumo de oxigênio, induzido por polimorfonucleares ativadas, para a produção de EROs.

O monitoramento do decaimento do consumo de oxigênio foi realizado com um eletrodo específico para  $O_2$  dissolvido durante 20 minutos e tanto P0 quanto P7 foram testados na concentração de  $100 \mu\text{M}$ . Foram utilizadas  $10 \times 10^6$  células/mL e a reação foi iniciada quando as células polimorfonucleares foram ativadas com PMA ( $0,5 \mu\text{M}$ ).



**Figura 22.** Ácido protocatecúico e protocatecolato de heptila como inibidores da ativação de NADPH oxidase em polimorfonucleares ativadas, avaliados pelo consumo de oxigênio molecular. As substâncias na concentração de  $100 \mu\text{M}$  foram adicionadas a um recipiente contendo  $10 \times 10^6$  células/mL. A reação foi iniciada pela adição de PMA ( $0,5 \mu\text{M}$ ) para a ativação celular e o consumo de oxigênio foi monitorado por um eletrodo específico.

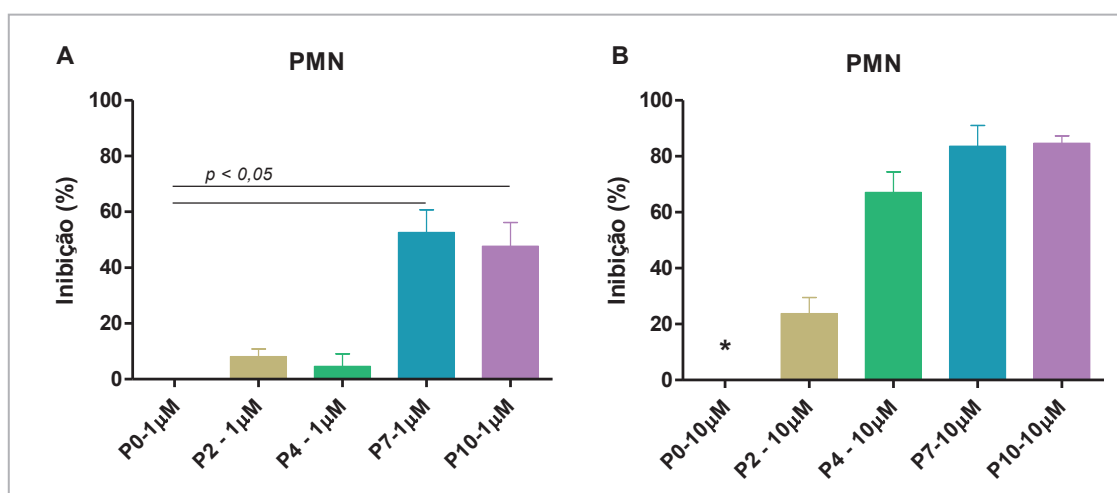
A **Figura 22** mostra o controle positivo da reação, onde o consumo de oxigênio dissolvido no meio ocorre quando as substâncias não estão presentes. Situação na qual, após ativação celular e durante o ciclo redox, o oxigênio molecular dissolvido no meio é consumido e reduzido a ânion superóxido (PICHORNER, METODIEWA, WINTERBOURN, 1995; XIMENES *et al.*, 2010). Quando as substâncias foram adicionadas a reação, o consumo de oxigênio diminuiu. Apesar de P0 ter demonstrado inibição do consumo de O<sub>2</sub> quando comparado ao controle, P7 mostrou maior inibição em relação a ambos. Notou-se que a adição do éster heptila na reação, na concentração de 100 µM, inibiu quase por completo o consumo do oxigênio dissolvido no meio, durante os 20 minutos de monitoramento. Ou seja, na presença do P7 o nível de oxigênio dissolvido no meio foi mantido, impedindo que este fosse consumido e reduzido a ânion superóxido. Essa é mais uma confirmação de que os ésteres do ácido protocatecúico, especificamente o P7, tem grande potencial de inibição da ativação de NADPH oxidase, desta vez avaliado pelo decaimento do consumo de oxigênio molecular dissolvido no meio após ativação celular.

#### **4.12. Avaliação do efeito inibidor sobre a produção de ácido hipocloroso (HOCl) por neutrófilos ativados**

De acordo com a cascata de geração de espécies reativas de oxigênio e derivados produzidos e liberados durante o *burst* oxidativo, após ativação de NADPH oxidase, supôs-se que o efeito inibitório das substâncias testadas, sob esta enzima, implicaria numa diminuição extracelular da liberação de HOCl por neutrófilos ativados. Para tanto, realizou-se um ensaio para avaliar a concentração de HOCl liberado no meio, após estimulação celular, sob efeito do ácido protocatecúico e seus ésteres.

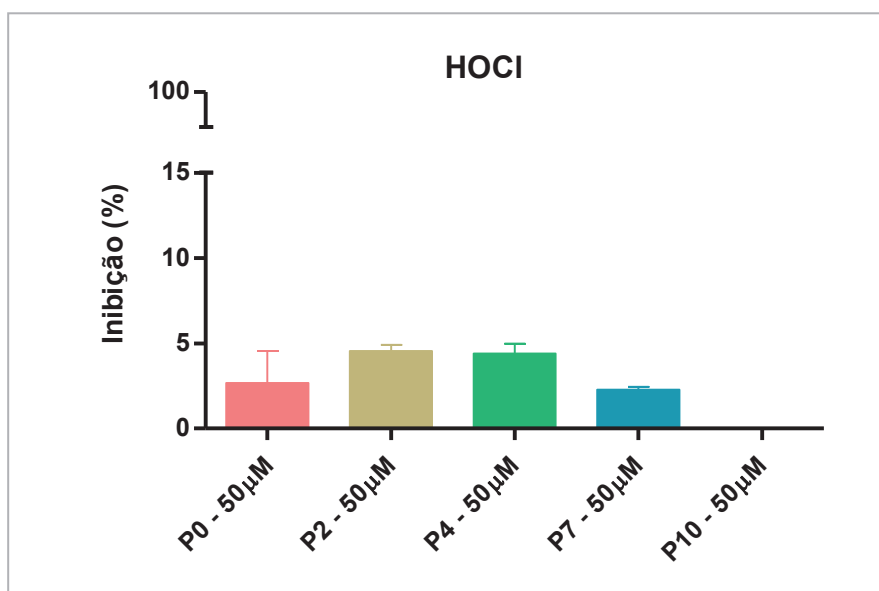
A medida do HOCl produzido foi baseada na quantidade de taurina-cloramina presente no meio, a qual foi produzida proveniente da reação do

HOCI com a taurina adicionada na reação experimental para gerar essa cloramina que é capaz de oxidar o TMB. Portanto, a diminuição dos valores de absorvância em relação ao controle da reação (isento das substâncias testadas) significa que houve uma diminuição na produção do HOCl pelas células ativadas, que diminui a produção de taurina cloramina, conseqüentemente minimizando a oxidação do TMB. Os resultados são dados pela porcentagem de inibição do HOCl sob efeito das substâncias (testadas nas concentrações de 1 $\mu$ M e 10 $\mu$ M) em relação ao controle da reação (**Figura 23**). Na concentração de 1  $\mu$ M apenas P7 e P10 apresentaram resultados com diferença significativa quando comparado ao seu ácido precursor. Já na concentração de 10  $\mu$ M todos os ésteres apresentaram porcentagem de inibição significativamente maior quando comparado ao ácido protocatecúico ( $p < 0,05$ ), evidenciando um maior potencial de inibição de HOCl dessas substâncias.



**Figura 23.** Ácido protocatecúico e os seus ésteres alquílicos como inibidores de HOCl produzidos por células PMN ativadas ( $1 \times 10^6$ /mL). As células foram pré-incubadas em PBS suplementado (pH 7,4) com taurina (10 mM) e as substâncias durante 10 minutos. As reações foram iniciadas pela adição de PMA (100 mM). A taurina cloramina produzida foi medida pela oxidação do TMB. Os dados representam a média e desvio padrão de pelo menos 3 experimentos diferentes realizados em duplicata. **A)** Ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos testados na concentração de 1  $\mu$ M e **B)** 10  $\mu$ M. \*: valor significativamente menor quando comparado aos ésteres ( $p < 0,05$ ). (One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey).

Para excluir a possibilidade de um efeito sequestrador direto de HOCl, o qual impediria a reação com taurina para produzir taurina cloramina, as substâncias foram testadas novamente num ensaio livre de células, ou seja, onde o HOCl foi adicionado no meio e a taurina cloramina quimicamente produzida. A reação foi realizada em meio contendo PBS (pH 7,4) contendo taurina (10 mM), onde foi adicionado o HOCl (40  $\mu$ M), para a produção de taurina cloramina, e as substâncias numa concentração cinco vezes maior do que a utilizada nos estudos com células (*ex vivo*). A diminuição da absorbância foi medida e comparada com a do controle, o qual foi incubado na ausência das substâncias testadas. Os resultados mostraram que as substâncias foram incapazes de impedir a reação do HOCl com a taurina, eliminando assim a possibilidade de um efeito sequestrador direto do HOCl neste modelo experimental (**Figura 24**). Também não houve diferença significativa entre os resultados apresentados tanto pelo ácido protocatecúico quanto pelos seus ésteres alquílicos.



**Figura 24.** Ácido protocatecúico e os seus ésteres alquílicos como sequestradores de HOCl. Efeito sequestrador das substâncias testadas (50  $\mu$ M) sobre a taurina cloramina quimicamente produzida por HOCl (40  $\mu$ M). Não houve diferença significativa entre os resultados (One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey).



Dentro deste contexto, deduziu-se que o efeito apresentado pelos ésteres está relacionado com a inibição da própria NADPH oxidase. Para tanto, mais um ensaio foi realizado, para descartar a possibilidade de uma possível ação das substâncias sobre outra enzima, a MPO.

#### **4.13. Produção de HOCl: MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sistema livre de células)**

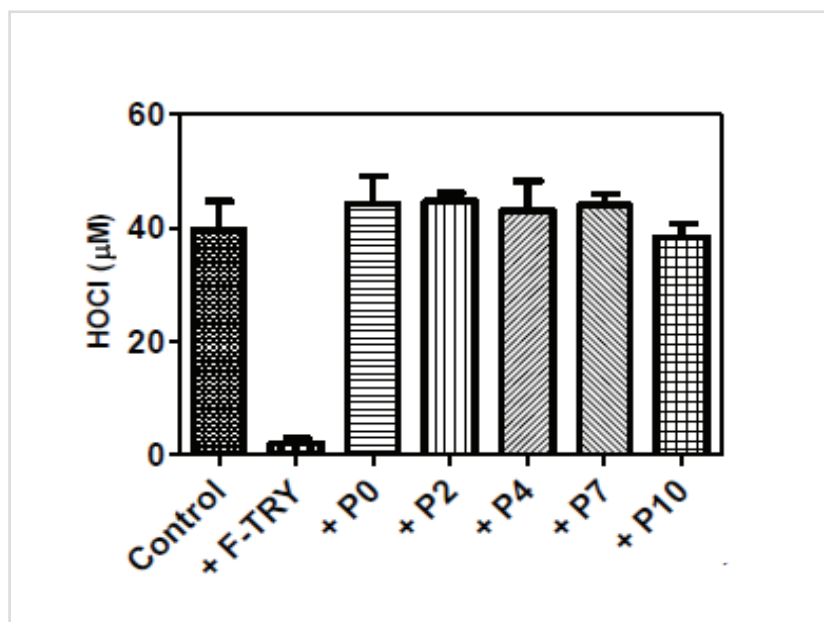
##### **Avaliação o efeito inibidor sobre a ação clorinante da enzima mieloperoxidase (MPO)**

A mieloperoxidase é uma enzima derivada de leucócitos que catalisa a formação de numerosas espécies reativas oxidantes (ROMAN, WENDLAND, POLANCZYK, 2007).

Sabendo que a MPO reage com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, levando a formação de MPO-I, a qual é capaz de oxidar íons cloreto, para produzir HOCl (ABU-SOUD, HAZEM, 2000), resolveu-se avaliar se o ácido protocatecúico e seus ésteres tinham efeito sobre a ação clorinante da MPO. Portanto, num sistema livre de células, poderíamos confirmar se o efeito inibidor das substâncias estaria agindo sobre a MPO, excluindo qualquer interferente que pudesse estar envolvido num ensaio com células.

A reação foi realizada adicionando MPO (50 nM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 µM) em meio contendo PBS suplementado (pH 7,4) e taurina (10 mM). A produção de HOCl pela oxidação do íon cloreto, catalisada pela MPO para posteriormente produzir taurina cloramina, foi medida pela absorbância do TMB oxidado. O resultado foi dado pela quantidade de HOCl produzido (**Figura 25**). Tanto o ácido protocatecúico quanto seus ésteres alquílicos não foram capazes de inibir a ação clorinante da MPO, ao contrário da fluortriptamina, um conhecido e potente inibidor de MPO, usado neste ensaio como padrão (substância de referência). E, portanto, também não houve diferença estatística entre os resultados mostrados, no que diz respeito ao efeito do ácido protocatecúico,

quando comparado a seus ésteres alquílicos. Tampouco houve diferença significativa entre as substâncias e o controle da reação (com exceção a fluorotriptamina).



**Figura 25.** Ácido protocatecúico e os seus ésteres alquílicos como inibidores do HOCl produzido por MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As substâncias testadas (10 µM) foram incubadas com MPO (50 nM) em meio contendo PBS suplementado (pH 7,4) e taurina (10 mM). A reação foi iniciada pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 µM). (One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey).

#### 4.14. Atividade da MPO: Ensaio amperométrico

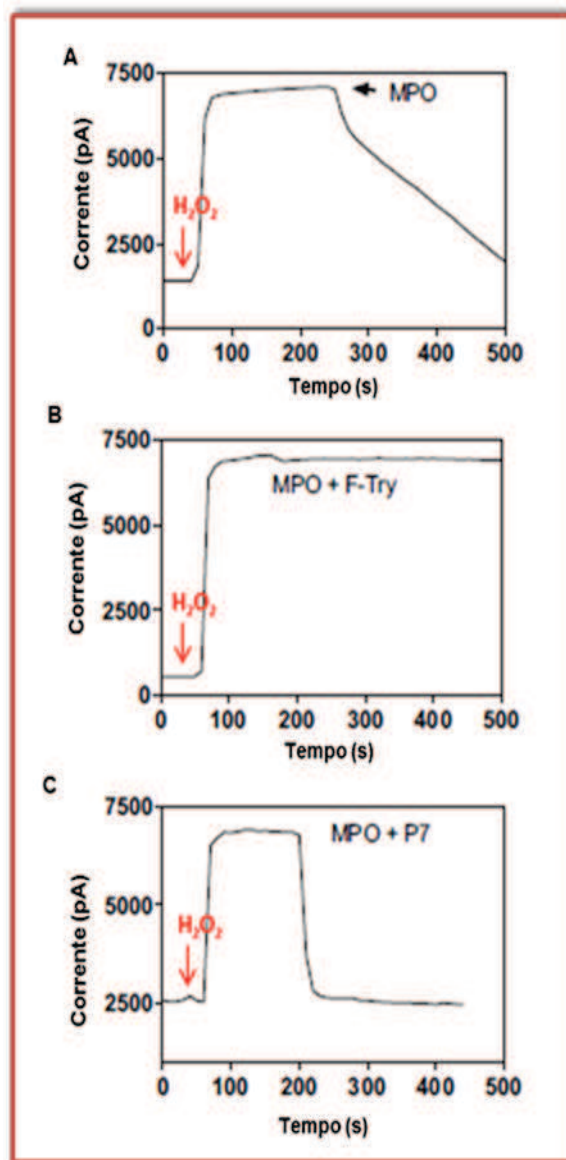
Foi mostrado anteriormente resultados da avaliação do efeito inibidor do ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos, sobre a produção de ácido hipocloroso (HOCl) por células polimorfonucleares ativadas. A medida da produção de HOCl produzido nos ensaios foi baseada na quantidade de taurina-cloramina presente no meio, a qual foi produzida proveniente da reação do HOCl com a taurina adicionada no meio experimental, e responsável pela oxidação do TMB usado como revelador.

Visto que a produção de HOCl, a partir de células ativadas, foi diminuída na presença dos ésteres alquílicos, decidiu-se realizar um experimento para descartar a possibilidade de um efeito sequestrador direto de HOCl por meio de um ensaio livre de células. E este também provou que não se trata de uma ação “scavenger”, já que as substâncias foram incapazes de impedir a reação do HOCl com a taurina. Para tanto, mais um ensaio foi realizado, para descartar a possibilidade de uma possível ação das substâncias sobre outra enzima, a MPO. Neste, o ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos não foram capazes de inibir a ação clorinante da MPO.

Ainda dentro deste contexto, a fim de descartar possíveis interferências com qualquer sonda cromogênica, foi feito o monitoramento do consumo de peróxido de hidrogênio a partir da atividade catalítica da MPO utilizando um detector e um biossensor amperométrico específico para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As substâncias (10 µM) foram incubadas juntamente com MPO (50 nM) e a reação foi iniciada pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 µM) a 25°C. O monitoramento do consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi feito durante aproximadamente 10 minutos.

A princípio a reação foi observada sem a adição de qualquer substância (**Figura 26A**). A 5-fluortriptamina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA), um potente e conhecido inibidor da atividade clorinante da MPO (JANTSCHKO *et al.*, 2005), foi usada aqui como parâmetro, ou seja, como uma substância de referência. Como mostra a **Figura 26B** o efeito inibidor da 5-fluortriptamina impediu a atividade catalítica da MPO sobre o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Essa atividade conseqüentemente inibiu a produção de HOCl. Neste caso, o nível de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi mantido durante o monitoramento. E como esperado, a **Figura 26C** mostra a ausência da capacidade de inibição do éster P7. Após a adição do éster, foi possível observar a atividade catalítica da MPO e, conseqüentemente, o consumo do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente no meio. Resultados similares foram observados para o ácido protocatecúico e seus outros ésteres

alquílicos, os quais também não foram capazes de inibir a atividade clorinante da MPO (dados não mostrados).



**Figura 26.** Efeito da 5-fluortriptamina e do protocateculato de heptila sobre a atividade clorinante da MPO medida pelo consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As substâncias (10 μM) foram incubadas juntamente com MPO (50 nM) e a reação foi iniciada pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 μM) a 25°C. O monitoramento do consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi feito durante aproximadamente 10 minutos. **A)** Atividade clorinante da MPO. **B)** Inibição da atividade clorinate da MPO pela 5-fluortriptamina. **C)** Adição do P7 na reação e atividade clorinante da MPO.

#### 4.15. Determinação da inibição da produção de peróxido de hidrogênio extracelular por Amplex<sup>®</sup> Red

A medida da fluorescência resultante da oxidação do Amplex<sup>®</sup> Red (*10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine*), catalisada por peroxidase, a uma molécula altamente fluorescente (resorufina), tem sido reportada como um método altamente específico e sensível para a detecção de peróxido de hidrogênio extracelular (ZHOU *et al.*, 1997; FORTEZA *et al.*, 2005; RINALDI *et al.*, 2007).

Portanto, o objetivo deste ensaio foi avaliar o potencial de inibição das substâncias em estudo, sobre o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracelular liberado por polimorfonucleares e células mononucleares do sangue periférico ativadas com PMA.

Inicialmente as células foram incubadas com as substâncias ou na ausência delas. Após 15 minutos, foram estimuladas com PMA (0,5 µM) (com exceção do controle negativo) e o Amplex Red (0,5 mM) foi adicionado ao meio.

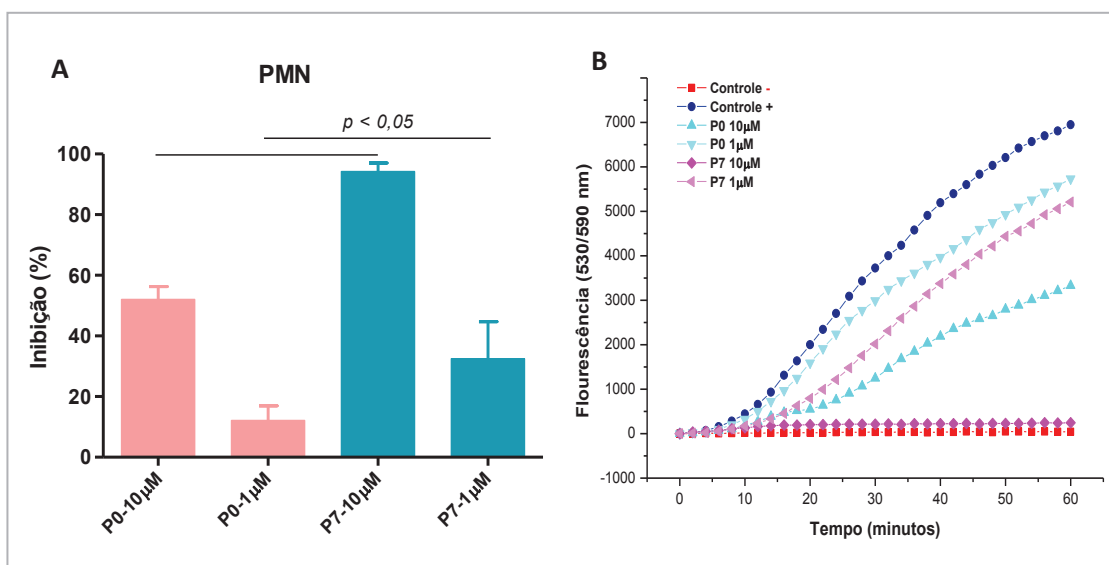
Sabendo que na presença de uma peroxidase, o Amplex Red é oxidado e capaz de reagir com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, resultando num produto vermelho altamente fluorescente, a resorufina, a quantidade de fluorescência mostrada nos resultados reflete a quantidade de peróxido de hidrogênio liberado no meio extracelular (MOHANTY *et al.*, 1997).

P0 e P7 foram testados nas concentrações de 10 µM e 1 µM. A Figura 25 mostra o resultado obtido no ensaio com células PMN especificamente. Foi possível observar uma pequena porcentagem de inibição tanto de P0 quanto de P7 na concentração de 1 µM, e apesar de apresentarem diferenças estatísticas entre ambos ( $p < 0,05$ ), nenhum demonstrou ser capaz de inibir pelo menos 50% do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberado no meio extracelular (**Figura 27A**). Diferente do que ocorreu com as substâncias na concentração de 10 µM, onde P7 foi capaz de inibir 94% do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente no meio. E apesar de P0 ter inibido pouco mais de 50%, as análises estatísticas apontaram o éster

como a substância de maior capacidade de inibição de peróxido de hidrogênio extracelular, com diferença estatística de  $p < 0,05$ .

Diferença estatística também foi observada em relação às duas concentrações usadas no ensaio, quando se comparou a substância na concentração de 10  $\mu\text{M}$  a ela mesma na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , com  $p < 0,05$  (dados não mostrados).

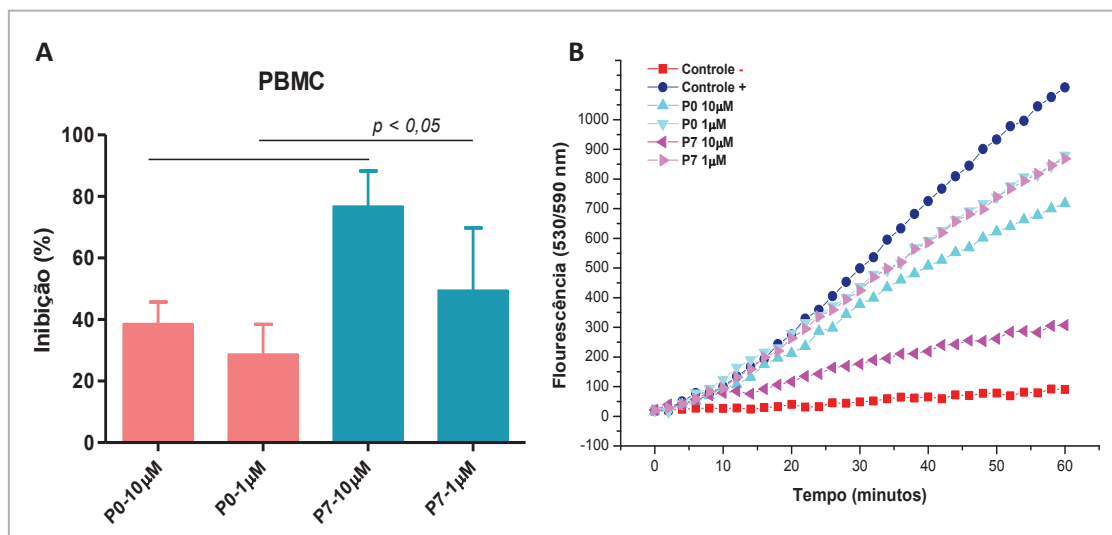
A **Figura 27B** mostra a cinética de inibição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  liberado no meio extracelular por PMN ativados, na presença ou na ausência das substâncias de estudo. Notou-se que P7 a 10  $\mu\text{M}$  manteve o nível de  $\text{H}_2\text{O}_2$  tão baixo quanto aquele observado no controle negativo, onde as células não foram estimuladas e, portanto não houve produção e liberação de EROs extracelular que não fosse espontânea.



**Figura 27.** Ácido protocatecúico e seu éster alquílico P7 como inibidores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  liberado no meio extracelular por PMN ativados com PMA.  $0,5 \times 10^6$  células/mL foram incubadas com as substâncias (10  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$ ), posteriormente estimuladas com PMA (0,5  $\mu\text{M}$ ), seguida da adição de Amplex Red (0,5 mM) na reação. **A**) Porcentagem de inibição de P0 e P7 sobre o  $\text{H}_2\text{O}_2$  liberado no meio extracelular por PMN ativados. (One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey). **B**) Cinética de inibição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  liberado no meio extracelular por PMN ativados, na presença ou na ausência das substâncias de estudo.

Para a oxidação do Amplex Red à resorufina, se faz necessária a presença de uma peroxidase. Portanto, para PBMC, HRP (*Horseradish Peroxidase*) (0,1  $\mu\text{M}$ ) foi adicionada a reação antes do período de incubação devido a quantidade reduzida de MPO nesta célula.

Assim como ocorreu com as células PMN, a **Figura 28** nos mostra que P7 apresentou melhor capacidade de inibição quando comparada ao seu precursor P0, nos ensaio com PBMC ativadas. A diferença de inibição entre ambas as substâncias foi estatisticamente significativa tanto para concentrações de 10  $\mu\text{M}$  quanto para 1  $\mu\text{M}$ , onde P7 apresentou maior porcentagem de inibição que P0 em ambas concentrações (1 e 10  $\mu\text{M}$ ), com  $p < 0,05$  e, até mesmo P7 na sua menor concentração (1  $\mu\text{M}$ ) se mostrou melhor que P0 na sua maior concentração (10  $\mu\text{M}$ ), com  $p < 0,05$  (resultado não mostrado) (**Figura 28A**).



**Figura 28.** Ácido protocatecúico e seu éster alquílico P7 como inibidores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberado no meio extracelular por PBMC ativados com PMA.  $0,5 \times 10^6$  células/mL foram incubadas com as substâncias (10  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$ ), posteriormente estimuladas com PMA (0,5  $\mu\text{M}$ ), seguida da adição de Amplex Red (0,5 mM) na reação. **A)** Porcentagem de inibição de P0 e P7 sobre o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberado no meio extracelular por PBMC ativados. (One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey). **B)** Cinética de inibição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberado no meio extracelular por PBMC ativados, na presença ou na ausência das substâncias de estudo.

Apesar das substâncias apresentarem resultados de inibição em PBMC inferiores aqueles mostrados em células PMN, mesmo na maior concentração testada, 10  $\mu\text{M}$ , P7 apresentou maior capacidade de inibição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  extracelular em ambos os tipos celulares, assim como também foi apresentado na **Figura 28B**, visto que a ativação celular em PBMC também foi aparentemente menor, mesmo utilizando concentrações idênticas de PMA. A cinética revelou que durante os 60 minutos de monitoramento, o éster alquílico P7 (10  $\mu\text{M}$ ) foi a substância mais eficaz na inibição do peróxido de hidrogênio extracelular.

#### **4.16. Determinação da inibição de peróxido de hidrogênio intracelular Ensaio de dihidrorodamina 123 (DHR) por citometria de fluxo**

A fim de complementar os resultados obtidos no ensaio anterior, decidiu-se avaliar se o ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos também apresentavam potencial de inibição sobre o  $\text{H}_2\text{O}_2$  intracelular liberado por células PMN e PBMC ativadas. Para tanto, foi utilizado um composto permeável a membrana e não fluorescente, o DHR, que após sofrer oxidação por peróxido de hidrogênio (intracelular) dá origem a rodamina 123, um composto altamente fluorescente (SMITH, WEIDEMANN, 1993; RICHARDSON *et al.*, 1998; RINALDI *et al.*, 2007; DE ALMEIDA *et al.*, 2011).

Dois estímulos diferentes foram utilizados, os quais induzem a ativação celular e o *burst* oxidativo por diferentes vias, o PMA e o *Staphylococcus aureus*.

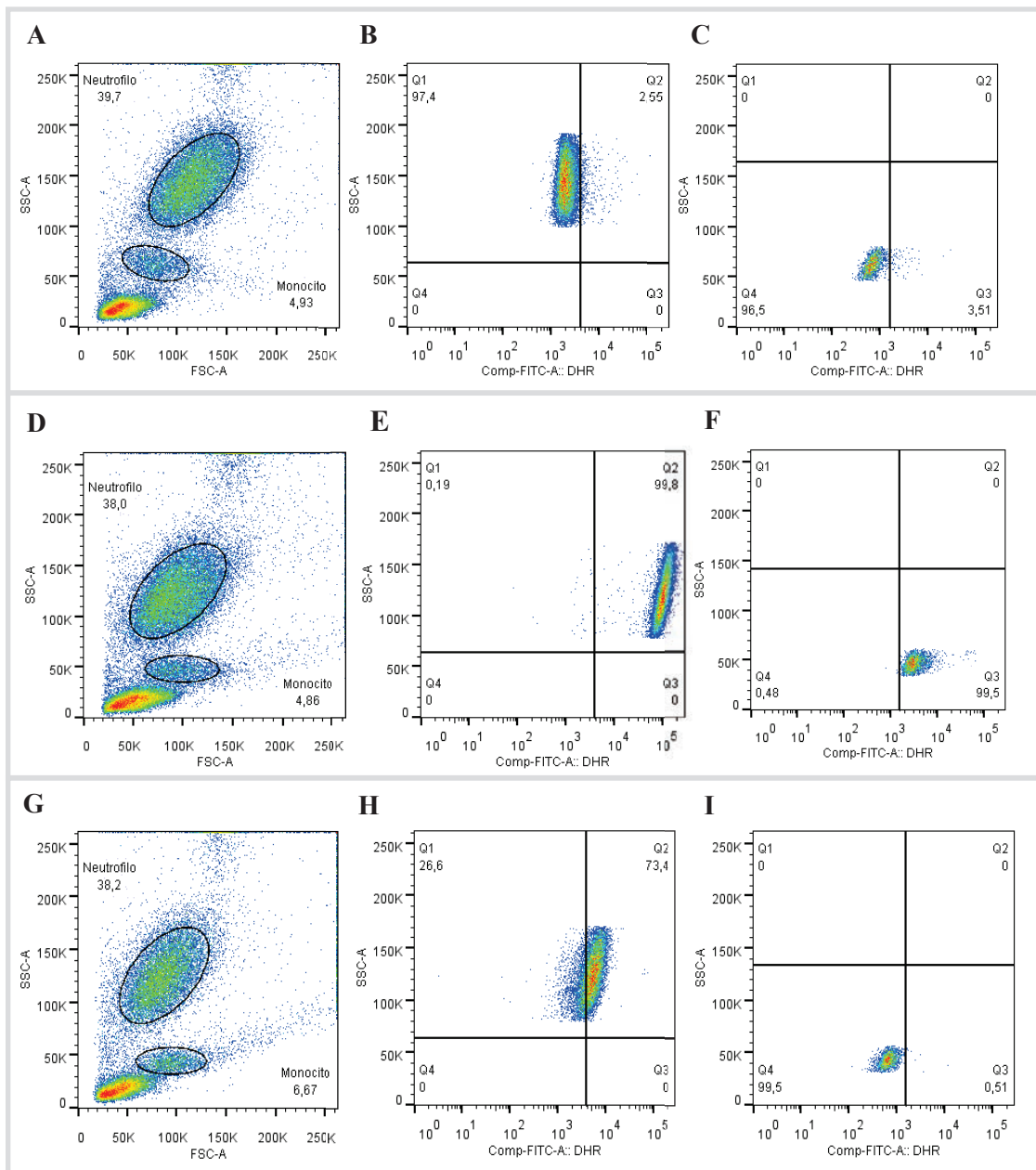
A possibilidade de usarmos sangue total neste ensaio nos permitiu avaliar o ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos em concentrações maiores do que aquelas usadas nos ensaios anteriores. Inicialmente foram avaliados apenas o ácido protocatecúico e o P7 em diferentes concentrações. Iniciamos os ensaios com uma concentração baixa, de 50  $\mu\text{M}$  e depois aumentamos para 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  e posteriormente 500  $\mu\text{M}$ , com o objetivo



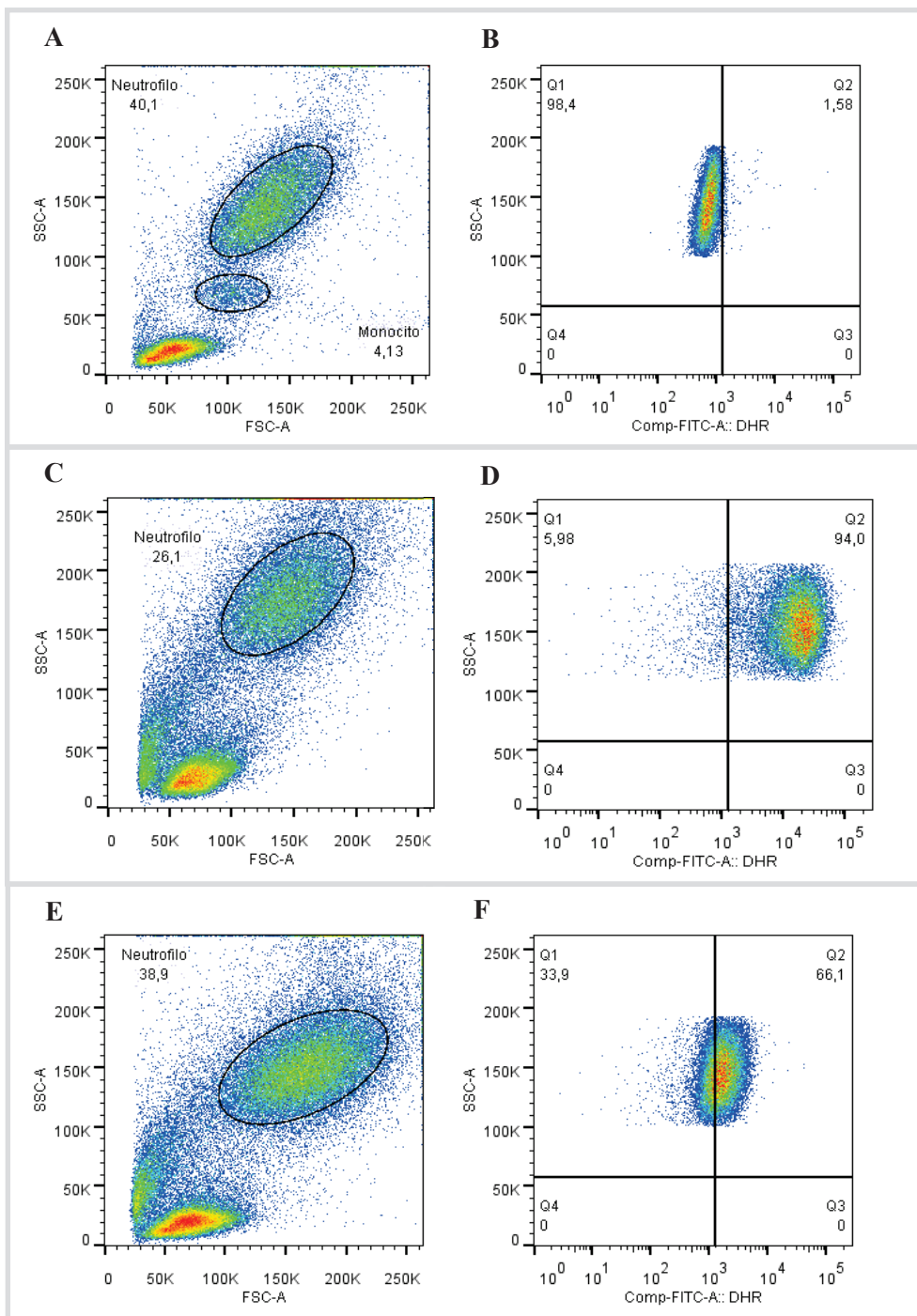
de encontrarmos uma concentração na qual fosse possível uma inibição de pelo menos 50% ou mais da produção de  $H_2O_2$  intracelular e a fim de encontrarmos um ponto de saturação entre as maiores concentrações, onde a porcentagem de inibição não apresentasse diferença significativa. Após aquisição das amostras pelo citômetro de fluxo, as análises foram realizadas utilizando o *software FlowJo*.

A **Figura 29** mostra os *dot plots* representativos da análise da citometria de fluxo para a avaliação da produção espontânea de  $H_2O_2$  pelas células após ativação com PMA e o efeito do éster alquílico P4 como inibidor da produção do oxidante. O quadrante superior direito representa positividade para rodamina 123 em neutrófilos (**Figura 29B, 29E, 29H**) e o quadrante inferior direito, para monócitos (**Figura 29C, 29F, 29I**). Os valores presentes nos quadrantes representam a porcentagem de células produtoras de  $H_2O_2$ .

A **Figura 30** mostra os *dot plots* representativos da análise da produção de peróxido de hidrogênio realizada com neutrófilos estimulados com *Staphylococcus aureus*. Assim como mencionado na figura anterior, a positividade para rodamina 123 em neutrófilos é representada pelo quadrante superior direito, no qual está presente o valor correspondente a frequência de células capazes de produzir  $H_2O_2$ .



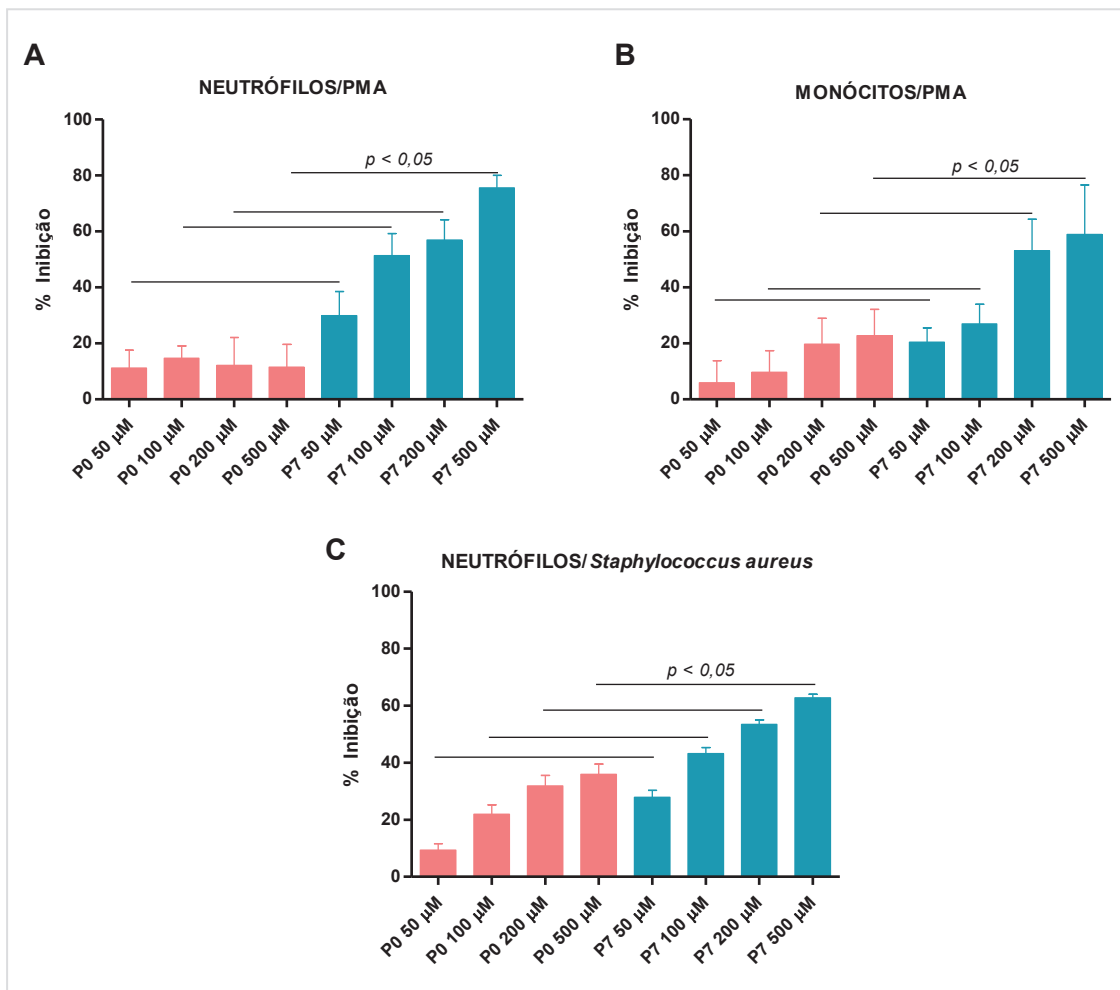
**Figura 29.** Dot plots representivos dos *gates* das populações de neutrófilos e monócitos, estimulados ou não com PMA, utilizando como parâmetro o tamanho (*forward scatter*, FSC) e granulosidade celular (*side scatter*, SSC) para análise da produção de  $H_2O_2$  intracelular. **A)** Dot plot para análise da produção espontânea de  $H_2O_2$ . **B)** Produção espontânea de  $H_2O_2$  por neutrófilos. **C)** Produção espontânea de  $H_2O_2$  por monócitos. **D)** Dot plot representativo dos *gates* de neutrófilos e monócitos estimulados com PMA (controle positivo). **E)** Produção de  $H_2O_2$  por neutrófilos estimulados com PMA. **F)** Produção de  $H_2O_2$  por monócitos estimulados com PMA. **G)** Dot plot representativo dos *gates* de neutrófilos e monócitos tratados com P4 e estimulados com PMA. **H)** Produção de  $H_2O_2$  por neutrófilos tratados com P4 e estimulados com PMA. **I)** Produção de  $H_2O_2$  por monócitos tratados com P4 e estimulados com PMA.



**Figura 30.** *Dot plots* representativos dos *gates* da população de neutrófilos, estimulados ou não com *Staphylococcus aureus*, tendo como parâmetro o tamanho (*forward scatter*, FSC) e granulosidade celular (*side scatter*, SSC) para análise da produção de  $H_2O_2$  intracelular. **A)** *Dot plot* para análise da produção espontânea de  $H_2O_2$ . **B)** Produção espontânea de  $H_2O_2$  por neutrófilos. **C)** *Dot plot* representativo do *gate* de neutrófilos estimulados com *Staphylococcus aureus* (controle positivo). **D)** Produção de  $H_2O_2$  por neutrófilos estimulados com *Staphylococcus aureus*. **E)** *Dot plot* representativo do *gate* de neutrófilos tratados com P4 e estimulados com *Staphylococcus aureus*. **F)** Produção de  $H_2O_2$  por neutrófilos tratados com P4 e estimulados com *Staphylococcus aureus*.

Os resultados foram expressos pela Média de Intensidade de Fluorescência (MFI, *mean fluorescence intensity*) e porcentagem de células produtoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A partir destes, os cálculos de porcentagem de inibição foram determinados pelo resultado de cada amostra em relação a seu controle positivo, sendo que este último foi isento da adição das substâncias em estudo. Como mencionado anteriormente, um controle negativo foi feito para que a produção espontânea de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelas células fosse descontada durante as análises no *software FlowJo*. Sendo assim, os dados representados pela porcentagem indicam a quantidade de células capazes de produzir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a partir destes, um cálculo foi realizado no que diz respeito a porcentagem de células que sofreram inibição dessa produção (quando as substâncias foram adicionadas). Os dados representados pelo MFI equivalem a média da quantidade total de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido e a partir destes, o cálculo da porcentagem de inibição deste oxidante foi calculado para determinar se na presença das substâncias essa quantidade foi alterada. Tendo em vista o objetivo do nosso estudo, decidiu-se mostrar apenas os resultados referentes a porcentagem de inibição do MFI, os quais apresentaram maior relevância, a fim de complementar os resultados obtidos no ensaio com Amplex Red, que determinou a inibição da produção extracelular de peróxido de hidrogênio.

A **Figura 31** mostra três gráficos concentração-resposta, onde a porcentagem de inibição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentou de acordo com o aumento da concentração de P0 e P7, com exceção dos neutrófilos ativados com PMA, onde P0 apresentou efeito inibidor praticamente irrelevante e não apresentou diferença estatística (dados não mostrados) nas respostas em relação ao aumento da sua concentração (**Figura 31A**).



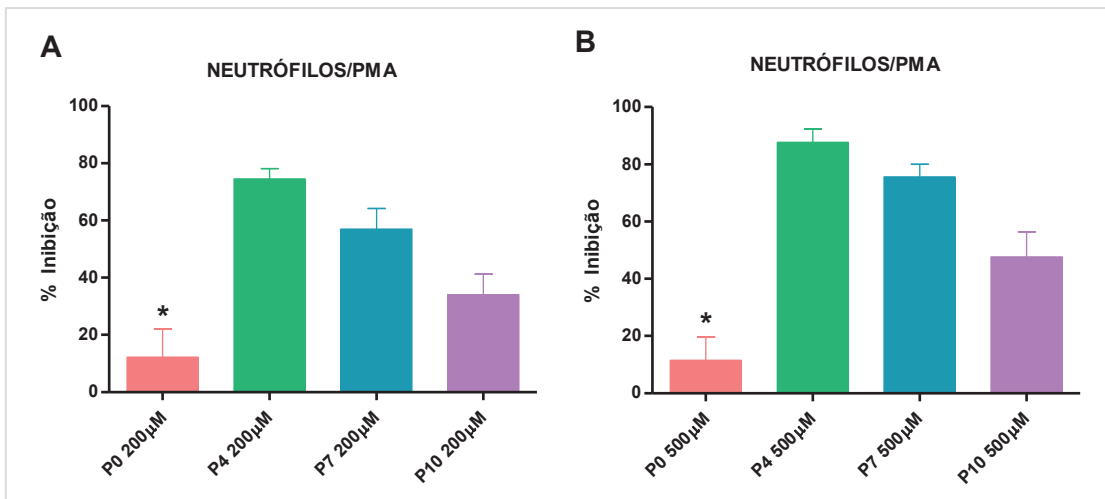
**Figura 31.** Porcentagem de inibição de peróxido e hidrogênio sobre o MFI (Média da intensidade de Fluorescência). Neutrófilos e monócitos ( $3 \times 10^5$  células/mL) foram pré-incubados com P0 e P7 (50, 100, 200 ou 500  $\mu\text{M}$ ) com posterior estimulação com PMA (2  $\mu\text{M}$ ) ou *Staphylococcus aureus* (na proporção de 10 microrganismos para 1 célula). DHR (20  $\mu\text{g/mL}$ ) foi adicionado. A população de monócitos e neutrófilos foram delimitadas através de *gates*, utilizando como parâmetros o tamanho (*forward scatter*, FSC) e a granulosidade celular (*side scatter*, SSC). Foram salvos 2000 eventos no gate de monócitos e os dados obtidos foram analisados no *software FlowJo*. **A)** Neutrófilos ativados com PMA. **B)** Monócitos ativados com PMA. **C)** Neutrófilos ativados com *Staphylococcus aureus*. (One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey).

Tanto em neutrófilos (**Figura 31A**) quanto em monócitos (**Figura 31B**) o éster P7 mostrou maior capacidade de inibição quando comparado ao seu ácido precursor, resultado que se assemelha a inibição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  extracelular (Amplex Red). Sendo assim, P7 apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação a P0 quando as duas substâncias foram comparadas de acordo

com cada concentração utilizada, independente do estímulo e da população celular. Quando neutrófilos foram estimulados com a bactéria (**Figura 31C**), P0 apresentou maiores índices de inibição de acordo com o aumento de sua concentração, mas ainda assim não mostrou ter melhor efeito inibidor em relação aos resultados apresentados pelo éster P7. Ainda com relação ao P0, observou-se que o ácido protocatecúico apresentou maior capacidade de inibição quando neutrófilos foram estimulados com a bactéria em relação aos neutrófilos ativados com PMA.

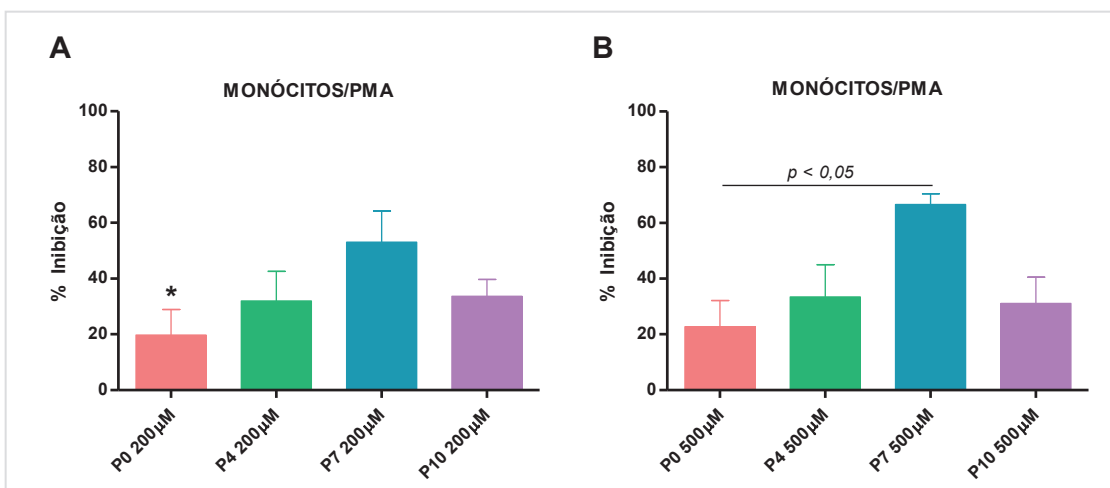
As concentrações de 200  $\mu\text{M}$  e 500  $\mu\text{M}$  não apresentaram diferença significativa entre ambas, tanto para P0 quanto para P7, (com exceção do P7, quando os neutrófilos foram ativados com PMA) (dados não mostrados). Tendo em vista essas observações e o fato de que a melhor substância (P7) apresentou capacidade de inibição acima de 50% para as duas concentrações, decidiu-se avaliar se P4 e P10 também apresentavam melhor capacidade de inibição comparada a seu ácido precursor, nestas mesmas concentrações.

A **Figura 32** mostra P4 e P10 nas concentrações de 200  $\mu\text{M}$  e 500  $\mu\text{M}$  e a inibição do peróxido de hidrogênio intracelular sobre a média da intensidade de fluorescência (MFI) produzida, quando os neutrófilos foram ativados com PMA. Os resultados obtidos para P0 e P7 também foram colocados nos gráficos para fins comparativos de todos os ésteres utilizados no ensaio em relação ao seu ácido precursor. Tanto na concentração menor quanto na maior concentração testada, os ésteres mostraram capacidade de inibição significativamente maior quando comparada ao P0, com  $p < 0,05$ . P4 revelou o melhor resultado em relação aos outros ésteres, nas duas concentrações, com  $p < 0,05$  (dado não mostrado), onde  $P4 > P7 > P10$ .



**Figura 32.** Porcentagem de inibição de peróxido de hidrogênio sobre a Média da intensidade de Fluorescência (MFI) produzida. Neutrófilos ativados com PMA. **A)** Ésteres do ácido protocatecúico nas concentrações de 200 µM e **B)** 500 µM. \*: valor significativamente menos quando comparado aos ésteres ( $p < 0,05$ ). (One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey).

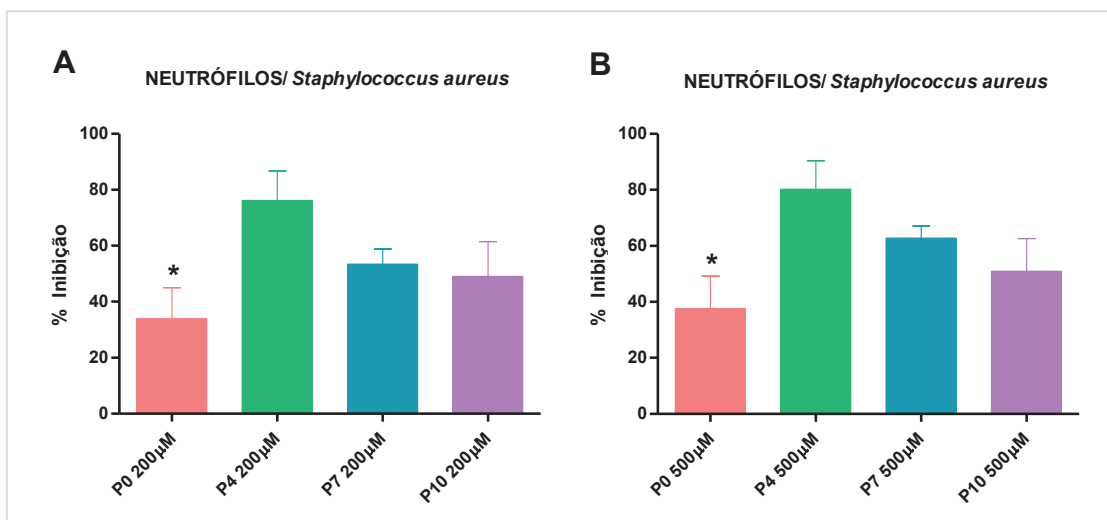
Em monócitos ativados com PMA, a capacidade de inibição de peróxido de hidrogênio intracelular, pelos ésteres do ácido protocatecúico, foi menor do que aquela apresentada quando neutrófilos foram ativados com o mesmo estímulo (**Figura 33A, 33B**).



**Figura 33.** Porcentagem de inibição de peróxido de hidrogênio sobre a Média da intensidade de Fluorescência (MFI) produzida. Monócitos ativados com PMA. **A)** Ésteres do ácido protocatecúico nas concentrações de 200 µM e **B)** 500 µM. \*: valor significativamente menos quando comparado aos ésteres ( $p < 0,05$ ). (One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey).

E apesar de P4 e P10 mostrarem diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação a P0, na concentração de 200  $\mu\text{M}$  (**Figura 33A**), o éster que apresentou maior potencial de inibição, com diferença significativa em relação ao ácido precursor foi o protocateculato de heptila (P7), em ambas as concentrações utilizadas no ensaio. Ainda, entre os ésteres alquílicos, P7 foi a substância que apresentou melhor capacidade de inibição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  intracelular produzido por monócitos ativados com PMA, nas duas concentrações testadas, com  $p < 0,05$  (dado não mostrado).

Entre as substâncias testadas na concentração de 500  $\mu\text{M}$ , P7 foi o único éster que apresentou diferença significativa de potencial de inibição em relação ao seu precursor ácido. O mesmo também mostrou diferença significativa em relação aos outros ésteres na mesma concentração ( $p < 0,05$ , dado não mostrado). A seguir, a **Figura 34** mostra a capacidade das substâncias em estudo, nas concentrações de 200  $\mu\text{M}$  (**Figura 34A**) e 500  $\mu\text{M}$  (**Figura 34B**), de inibirem o  $\text{H}_2\text{O}_2$  intracelular produzido por neutrófilos ativados através da fagocitose de *Staphylococcus aureus*.



**Figura 34.** Porcentagem de inibição de peróxido de hidrogênio sobre a Média da intensidade de Fluorescência (MFI) produzida. Neutrófilos ativados com *Staphylococcus aureus*. **A)** Ésteres do ácido protocatecúico nas concentrações de 200  $\mu\text{M}$  e **B)** 500  $\mu\text{M}$ . \*: valor significativamente menos quando comparado aos ésteres ( $p < 0,05$ ). (One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey).

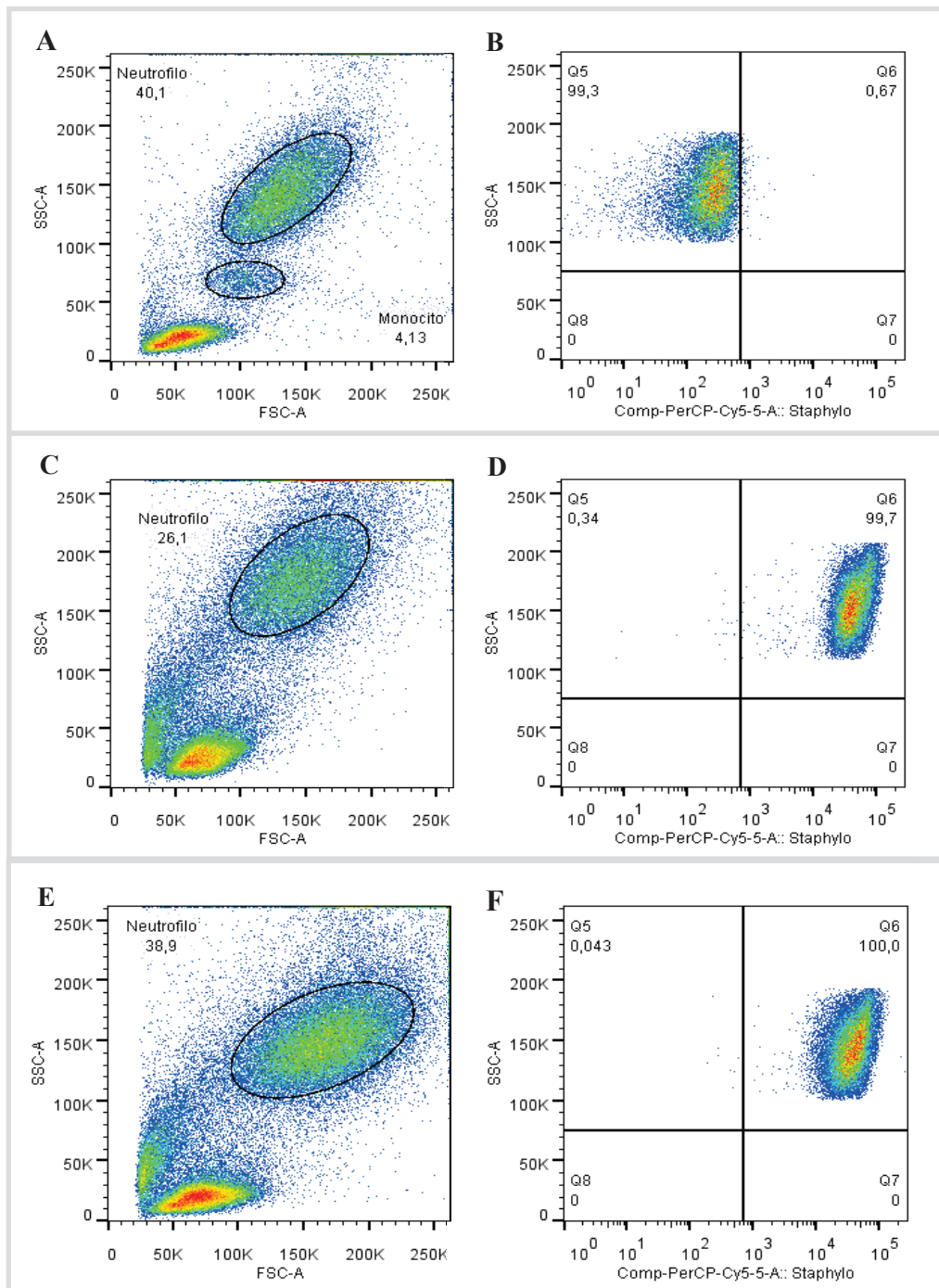


Os resultados apresentados revelaram que a inibição deste oxidante, sobre a média da intensidade de fluorescência (MFI) produzida, foi maior na presença dos ésteres alquílicos do que na presença do ácido protocatecúico, com diferença estatística de  $p < 0,05$  para todos os ésteres em relação ao P0, em ambas as concentrações. Da mesma maneira que ocorreu quando neutrófilos foram ativados com PMA, P4 mostrou ser o mais potente inibidor, mesmo em relação aos outros ésteres ( $p < 0,05$ , dado não apresentado).

#### 4.17. Ensaio de fagocitose por citometria de fluxo

Através do ensaio do DHR, foi possível avaliar, conjuntamente, se o ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos foram capazes de interferir na atividade fagocítica de neutrófilos ativados com *Staphylococcus aureus*. Portanto, assim como mencionado anteriormente, as células foram delimitadas através de *gates* utilizando os mesmos parâmetros, tamanho (*forward scatter*, FSC) e granulosidade celular (*side scatter*, SSC). Os resultados foram expressos pela Média de Intensidade de Fluorescência (MFI, *mean fluorescence intensity*), que corresponde a média da quantidade total de bactérias que cada célula internalizou e, pela porcentagem, que corresponde a quantidade de células com capacidade fagocítica. O cálculo de porcentagem de inibição da quantidade de bactérias internalizadas foi determinado pelo resultado de cada amostra em relação a seu controle (estimulado com a bactéria, porém isento da adição das substâncias em estudo). O controle negativo, o qual foi isento da adição das substâncias em estudo e da bactéria, foi utilizado para descartarmos qualquer fluorescência espontânea das células.

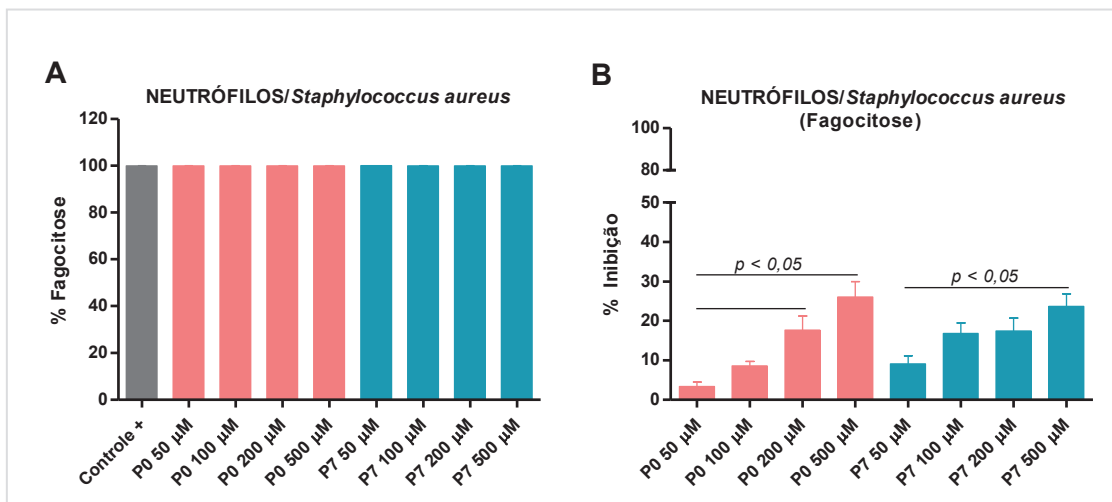
A seguir, a **Figura 35** mostra os *dot plots* representativos da análise da citometria de fluxo que avaliou a fagocitose de *Staphylococcus aureus* por neutrófilos e se esta função efetora foi alterada pelo ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos.



**Figura 35.** Dot plots representivos dos gates da população de neutrófilos para avaliação da fagocitose de *Staphylococcus aureus* (marcados com PI), na presença ou não do ácido protocatecúico e seus ésteres, tendo como parâmetro o tamanho (*forward scatter*, FSC) e granulosidade celular (*side scatter*, SSC). **A)** Dot plot do controle negativo (isento da adição da bactéria). **B)** Ausência de neutrófilos com atividade efetora (fagocitose) ativa. **C)** Dot plot representativo do gate de neutrófilos estimulados com *Staphylococcus aureus* (controle positivo). **D)** População de neutrófilos que fagocitaram *Staphylococcus aureus*. **E)** Dot plot representativo do gate de neutrófilos tratados com P4 e estimulados com *Staphylococcus aureus*. **F)** População de neutrófilos tratados com P4 que fagocitaram *Staphylococcus aureus*. Ausência de alteração na quantidade de fagócitos funcionais.

O primeiro quadro trata-se do *dot plot* de um controle negativo (**A**), no qual a bactéria não foi adicionada a reação e, portanto não houve estimulação celular nem fagocitose (**B**). O *dot plot* do controle positivo pode ser observado em (**C**), onde *S. aureus* foi adicionado à reação e, portanto a fagocitose foi observada em (**D**). Após a adição de P4 (**E**) observou-se que a quantidade de células com atividade efetora hábil não foi alterada, como podemos observar no quadrante superior direito, em (**D**), que mostra a porcentagem de células com capacidade fagocítica.

O resultado apresentado na **Figura 36A** equivale a porcentagem de células com capacidade fagocítica. Diante do exposto, observou-se que as células não sofreram qualquer alteração na sua atividade efetora, sendo que 100% delas foram capazes de fagocitar as bactérias mesmo na presença de P0 e P7, visto que, as diferentes concentrações de ambas não alteraram este resultado (gráficos concentração-resposta). Com relação a alteração da quantidade de bactérias internalizadas pelos fagócitos, observou-se que esta aumentou de acordo com o aumento da concentração das substâncias, tanto de P0 quanto de P7 (**Figura 346B**). Porém, a inibição máxima chegou a apenas 26% para ambas as substâncias em 500  $\mu\text{M}$ . Não houve diferença significativa entre P0 e P7, entre qualquer concentração utilizada. As diferenças estatísticas foram observadas apenas entre as diferentes concentrações usadas de uma mesma substância, sendo que para o ácido protocatecúico, 50  $\mu\text{M}$  foi significativamente diferente de 200  $\mu\text{M}$  e 500  $\mu\text{M}$  significativamente melhor que 50  $\mu\text{M}$ . Para o P7, observou-se diferença significativa apenas entre 50  $\mu\text{M}$  e 500  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ).

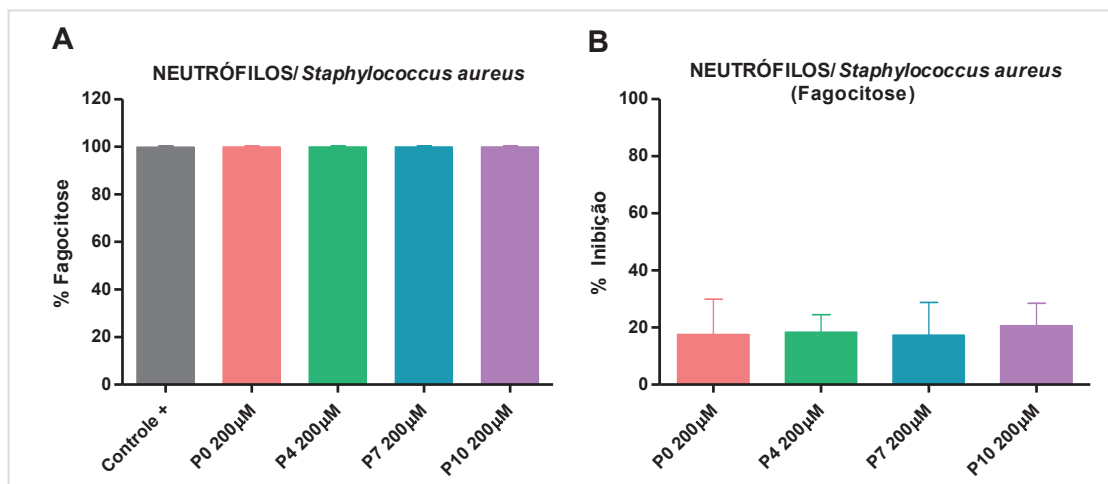


**Figura 36.** Ácido protocatecúico e protocateculato de heptila e a capacidade de alteração da atividade efetora de neutrófilos (Fagocitose). A) Porcentagem de neutrófilos com capacidade fagocítica. Controle positivo: estimulado com *Staphylococcus aureus*, porém isento de qualquer substância de estudo. B) Inibição da porcentagem de bactérias internalizadas pelos neutrófilos. (One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey).

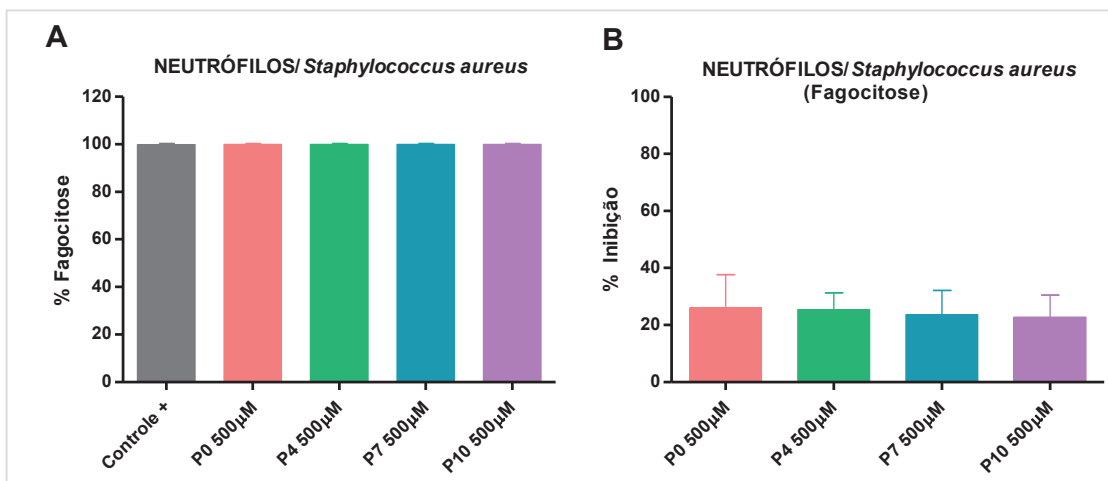
Os protocateculatos de butila e decila também foram testados em relação a fagocitose, juntamente ao ensaio de DHR. E assim como P7 e o ácido precursor, na concentração de 200 µM, não foram capazes de alterar a função efetora dos neutrófilos, no que diz respeito a quantidade de células com habilidade fagocitária (**Figura 37A**). Em relação a porcentagem de bactérias que foram internalizadas, não houve diferença significativa entre nenhuma das substâncias quanto a esta alteração, a qual não ultrapassou 20% de inibição (**Figura 37B**).

O mesmo ocorreu para P4 e P10, na concentração de 500 µM, que não apresentaram potencial para alterarem a atividade fagocítica dos neutrófilos estimulados com *Staphylococcus aureus*. Sendo assim, mesmo na presença das substâncias de estudo, na maior concentração, os neutrófilos continuaram apresentando 100% da sua atividade de fagocitose, resultado idêntico ao controle positivo da reação (**Figura 38A**). No que diz respeito aos resultados apresentados na **Figura 38B**, as substâncias inibiram em média 25% da internalização bacteriana em relação a quantidade de bactérias

fagocitadas na amostra controle (100%, dado não mostrado no gráfico). Não foi observada diferença significativa entre o ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos em relação a esta alteração.



**Figura 37.** Ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos, na concentração de 200 µM, e a capacidade de alteração da atividade efetora de neutrófilos (Fagocitose). **A**) Porcentagem de neutrófilos com capacidade fagocítica. Controle positivo: estimulado com *Staphylococcus aureus*, porém isento de qualquer substância de estudo. **B**) Inibição da porcentagem de bactérias internalizadas pelos neutrófilos. (One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey).



**Figura 38.** Ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos, na concentração de 500 µM, e a capacidade de alteração da atividade efetora de neutrófilos (Fagocitose). **A**) Porcentagem de neutrófilos com capacidade fagocítica. Controle positivo: estimulado com *Staphylococcus aureus*, porém isento de qualquer substância de estudo. **B**) Inibição da porcentagem de bactérias internalizadas pelos neutrófilos. (One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey).

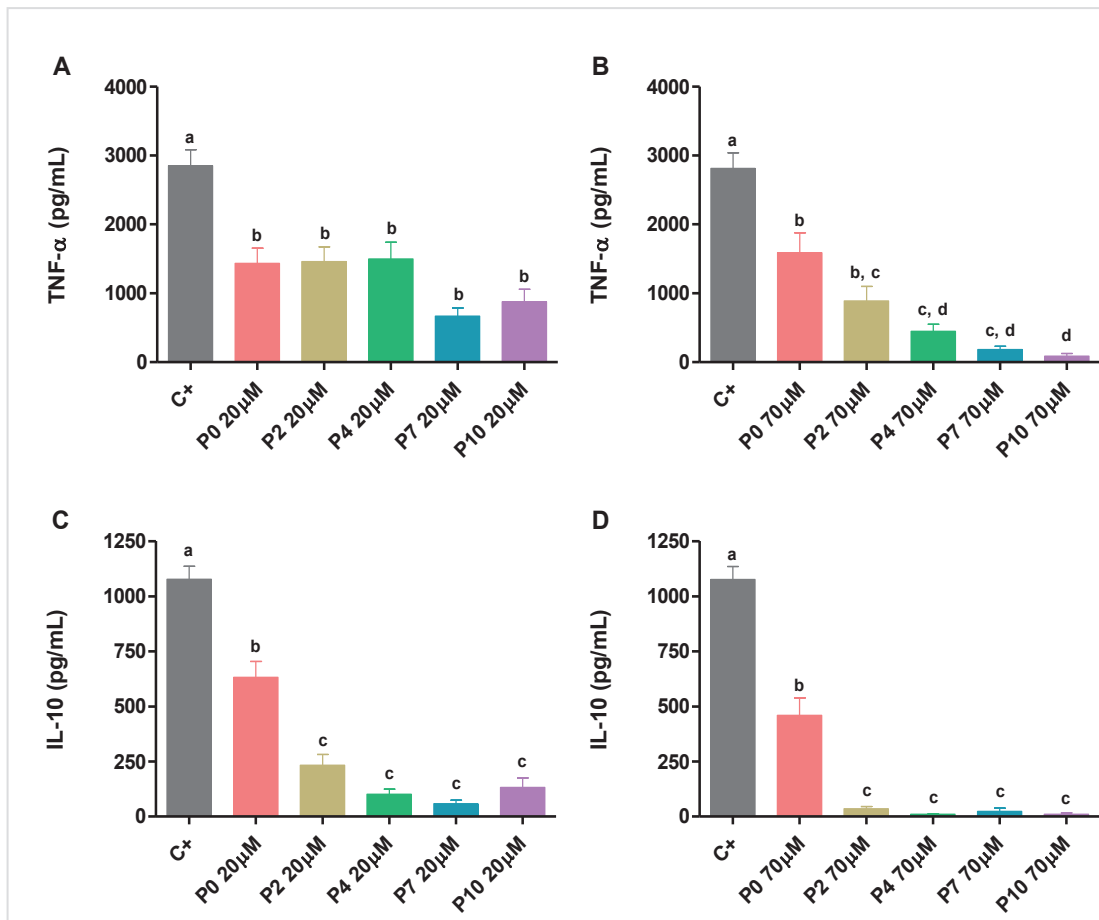
#### 4.18. Quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias (ELISA) no sobrenadante das culturas

A quantificação da produção de TNF- $\alpha$  e IL-10 foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) a partir dos sobrenadantes das culturas de monócitos, os quais foram ativados com *Staphylococcus aureus*. A **Figura 39** mostra a produção das citocinas em pg/mL, onde **A** e **B** apresentam os resultados de TNF- $\alpha$  e, **C** e **D** referem-se a produção de IL-10, onde as substâncias foram testadas nas concentrações de 20  $\mu$ M e 70  $\mu$ M.

Referente ao controle positivo foi observada inibição da produção da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  por todas as substâncias em estudo tanto na concentração de 20  $\mu$ M quanto na concentração de 70  $\mu$ M, onde  $p < 0,05$ . A **Figura 39A** mostra que na menor concentração testada, tanto os ésteres quanto o ácido precursor não tiveram diferença significativa de inibição da produção de TNF- $\alpha$ , onde a produção média da citocina foi de 1187 pg/mL. Porém, a produção de TNF- $\alpha$  diminuiu quando foi usada a maior concentração das substâncias (70  $\mu$ M) (**Figura 39B**). Neste caso, onde o ácido protocatecúico foi testado, não houve mudança na quantidade de citocina produzida em relação a menor concentração. Com exceção do P2, os demais ésteres apresentaram diferença significativa na inibição da produção de TNF- $\alpha$  quando comparado com o ácido precursor.

Com relação à quantificação da citocina anti-inflamatória IL-10 (**Figura 39C e 39D**) observou-se que para ambas concentrações utilizadas no ensaio todas as substâncias demonstraram promover uma diminuição na produção da citocina quando comparada ao controle positivo, ao qual não foi adicionada nenhuma substância. Mas quando comparamos o ácido protocatecúico a seus ésteres alquílicos, observamos uma grande diminuição da produção de IL-10 nas amostras tratadas com os ésteres, sendo que a produção da citocina foi significativamente diferente no que diz respeito a essa comparação ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença significativa da produção da

citocina nos resultados obtidos entre os ésteres, tanto na concentração de 20  $\mu\text{M}$  (**Figura 39C**) quanto na concentração de 70  $\mu\text{M}$  (**Figura 39D**). Ainda, na maior concentração utilizada, a produção de IL-10 foi inibida praticamente por completo nas amostras tratadas com os ésteres do ácido protocatecúico.



**Figura 39.** Quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias no sobrenadante das culturas de monócitos, por ELISA. Cultura de células:  $1 \times 10^6$  monócitos/mL cultivados em meio RPMI-1640 + SFB. **A)** Produção de TNF- $\alpha$  por monócitos estimulados com *Staphylococcus aureus*, na presença do ácido protocatecúico ou seus ésteres alquílicos, na concentração de 20  $\mu\text{M}$  e **B)** 70  $\mu\text{M}$ . **C)** Produção de IL-10 por monócitos estimulados com *Staphylococcus aureus*, na presença do ácido protocatecúico ou seus ésteres alquílicos, na concentração de 20  $\mu\text{M}$  e **D)** 70  $\mu\text{M}$ . Controle positivo isento de qualquer substância de estudo. (One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey). Letras iguais: não há diferença significativa. Letras diferentes: há diferença significativa,  $p < 0,05$ .

Diante destes resultados, podemos afirmar que a hidrofobicidade das substâncias, mais uma vez, teve importante efeito no que diz respeito a capacidade de inibição da produção de citocinas, tanto de TNF- $\alpha$  quanto de IL-10. Mesmo que para TNF- $\alpha$ , aparentemente sejam necessárias concentrações mais altas, que confirmem que a hidrofobicidade é um importante fator para inibição desse mecanismo biológico.





## 5. DISCUSSÃO

Vários estudos já evidenciaram o envolvimento da NADPH oxidase na gênese e/ou progressão de doenças vasculares, degenerativas e inflamatórias, que incluem vasculite, aterosclerose, artrite, hipertensão, doença de Alzheimer, Parkinson e esclerose múltipla (SIMONYI *et al.*, 2010; FISCHER *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2012). Fato que conseqüentemente envolve o *burst* oxidativo e sua produção de diversas espécies reativas de oxigênio (EROs), que apesar de ser um importante mecanismo de defesa do hospedeiro, a produção excessiva desses oxidantes resulta no estresse oxidativo, um processo deletério que pode conduzir a danos celulares e teciduais, alterações da função do material genético, envelhecimento e morte celular, além de interromper o estado funcional e a integridade da membrana lipídica (TOPIC *et al.*, 2002; SHI *et al.*, 2006). Pode também induzir rupturas no DNA de fita simples, mutações genéticas e aberrações cromossômicas (MENEHINI, MARTINS, 1993; ANAZETTI, MELO, 2007). Por esta razão, várias substâncias têm sido estudadas como agentes terapêuticos promissores no tratamento de doenças inflamatórias crônicas com o objetivo de serem inibidores potentes e específicos de NADPH oxidase (DRUMMOND *et al.*, 2011) .

Dentro deste contexto, compostos fenólicos vêm sendo pesquisados e utilizados na medicina tradicional. Suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias já são largamente reconhecidas e a grande vantagem destes compostos, como fármacos em potencial, é sua baixa toxicidade em relação a outras drogas padrão (PASTENE *et al.*, 2009; LENDE, *et al.*, 2011).

A exemplo disso, citamos o ácido protocatecúico (ácido 3,4-hidroxibenzoico), um derivado do ácido benzoico, que pode ser encontrado em frutas, castanhas, legumes, arroz integral, nozes, bebidas derivadas de plantas (por exemplo, chá, vinho de uva branca) e em medicamentos fitoterápicos (BABICH, SEDLETCAIA, KENIGSBURG, 2002). Além de ser

isolado de várias plantas, como *Hibiscus sabdariffa* (LIU *et al.*, 2002), *Alpinia Oxyphylla* (SHI *et al.*, 2006), entre outras e, apresentar propriedades anti-inflamatórias e analgésicas (LENDE *et al.*, 2011).

A esterificação de ácidos fenólicos tem sido usada como ferramenta adicional, para melhorar os efeitos biológicos destas moléculas antioxidantes. Estes efeitos incluem o aumento do seu potencial anti-inflamatório, antimutagênico e antitumoral, como agentes antifúngicos e antibacterianos e quanto a sua citotoxicidade (CHALAS *et al.*, 2001; FENG *et al.*, 2003; KUBO *et al.*, 2004; LOCATELLI *et al.*, 2008; MORAIS *et al.*, 2010; XIMENES *et al.*, 2010). Esse aumento de potencial gerado após o processo de esterificação, já foi verificado em vários estudos feitos com ácidos fenólicos e seus ésteres, por exemplo, o ácido gálico em relação a seu éster galato de propila (FENG *et al.*, 2003; KUBO *et al.*, 2004; LOCATELLI *et al.*, 2008; MORAIS *et al.*, 2010; XIMENES *et al.*, 2010; YOU, PARK, 2011; CHEN *et al.*, 2011).

Sabendo que vários estudos têm reportado que a hidrofobicidade, por trás das propriedades redox dos ácidos fenólicos, pode ser um fator decisivo em relação a suas propriedades biológicas (CHALAS *et al.*, 2001; XIMENES *et al.*, 2010; YOU, PARK, 2011; CHEN *et al.*, 2011), promovemos sua esterificação pra avaliar se isso levaria a uma atividade sobre a inibição da enzima NADPH oxidase.

Como pode ser observado na **Figura 5**, a esterificação do ácido protocatecúico provocou uma alteração significativa na hidrofobicidade das substâncias. Embora os resultados da voltametria cíclica (**Figura 6**) não tenham demonstrado diferença significativa do potencial de oxidação do ácido protocatecúico em relação a seus ésteres alquílicos, no decorrer da realização dos experimentos, os resultados parciais indicaram que o aumento da hidrofobicidade derivada dessa esterificação, induziu a um aumento da capacidade sequestradora de radicais livres. Apesar de não significativo, foi observada uma maior intensidade dos picos de oxidação obtidos nos

voltamogramas dos ésteres em comparação ao seu precursor ácido. Esta propriedade, já havia sido observada para os ésteres metila, etila e propila, e isso foi explicado pela maior estabilidade dos intermediários de radicais livres gerados durante a sua oxidação (REIS *et al.*, 2010). Esta propriedade pode influenciar a sua reatividade com grupos reativos essenciais nos componentes proteicos de NADPH oxidase, e como consequência, contribuir para a maior eficácia dos ésteres.

Considerando que os efeitos biológicos estão geralmente ligados às propriedades redox destas moléculas, decidiu-se verificar se a alquilação do ácido protocatecúico poderia mudar sua característica anti-radicaís.

Saito e Kawabata, (2006) demonstraram, pelo ensaio de redução do radical estável DPPH, que a capacidade sequestradora do DPPH do protocateculato de metila (P1) foi duas vezes maior em relação ao seu precursor. Essa propriedade foi explicada pelo aumento da reatividade do intermediário *o*-quinona gerado pela oxidação do protocateculato de metila em solvente alcoólico, expandindo, portanto sua capacidade antioxidante (SAITO, KAWABATA, 2006). Esta característica também foi demonstrada por outros ésteres do ácido protocatecúico: protocateculato de etila (P2) e propila (P3) (REIS *et al.*, 2010). Em concordância, nosso ensaio com DPPH revelou resultados similares para o protocateculato de etila (P2), butila (P4) e heptila (P7) mostrados na **Figura 7A**.

A mesma propriedade foi observada em relação a redução de radicais peroxila em meio aquoso (**Figura 7B, 7C e 7D**). Esses resultados indicam que o aumento da capacidade antioxidante destes ésteres do ácido protocatecúico também pode estar presente em soluções aquosas, que estão mais próximas das condições fisiológicas.

Os ensaios de DPPH e redução de radicais peroxila avaliaram as características anti-radicaís do ácido protocatecúico após alquilação e obtenção de seus ésteres. Vários pesquisadores já haviam demonstrado

através destes ensaios que os ésteres do P0 apresentam melhor potencial antioxidante em relação ao seu ácido precursor (SAITO, KAWABATA, 2006; REIS *et al.*, 2010) e nossos resultados foram similares aos da literatura. Para complementar estes resultados, um ensaio *ex vivo* foi realizado para avaliar se tanto o ácido protocatecúico quanto seus ésteres seriam capazes de proteger a membrana de eritrócitos frente a radicais peroxila produzidos a partir da decomposição do AAPH a 37°C.

O estudo da hemólise de eritrócitos (a que se refere o estudo acima citado) tem sido amplamente usado como um modelo *ex vivo* para o estudo da ruptura de membranas celulares induzida por espécies reativas de oxigênio e, para avaliar o efeito protetor de antioxidantes (XIMENES *et al.*, 2010).

O fato de a membrana eritrocitária ser ricamente composta por ácidos graxos poli-insaturados oferece a ela maior susceptibilidade ao ataque de radicais livres, o que a torna um bom modelo experimental para estudos de lesão oxidativa. A ação destes radicais pode levar a uma série de alterações, entre elas, a formação de lipoperóxidos, redução da deformabilidade, mudanças na morfologia, fragmentação de proteínas, hemólise e alterações no metabolismo intracelular (SANDHU *et al.*, 1992; SATO *et al.*, 1995; BEGUM, TERAQ, 2002; SCHMITZ *et al.*, 2008). Sato e colaboradores (1995) demonstraram que a hemólise é causada por, pelo menos, dois eventos: a lipoperoxidação e a redistribuição da proteína de banda 3 (proteína da dupla camada lipoprotéica que auxilia na deformidade da membrana eritrocitária, conferindo a possibilidade da passagem da hemácia por capilares de pequeno diâmetro). Essa redistribuição leva a formação de poros na membrana e a alteração do formato característico bicôncavo dos eritrócitos para esferócito, alteração na qual, *in vivo*, resultaria em hemólise e anemia. Simão e colaboradores (2007) avaliaram os mecanismos de injúria oxidativa intracelular pela avaliação do perfil espectral da hemoglobina e seus

derivados e demonstraram uma queda dos níveis intracelulares de oxihemoglobina e aumento nos níveis de metahemoglobina e hemicromo, produtos da sua oxidação. Portanto, os radicais peroxila gerados no meio extracelular foram capazes de causar oxidação intracelular ou ainda uma ação oxidativa indireta através da aceleração da oxidação da hemoglobina liberada no meio extracelular após hemólise. Seus estudos também mostraram o aumento de malondialdeído (MDA), um produto resultante da lipoperoxidação. Esses resultados apontam a importância de se estudar substâncias como agentes inibidores da hemólise oxidativa, assim como inibidores da produção de EROs, pois é importante ressaltar que quando os eritrócitos são desafiados com radicais livres, também pode ocorrer interação direta com a membrana celular resultando em ruptura da mesma (FRECER, 2006; STAREK *et al.*, 2008).

Nossos resultados apontaram os ésteres do ácido protocatecúico como potenciais inibidores da hemólise oxidativa, sendo que o protocateculato de butila (P4) apresentou maior proteção nas três concentrações testadas, em relação ao seu ácido precursor e seus outros ésteres. P2, P7 e P10, na concentração de 100  $\mu\text{M}$  (**Figura 9**), mostraram potencial de inibição relativamente bom em 4 horas de incubação, porém não foram capazes de manter este resultado até 6 horas. Na concentração de 200  $\mu\text{M}$  (**Figura 10**) observaram-se ótimos resultados de inibição, sendo que todos os ésteres do ácido protocatecúico foram mais eficazes na inibição da hemólise induzida por AAPH quando comparado ao seu precursor (P0), com diferença significativa de  $p < 0,05$ . Esses resultados foram observados tanto em 4 quanto em 6 horas de incubação. Vale ressaltar que este efeito protetor é dose dependente e que apenas P0 mostrou não ter efeito protetor algum, pelo contrário, demonstrou possível indução da hemólise. Nossos resultados foram similares aos descritos por Ximenes e colaboradores (2010), que estudaram o ácido gálico e seus ésteres como inibidores da hemólise oxidativa induzida por AAPH e

mostraram que os ésteres foram mais eficientes do que seu precursor ácido. E que a inibição da hemólise também foi dose-dependente. Assim como os nossos resultados, estes pesquisadores confirmaram que a lipofilicidade da substância de estudo é uma característica essencial para o efeito inibidor da hemólise de eritrócitos e isso não se restringe apenas a hemólise induzida por AAPH, mas também por outros radicais livres.

Quando os neutrófilos são ativados, as EROs geradas podem converter, via oxigenação, sondas quimiluminescentes, como o luminol e a lucigenina, a derivados intermediários instáveis e excitados, induzindo a emissão de luz na forma de fótons. A lucigenina é preferencialmente oxidada pelo  $O_2^{\cdot-}$ . Portanto, enquanto a quimiluminescência dependente do luminol registra a produção total de EROs, a quimiluminescência dependente de lucigenina registra a produção de  $O_2^{\cdot-}$  e reflete apenas a atividade da NADPH oxidase na geração do *burst* oxidativo. Desta forma, o luminol e a lucigenina podem ser utilizados como marcadores de estágios diferentes da produção de EROs. (GASBARRINI *et al.*, 1998; ALVEZ *et al.*, 2003).

Como nosso interesse foi baseado numa possível capacidade de inibição de  $O_2^{\cdot-}$  que as substâncias em estudo poderiam apresentar, refletindo assim uma inibição da atividade de NADPH oxidase, decidiu-se realizar o ensaio de quimiluminescência dependente de lucigenina e um ensaio confirmatório, utilizando uma sonda cromogênica, o WST-1.

Para os ensaios de determinação da produção do  $O_2^{\cdot-}$  por neutrófilos ativados sob o efeito do ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos foi observado que, independente da sonda utilizada, os ésteres apresentaram resultados mais promissores, principalmente o protocateculato de heptila (P7), o qual apresentou um aumento da capacidade de inibição do radical em relação ao seu ácido precursor. O ensaio com lucigenina, combinado ao WST-1, nos confirmou a evidência de que o efeito inibitório não é devido a interação dos ésteres com as sondas luminescentes ou cromogênicas

utilizadas, tanto é que essa capacidade inibitória também foi observada no estudo de morfologia de neutrófilos (citado mais adiante), o qual não envolve adição de sondas.

Vale notar que o potencial de inibição do  $O_2^{\cdot-}$  pelo P7 foi 10 vezes mais efetivo quando comparado a apocinina (**Figura 16**). Este metoxi-catecol, amplamente estudado, tem sido muito utilizado como potente inibidor de NADPH oxidase (IMPELLIZZERI *et al.*, 2011; AHMAD *et al.*, 2012; GUIMARÃES, CARVALHO, BRAGA, 2012; SIMONYI *et al.*, 2012; STEFANSKA *et al.*, 2012). Uma recente descoberta nesta área mostra o uso de um trímero de quinona hidroxilada derivado da apocinina e que foi significativamente mais eficaz do que a própria apocinina, em células endoteliais (MORA-PALE *et al.*, 2012). Seu mecanismo de ação foi relatado como sendo uma reação entre os resíduos de cisteína da p47phox, um dos componentes citosólicos da NADPH oxidase, e a porção quinona do trímero (MORA-PALE *et al.*, 2012). Em teoria, o-quinona, que é um produto da oxidação dos ésteres do ácido protocatecúico (SAITO, KAWABATA, 2006), também poderia ter um papel similar no mecanismo de ação das substâncias estudadas aqui.

Um resultado importante observado, e diferente da apocinina, foi que os ésteres do ácido protocatecúico também foram eficazes no que diz respeito ao ensaio com células mononucleares do sangue periférico (PBMC), uma população com baixos níveis de MPO. Sabe-se que uma importante característica da apocinina em relação ao seu mecanismo de inibição da NADPH oxidase é que ela deve ser oxidada para desempenhar seu papel por um mecanismo dependente de MPO (JOHNSON *et al.*, 2002; STEFANSKA, PAWLICZAK, 2008), o que resultaria num efeito diminuído em PBMC. A ausência de diferença entre os resultados obtidos com células PMN e PBMC sob o efeito dos ésteres pode ser explicado pelo fato de que a porção catecol dessas substâncias é facilmente oxidada em comparação com o metoxi-



catecol da apocinina, o que implicaria numa menor dependência do efeito catalítico da MPO.

Ainda, para confirmar e comparar o efeito inibidor do P7 sob o radical ânion superóxido decidiu-se realizar mais um ensaio: a redução do NBT (OLIVEIRA *et al.*, 2009), o qual nos daria resultados em relação a supressão de  $O_2^{\cdot-}$  mas também a possibilidade de observação quanto ao efeito dessas substâncias sob a morfologia das células. A **Figura 18** nos mostrou a porcentagem de inibição do  $O_2^{\cdot-}$  pelo ácido protocatecúico, P7 e apocinina, baseado na presença de cristais de formazana no citoplasma das células (positivas) gerados a partir da redução do NBT pelo  $O_2^{\cdot-}$ . O efeito inibidor de P7 é nitidamente maior quando comparamos com o seu ácido precursor e a apocinina. As fotomicrografias (**Figuras 19A, 19B e 19C**) apresentadas nos evidenciam a diminuição da deposição dos cristais de formazana no citoplasma das células, quando estas são tratadas com o éster P7 (**Figura 19C**), em relação ao controle positivo (**Figura 19B**), onde as células são estimuladas e incubadas na ausência de qualquer substância, apresentando, portanto, cristais de formazana e destruição celular maciça.

A fim de esclarecer a ausência de qualquer interação das substâncias de estudo com sondas utilizadas nos ensaio, decidiu-se realizar um estudo de morfologia baseado no ensaio de NBT, mas na ausência do mesmo, pois o NBT promove destruição celular intensa, tornando difícil uma melhor averiguação da estrutura celular frente uma proteção causada por P7, como visto na **Figura 19**.

Tal como foi demonstrado, PMA estimula uma rápida formação de vacúolos derivados da superfície das células PMN, que se assemelham aos vacúolos que se desenvolvem durante a captação de partículas no processo de fagocitose (HOIDAL *et al*, 1978) (**Figura 20B**). Na **Figura 20C** podemos observar que P7 numa concentração de 10  $\mu$ M apresentou um efeito significativo de proteção contra a ruptura da membrana e a vacuolização das

células, sendo capaz de manter a integridade celular. Além disso, é possível observar uma alteração no núcleo das células ativadas (**Figura 20B**) e quando expostas ao efeito de P7, a alteração não se faz presente, mantendo as células semelhantes as do controle negativo (**Figura 20A**), isento de estimulação por PMA e de substâncias de estudo.

Contudo, em relação ao potencial de inibição da NADPH oxidase, foi demonstrado através de ensaios de inibição do radical ânion superóxido produzido por leucócitos ativados (quimiluminescência dependente de Lucigenina, WST-1 e redução do Nitro Azul de Tetrazólio), que o protocatecolato de heptila (P7) tem maior potencial de inibição quando comparado ao ácido protocatecúico. E entre os ésteres, foi o que apresentou melhores resultados a respeito desta inibição. Sabe-se, portanto, que esses resultados podem ser consequência direta de uma ação sequestradora de  $O_2^{\cdot-}$ , e não de uma inibição da produção deste radical pelas células como consequência da inibição de NADPH oxidase. A fim de confirmar nossos resultados, decidiu-se avaliar o potencial de inibição destas substâncias em relação ao  $O_2^{\cdot-}$  produzido a partir do sistema xantina/xantina oxidase, ou seja, por um sistema independente de NADPH oxidase. A xantina oxidase é conhecida pelo seu papel de enzima reguladora de ácidos nucleicos, através da qual todas as purinas são canalizadas para seu terminal de oxidação, onde juntamente com o ATP podem sofrer um processo de degradação sequencial, culminando na formação da hipoxantina. Nesta via, a hipoxantina é convertida a xantina, que é posteriormente convertida a ácido úrico, através da ação catalítica da enzima xantina oxidase (via de degradação das purinas). Durante esta conversão o oxigênio molecular é reduzido a  $O_2^{\cdot-}$ , servindo de fonte de radicais livres derivados de oxigênio (ANUP, BALASUBRAMANIAN, 2000; MITTAL *et al.*, 2008).

Os resultados do ensaio da xantina/xantina oxidase mostraram (**Figura 21**) que tanto o P0 quanto P7 (na mesma concentração utilizada nos ensaios

anteriores) não foram capazes de reagir com o ânion superóxido produzido por um sistema independente de NADPH oxidase (xantina/xantina oxidase) e que, portanto, nossos resultados não estão relacionados a uma ação sequestradora do radical, e sim a inibição da enzima.

Ainda neste mesmo contexto, fizemos o monitoramento do consumo de oxigênio molecular dissolvido no meio, para avaliar se o ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos teriam ação direta sobre este decaimento, quando células polimorfonucleares foram ativadas com PMA. Numa situação fisiológica normal, após ativação celular e durante o ciclo redox, o oxigênio molecular dissolvido no meio é consumido e reduzido a ânion superóxido (PICHORNER, METODIEWA, WINTERBOURN, 1995; XIMENES *et al.*, 2010). O monitoramento foi realizado durante 20 minutos e tanto P0 quanto P7 foram testados na concentração de 100  $\mu\text{M}$  (**Figura 22**). Observou-se que na presença de P7 a quantidade de oxigênio dissolvido no meio foi mantida, impedindo seu consumo e redução a  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . P0 não apresentou resultados tão promissores quanto seu éster. Portanto, confirmou-se mais uma vez, que o éster do ácido protocatecúico apresenta grande potencial de inibição de NADPH oxidase, desta vez avaliado pela inibição do decaimento de oxigênio molecular dissolvido no meio após ativação de polimorfonucleares. Mais uma vez, a lipofilicidade foi um importante fator no aumento do potencial de inibição das substâncias testadas.

O efeito biológico dos ésteres em células PMN também teve consequências sobre a produção de HOCl por estas células ativadas. Este achado é altamente significativo, pois, além de ser o principal e o mais potente microbicida produzido por essas células (SILVA, 2001), o HOCl é capaz de atacar biomoléculas de importância fisiológica, tais como tióis, tioéteres, aminas, aminoácidos, nucleotídeos e ascorbato, além dos tecidos, visto que células de mamíferos não são capazes de inibir a ação deste radical por via catalítica devido a ausência de defesas enzimáticas contra oxidantes

clorados (WEISS, 1989; LAPENNA, CUCCURULLO, 1996). Além disso, também está relacionado com lesão tecidual em diversas patologias, incluindo doenças cardiovasculares (FORD, 2010; BAI *et al.*, 2011). Os resultados mostrados na **Figura 23** indicam um grande efeito inibitório da produção de HOCl quando as células foram tratadas com os ésteres quando comparadas ao efeito do ácido protocatecúico. Mais uma vez o P7 demonstrou ser o mais eficiente. No entanto, esse resultado reflete o efeito inibitório sobre a produção do  $O_2^{\cdot-}$  que implica uma liberação diminuída extracelular de HOCl por PMN ativados. Isso foi comprovado pelo ensaio realizado com o objetivo de excluir a possibilidade de um efeito sequestrador direto de HOCl, o qual impediria a reação com taurina para produzir taurina cloramina. Fica claro na **Figura 24** que as substâncias foram incapazes de impedir a reação do HOCl com a taurina, e que portanto não se tratava de um efeito sequestrador de HOCl e sim um efeito de inibição sobre o  $O_2^{\cdot-}$ . Outro ensaio foi realizado para verificarmos se o ácido protocatecúico e seus ésteres tinham efeito sobre a ação clorinante da MPO. Num sistema livre de células (excluindo, assim, qualquer interferente que pudesse estar envolvido num ensaio com células), conseguimos confirmar que a capacidade de inibição das substâncias não se tratava de um efeito sobre a MPO. A **Figura 25** mostra altas concentrações de HOCl produzido no meio, e que portanto, nenhuma das substâncias foi capaz de diminuir essa produção de HOCl, ou seja, não houve efeito sobre a MPO.

Portanto se a inibição da liberação de HOCl não está relacionada com efeitos sequestradores de HOCl ou inibição da atividade enzimática clorinante de MPO, conclui-se que seja a inibição da produção de  $O_2^{\cdot-}$  que é o precursor de  $H_2O_2$ , e através da MPO, precursor de HOCl.

Dentro deste contexto, decidiu-se realizar um ensaio a fim de descartar possíveis interferências com qualquer sonda cromogênica. Num ensaio livre de células, realizou-se o monitoramento do consumo de peróxido de hidrogênio, a partir da atividade catalítica da MPO, utilizando um detector e

um biossensor específico para  $H_2O_2$ . Como substância de referência, foi utilizado um potente e conhecido inibidor de MPO, a 5-fluortriptamina. Esta, inibiu a atividade catalítica da MPO e conseqüentemente a produção de HOCl, por isso, o nível de  $H_2O_2$  presente no meio foi mantido durante o monitoramento (**Figura 26B**). Quando P7 foi adicionado à reação, não houve interferência na atividade clorinante da MPO de modo que esta fosse inibida, pelo contrario, na presença de P7 o  $H_2O_2$  presente no meio foi rapidamente consumido, com conseqüente produção de HOCl (**Figura 26C**). Isso indica que P7 atuou como um substrato adicional para a MPO. Ou seja, como um típico substrato da atividade peroxidásica da MPO. Em outras palavras, P7 não inibe a MPO e assim reforça nossa proposta de que em neutrófilos a inibição observada sobre a produção de HOCl se deve a inibição do complexo NADPH oxidase. Tanto o ácido protocatecúico quanto os outros ésteres alquílicos aqui estudados, também apresentaram os mesmos resultados que P7, os quais não foram capazes de inibir a atividade clorinante da MPO (dados não mostrados). Petrônio e colaboradores (2013) também avaliaram a capacidade de inibição do ácido protocatecúico, mas comparada a apocinina (um potente e conhecido inibidor de NADPH oxidase) em relação a atividade clorinante da MPO e revelaram que quando HRP foi utilizado como catalisador da reação, ocorreu o consumo instantâneo do  $H_2O_2$  presente no meio, na presença da apocinina. Fato que não ocorreu com P0. Mais uma indicação de que o ácido protocatecúico não tem ação sequestradora e tão pouco é capaz de inibir a atividade catalítica da MPO, mesmo na presença de um catalisador da reação.

No intuito de completarmos este ciclo, decidimos voltar a atenção a um passo anterior a produção de HOCl dentro do *burst* oxidativo. Visto que nossos ésteres não apresentaram capacidade sequestradora de HOCl, pois sua inibição implicou da inibição da NADPH oxidase e, tão pouco foram capazes de inibir a atividade clorinante da MPO, decidiu-se avaliar se a

inibição da NADPH oxidase, pelos ésteres alquílicos do ácido protocatecúico, também implicaria na diminuição ou inibição da produção de peróxido de hidrogênio tanto intracelular quanto extracelular.

Para avaliar o potencial de inibição de  $H_2O_2$  extracelular, utilizou-se a medida da fluorescência resultante da oxidação do Amplex Red, a uma molécula altamente fluorescente, a resorufina. Este ensaio tem sido reportado como um método altamente específico e sensível para a detecção de peróxido de hidrogênio extracelular (ZHOU *et al.*, 1997; FORTEZA *et al.*, 2005; RINALDI *et al.*, 2007). As substâncias foram testadas tanto sobre o  $H_2O_2$  extracelular liberado por PMN quanto de PBMC ativadas com PMA. Sendo que para PBMC, HRP foi adicionada a reação.

Há muitos anos sabe-se que as espécies reativas de oxigênio podem ser detectadas tanto extra quanto intracelularmente (HAMPTON *et al.*, 1998). E isso diz respeito ao fato de que a NADPH oxidase está localizada na membrana celular. A internalização da membrana e o tráfico intracelular do fagossoma formado (contendo o complexo NADPH oxidase) resulta na geração de EROs dentro deste compartimento. Enquanto que a geração de EROs extracelular é atribuída a produção direta da NADPH oxidase da membrana celular pelo escape destes oxidantes, quando o fagossoma ainda não foi completamente selado e internalizado durante o processo de fagocitose (BABIOR, 1984; DAHLGREN, KARLSSON, 1999; RINALDI *et al.*, 2007). Rinaldi e colaboradores (2007) avaliaram a sensibilidade de ensaios para detecção de  $H_2O_2$  intra e extracelular liberado por PMN ativados com PMA ou zymozan. A capacidade destes ensaios discriminarem o conteúdo liberado intracelular do que é liberado extracelular foi avaliado utilizando superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio e, a catalase, que reduz o peróxido de hidrogênio a água. Ambas as enzimas são impermeáveis a célula, capazes de sequestrar extracelularmente as EROs liberadas, e suas propriedades tornaram possível

a identificação específica da espécie gerada. Ao final do estudo, Rinald e colaboradores (2007) concluíram que o Amplex Red é uma sonda altamente específica para detecção de peróxido de hidrogênio extracelular.

Nossos resultados mostraram que P7 foi capaz de inibir 94% do  $H_2O_2$  produzido por PMN, na sua maior concentração testada (10  $\mu M$ ). Enquanto que P0 inibiu pouco mais de 50%, porém as análises estatísticas apontaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre ambos, onde P7 mostrou ser o melhor inibidor (**Figura 27A**). Quando observamos a cinética de inibição do  $H_2O_2$  liberado no meio extracelular por PMN ativados, na presença ou na ausência das substâncias de estudo (**Figura 27B**), notou-se que P7 manteve o nível de  $H_2O_2$  tão baixo quanto aquele observado no controle negativo, onde as células não foram estimuladas e, portanto não houve produção e liberação de EROs extracelular que não fosse espontânea.

Da mesma maneira como ocorreu em células PMN, o P7 também apresentou maior capacidade de inibição em relação a P0, nos ensaios utilizando PBMC ( $p < 0,05$ ), tanto na concentração de 1  $\mu M$  quanto na concentração de 10  $\mu M$  (**Figura 28A**). Como podemos observar na **Figura 28D**, a cinética revelou que durante os 60 minutos de monitoramento, o éster alquílico P7 (10  $\mu M$ ) foi a substância mais eficaz na inibição do peróxido de hidrogênio extracelular, apesar destes resultados serem pouco inferiores àqueles apresentados em PMN.

Uma dúvida em relação a estes resultados poderia surgir pelo fato de que esta inibição pudesse representar uma possível ação sequestradora de  $H_2O_2$  e não da inibição da enzima. Mas isso pode ser explicado em observação aos resultados apresentados pelo ensaio de voltametria cíclica, realizado para avaliar a diferença entre o potencial de oxidação do ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos. O fato dos ésteres do ácido protocatecúico não apresentarem diferença significativa do potencial de oxidação em relação ao seu ácido precursor indica que tanto o ácido quanto

os ésteres deveriam apresentar os mesmos resultados no que diz respeito a uma ação “*scavenger*”, e que, portanto, se fosse o caso, o ácido protocatecúico também teria apresentado resultados de diminuição de  $H_2O_2$  no meio, assim como P7, por exemplo. Além disso, nossos resultados vêm mostrando que o aumento da hidrofobicidade resultante da esterificação do ácido protocatecúico, indicou um aumento significativo da inibição da enzima NADPH oxidase, e que não se trata de uma ação “*scavenger*” dos ésteres sobre as EROs produzidas, como provamos em vários ensaios apresentados anteriormente.

Para concluir os resultados obtidos do potencial de inibição do ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos em relação a produção de  $H_2O_2$ , decidiu-se avaliar se a inibição também era presente em relação ao mesmo oxidante liberado intracelularmente. Para isso foi utilizado o ensaio do DHR, analisado por citometria de fluxo.

Assim como Amplex Red, vários estudos já comprovaram a eficiência, a sensibilidade e a especificidade do ensaio com DHR para determinar a produção de  $H_2O_2$  produzido no meio intracelular (SMITH, WEIDEMANN, 1993; RINALDI, 2007). Smith e Weidemann (1993) demonstraram que o DHR é a sonda utilizada em citometria de fluxo mais sensível para a detecção de peróxido intracelular e determinou que essa sensibilidade permite estabelecer um intervalo de referência, que define os limites de normalidade e anormalidade de respostas oxidativas de neutrófilos, por exemplo, a diferença de respostas entre células estimuladas e as espontâneas (não estimuladas).

Para este ensaio, utilizamos dois estímulos diferentes, PMA e *Staphylococcus aureus*, os quais ativam NADPH oxidase por diferentes vias. Desta forma, também foi possível observar as diferentes respostas das substâncias (em relação ao aumento da hidrofobicidade) frente a diferentes estímulos.



As diferentes vias de estimulação celular compreendem algumas diferenças durante a sinalização, para posterior ativação da NADPH oxidase.

O PMA, conhecido por ativar neutrófilos e monócitos e induzir rapidamente o consumo de oxigênio e produção de ânion superóxido e que também é capaz de induzir uma série de reações em células fagocíticas que muito se assemelham as mudanças celulares que ocorrem após ingestão de partículas (HOIDAL *et al.*, 1998). Diferente da ativação induzida por *Staphylococcus aureus*, o segundo estímulo utilizado no ensaio de fagocitose (bactéria inativada e marcada com iodeto de propídio), que ativa NADPH oxidase através da ligação a receptores TLR2 (*Toll-like Receptor 2*) (JANN *et al.*, 2011), induzindo a fagocitose da partícula bacteriana (SMITH, WEIDEMANN, 1993; RINALDI *et al.*, 2007).

Basicamente, a ativação da NADPH oxidase por esses estímulos depende da ativação de uma proteína chamada Proteína quinase C (PKC) (BABIOR, 1999; EL-BENNA *et al.*, 2005; PANDEY, FULTON, 2011). A PKC participa da ativação, do remodelamento do citoesqueleto de actina e da degranulação. Essa proteína é composta por duas subunidades: (a) uma subunidade regulatória que apresenta os domínios C1, responsável pela ligação com diacilglicerol (DAG) e com PMA, e C2, responsável pela ligação de cálcio; (b) uma subunidade catalítica altamente conservada dentre as diferentes isoformas da PKC, que apresenta os domínios C3 e C4 responsáveis pela ligação do ATP e do substrato, respectivamente (EL-BENNA *et al.*, 2005; SANTOS, 2007). A ligação de DAG ou PMA ao domínio C1 causa o aumento significativo da afinidade de PKC pela membrana celular. A diferença entre ambos é que a ativação por DAG recruta rapidamente as proteínas citosólicas para a membrana, por apresentar meia vida curta e é, portanto, rapidamente inativado. Já o PMA, não é facilmente metabolizado, o que resulta numa ativação constitutiva de PCK (NEWTON, 2001), porém maior (SMITH, WEIDEMANN, 1993; PANDEY, FULTON, 2011).

Para que o complexo seja formado na membrana, a ativação de PCK induz a ativação de outras proteínas das vias MAPK/ERK 1/2 (*Extracellular Signal Regulated Kinases 1 e 2*) que posteriormente fosforilam as subunidades citosólicas da NADPH oxidase (p47phox, por exemplo), e ocorre então a translocação destas para a membrana (BABIOR, 1999; JANN *et al.*, 2011; PANDEY, FULTON, 2011).

Como citado anteriormente, *Staphylococcus aureus* promove a ativação celular via TRL2 (JANN *et al.*, 2011), transmitindo informação através da membrana citoplasmática via família de proteínas ligantes de GTP (Proteínas heterotriméricas G), que ativam enzimas de membrana, como as fosfolipases (C, A2 e D). Estas lideram a liberação intracelular do mensageiro, por exemplo: fosfolipase C cliva fosfatidilinositol (um lipídeo de membrana) em DAG e IP3 (trifosfatoinositol). IP3 está envolvido na liberação de cálcio intracelular e DAG ativa PKC (BABIOR, 1999; EL-BENNA *et al.*, 2005). Já o PMA, que é um mediador solúvel capaz de atravessar a membrana plasmática, age como esses mensageiros e se liga ao domínio C1, ativando diretamente PKC (EL-BENNA *et al.*, 2005; SANTOS, 2007; PANDEY, FULTON, 2011).

A possibilidade da utilização do sangue total viabilizou melhores condições para este ensaio de citometria de fluxo, devido a necessidade de pequenas quantidades de amostra e a ausência da necessidade de separação celular. Avaliou-se, primeiramente, o ácido protocatecúico e seu éster P7 em várias concentrações a fim de determinarmos uma curva concentração-resposta. As concentrações testadas foram 50, 100, 200 e 500  $\mu\text{M}$ .

Após aquisição feita no citômetro de fluxo, as análises foram realizadas no *software FlowJo*, sendo que os resultados apresentados corresponderam a porcentagem de inibição sobre o MFI (Média da Intensidade de Fluorescência) da amostra em relação ao seu controle positivo (isento das

substâncias de estudos) e a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> espontânea foi descontada. Esses resultados, portanto, corresponderam a quantidade de peróxido de hidrogênio intracelular inibido ou não pelas substâncias em relação ao total que foi produzido durante a reação.

As **Figuras 29 e 30** foram apresentadas primeiramente, a fim exibirem os *dot plots* representativos dos *gates* das populações de neutrófilos e monócitos, estimulados ou não, e isentos ou não das substâncias, para expressar os parâmetros utilizados: o tamanho (*forward scatter*, FSC) e granulosidade celular (*side scatter*, SSC). Os quadrantes direito superior e inferior correspondem a porcentagem de neutrófilos e monócitos, respectivamente, capazes de produzir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (resultados que não foram mostrados). É importante observar que quando as células foram estimuladas com *S. aureus* (**Figura 30**) existiu uma dificuldade em determinar a população de monócitos. Essa dificuldade e diferença de padrão em relação as amostras ativadas com PMA foram explicadas por Gille e colaboradores (2009) que demonstraram que os monócitos podem mudar morfológicamente em associação à fagocitose e à morte celular, e que portanto, não são mais localizados no *gate* de monócitos convencional. Isso porque a expressão de CD14 é muito reduzida após a incubação com a bactéria, o que poderia explicar uma pronunciada maturação celular, a perda do receptor por mecanismos indiretos ou ainda a apoptose, e, portanto a possibilidade da inviabilidade destas células não pode ser excluída. Essas mudanças morfológicas dizem respeito a diminuição do tamanho celular e ao aumento da granulosidade, semelhante às características morfológicas de células apoptóticas (HEIDENREICH *et al.*, 1997; KAMPALATH *et al.*, 1998; GILLE, *et al.*, 2009; FARIA, 2013). Apesar da padronização do ensaio de DHR ter sido realizada com a utilização de marcadores celulares tanto para monócitos (anti-CD14 conjugado a *Pacific Blue*, BD Biosciences; anti-HLA-DR conjugado a V500, BD Biosciences) quanto para neutrófilos (anti-CD11B conjugado a

APC-Cy7, BD Biosciences), tornou-se inviável a utilização destes posteriormente, tendo em vista a grande quantidade de ensaios realizados e a quantidade de amostras testadas. Diante desta dificuldade decidiu-se, por segurança, não avaliar a população de monócitos, quando estes foram estimulados com *S. aureus*.

Os resultados apresentados pela **Figura 31** mostraram que a porcentagem de inibição de peróxido de hidrogênio aumentou de acordo com o aumento da concentração de P0 e P7. Quando as células foram estimuladas com PMA (**Figura 31A, 31B**), P0 mostrou porcentagem irrelevante de inibição do peróxido produzido no meio intracelular, mesmo em altas concentrações, enquanto que P7 apresentou capacidade de inibição significativa em relação ao anterior ( $p < 0,05$ ). Quando neutrófilos foram estimulados com a bactéria (**Figura 31C**), P0 mostrou uma melhora na capacidade de inibição, mas ainda assim, não apresentou melhores resultados que seu éster P7. Estes resultados corroboram com aqueles apresentados pelo ensaio de Amplex Red, quando a avaliação da inibição de peróxido foi feita extracelularmente. E, portanto, a falta de capacidade de inibição de P0 comparada a P7, exclui a possibilidade de uma ação sequestradora do peróxido e mais uma vez o aumento da lipofilicidade da substância determinou a melhoria do seu potencial inibidor.

Quando o efeito inibidor de  $H_2O_2$  intracelular foi testado por P4 e P10, nas concentrações de 200  $\mu M$  e 500  $\mu M$ , também observou-se melhores resultados em relação ao ácido protocatecúico ( $p < 0,05$ ) independente do estímulo utilizado em neutrófilos (**Figuras 32 e 34**). Em monócitos (**Figura 33**), os resultados foram similares, porém a capacidade de inibição de  $H_2O_2$  intracelular pelos ésteres foi menor do que aquela apresentada por neutrófilos ativados pelo mesmo estímulo. Independente do tipo celular, os ésteres do ácido protocatecúico continuaram mostrando melhores resultados que seu precursor ácido, especialmente os ésteres P4 e P7.

Smith e Weidemann (1993) mostraram que a intensidade de fluorescência de neutrófilos em resposta ao PMA foi muito maior do que aquela apresentada por neutrófilos estimulados com zymosan (parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* que também promove ativação via TLR-2), particularmente no ensaio de DHR. Apesar dos estímulos apresentarem intensidade e duração da estimulação diferentes devido às vias distintas de ativação de NADPH oxidase de neutrófilos que cada estímulo induziu, a atividade das substâncias permaneceu semelhante para ambos. Ou seja, os ésteres continuaram apresentando melhores resultados de inibição de NADPH oxidase quando comparados ao ácido protocatecúico, na ordem de P4>P7>P10>P0 ( $p<0,05$ ).

De Almeida e colaboradores (2011) também demonstraram que a fluorapocinina apresentou melhor capacidade de inibição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular quando comparado a apocinina, em ensaio de DHR por citometria de fluxo. A fluorapocinina é um análogo da apocinina, e sua melhor atividade foi relacionada à sua maior hidrofobicidade em relação ao seu precursor. Isso corrobora com nossos resultados e mostra que a melhor atividade destas substâncias não se restringe apenas aos ésteres do ácido protocatecúico, e sim a maior hidrofobicidade que estas substâncias apresentam, facilitando seu acesso às membranas celulares.

Diante dos resultados apresentados até o presente momento, pode-se afirmar que as substâncias em estudo, em especial, os ésteres alquílicos do ácido protocatecúico são capazes de inibir a ativação de NADPH oxidase, impedindo ou diminuindo a produção de espécies reativas de oxigênio.

Sabendo que a fagocitose compreende uma das vias para ativação da NADPH oxidase e representa um papel fundamental na imunidade do hospedeiro à invasão microbiana, avaliou-se a capacidade do ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos em relação à sua interferência nesta função efetora dos neutrófilos, a fagocitose. Ao mesmo tempo em que o

ensaio de DHR nos permitiu avaliar a inibição do  $H_2O_2$  intracelular por neutrófilos ativados com *S. aureus*, também nos permitiu avaliar se nossas substâncias interferiam na fagocitose e, portanto, os mesmos parâmetros foram utilizados para determinação da população celular: o tamanho (*forward scatter*, FSC) e a granulosidade celular (*side scatter*, SSC).

A **Figura 35** nos mostra os *dot plots* representativos de um ensaio de fagocitose, onde foi possível observar que a porcentagem de células com capacidade fagocítica não foi alterada quando um éster, no caso o P4, foi adicionado à reação. O valor apresentado no quadrante superior direito corresponde à porcentagem de células com atividade efetora hábil. Nossos resultados mostraram que quando os neutrófilos foram incubados, inicialmente com P0 ou P7, e a fagocitose foi induzida pela bactéria, não houve diferença na capacidade fagocítica destas células quando comparada as células que não foram tratadas com as substâncias (controle positivo da reação). E isso foi demonstrado independente da concentração da substância utilizada, sendo que estas variaram entre 50 e 500  $\mu\text{M}$  (**Figura 36A**). Quanto aos resultados que dizem respeito a alteração da quantidade de bactérias que foram internalizadas pelos fagócitos, a frequência foi diminuída de acordo com o aumento da concentração das substâncias utilizadas (tanto de P0 quanto de P7). No entanto, essa inibição foi muito pequena, sendo que na maior concentração utilizada (500  $\mu\text{M}$ ) este valor chegou a apenas 26%. Um detalhe interessante é que não houve diferença significativa entre P0 e P7, entre qualquer concentração utilizada (**Figura 36B**).

Os mesmos resultados foram mostrados na presença de P4 e P10. Tanto na concentração de 200  $\mu\text{M}$  quanto na concentração de 500  $\mu\text{M}$  os protocatecolatos de butila e decila não foram capazes de interferir na atividade fagocítica dos neutrófilos, sendo que 100% dos fagócitos apresentaram esta atividade (**Figura 37A** e **Figura 38A**). E em relação a quantidade de bactérias que foram internalizadas durante a fagocitose, P4 e

P10 inibiram em média 20% da internalização bacteriana na concentração de 200  $\mu\text{M}$  (**Figura 37B**) e 25% na concentração de 500  $\mu\text{M}$  (**Figura 38B**), o que não representa uma alteração significativa. Em resumo, não houve diferença significativa entre o ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos tanto na porcentagem de células com atividade fagocítica hábil quanto na frequência de bactérias internalizadas neste processo. E podemos concluir de modo geral, que estas substâncias não alteram a capacidade fagocítica da célula. É importante observar, que estes resultados indicam que a lipofilicidade da substância não tem relação e tão pouco foi um fator relevante para que uma possível alteração nesta atividade dos fagócitos fosse provocada.

Resultados obtidos por Stolk e colaboradores (1994) em ensaios realizados com a apocinina, na concentração de 300  $\mu\text{M}$ , mostraram que esta substância inibiu seletivamente NADPH oxidase, mas não inibiu a capacidade fagocítica de neutrófilos. Estes resultados corroboram com aqueles apresentados no presente trabalho.

A seletividade dos ésteres do ácido protocatecúico em inibirem a atividade de NADPH oxidase, porém não induzirem alteração na atividade fagocítica de neutrófilos pode ser uma característica importante e vantajosa, já que esta é uma atividade efetora importante do sistema imune para o reconhecimento e eliminação bacteriana, no combate a infecções por este tipo de patógeno.

Assim como já foi descrito, o estado de preparação celular, ao que induz um estado de pré-estimulação da NADPH oxidase, favorece a resposta imunológica mantendo a célula pronta para que um segundo estímulo induza sua completa ativação e, determinadas citocinas, como  $\text{TNF-}\alpha$ , são mediadores desse mecanismo de ativação inicial.  $\text{TNF-}\alpha$  é a principal citocina pró-inflamatória envolvida na resposta inflamatória e é produzida por monócitos ativados e macrófagos em resposta a determinados antígenos (SHEPPARD *et al.*, 2005; EL-BENNA, DANG, GOUGEROT-POCIDALO,

2008; HURTADO-NEDELEC *et al.*, 2014). IL-10, citocina anti-inflamatória a qual também é produzida por monócitos ativados é responsável por participar do bloqueio da resposta imune através da inibição da produção de citocinas por macrófagos, e inibição da expressão de moléculas de MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de classe II e moléculas co-estimuladoras nestas células. Vários estudos têm revelado a relação entre a NADPH oxidase e essas duas citocinas (HUANG *et al.*, 2012; LONG *et al.*, 2012; BARTH *et al.*, 2012; DEWAS *et al.*, 2003; DANG *et al.*, 2006; BERGMAN *et al.*, 2010), o que gerou maior interesse pelo estudo de uma possível imunorregulação do ácido protocatecúico de seus ésteres alquílicos sobre as mesmas e, a possibilidade do aumento da hidrofobicidade das substâncias de estudo serem relevantes para este mecanismo, assim como provou ser para a inibição da enzima.

No que diz respeito às citocinas, vários estudos tem revelado estreita relação entre a ativação de NADPH oxidase e a produção/liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias (BARTH *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2012). Sabe-se que TNF- $\alpha$  é utilizada como iniciador da ativação de neutrófilos e, portanto responsável por induzir o *burst* oxidativo através da fosforilação parcial da subunidade p47phox da NADPH oxidase (DANG *et al.*, 2006; DEWAS *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2012).

A disfunção endotelial está implicada numa variedade de doenças cardiovasculares e acredita-se que exista relação entre a inflamação e a disfunção endotelial. TNF- $\alpha$  participa do mecanismo de disfunção endotelial por induzir a ativação de NADPH oxidase e aumentar a produção de ânion superóxido. A perda da biodisponibilidade de NO $^{\bullet}$  relacionada a essa citocina pró-inflamatória pode ser atribuída ao estresse oxidativo por excesso de EROs via NADPH oxidase, que pode ser diretamente ativada por TNF- $\alpha$ . Huang e colaboradores (2012) demonstraram que essa citocina prejudicou a vasodilatação do endotélio e este dano foi atenuado pela depleção de PKC ou inibição de NADPH oxidase, ou seja, a superprodução de ânion superóxido



desencadeado pela ativação da enzima dependente de PKC contribuiu para a disfunção endotelial induzida por TNF- $\alpha$ . Sugerem ainda, que p47phox é essencial na ativação de NADPH oxidase induzida por TNF- $\alpha$ , por sua expressão e fosforilação serem reguladas e moduladas pela citocina. Outros estudos também sugerem essa relação entre NADPH oxidase e TNF- $\alpha$ . O aumento da expressão de TNF- $\alpha$  associado ao diabetes contribui para a disfunção erétil por promover a geração de EROs mediadas pela NADPH oxidase (LONG *et al.*, 2012). TNF- $\alpha$  também induz estresse oxidativo em células neuronais por ativação da NADPH oxidase mediada por ceramida quinase (CerK) e ceramida-1-fosfato, metabólitos da ceramida (BARTH *et al.*, 2012).

IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que desempenha um papel importante na regulação das respostas inflamatórias. Inicialmente identificada como um fator de inibição da síntese de citocinas, a IL-10 exerce seu efeito anti-inflamatório em vários tipos celulares e regula diversas respostas funcionais de células polimorfonucleares. Além disso, inibi potencialmente a produção de citocinas pró-inflamatórias por neutrófilos em resposta a LPS, LPS + INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , e regula negativamente a produção de EROs derivadas de NADPH oxidase. Segundo Dang e colaboradores, a IL-10 inibe o *priming* induzido por GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), inibindo a produção de EROs através da inibição da fosforilação de p47phox mediada pela diminuição da atividade de ERK1/2 (CASSATELLA *et al.*, 1993; LAICHALK, DANFORTH, STANDIFORD, 1996; BUSSOLATI *et al.*, 1997; CASSATELLA, 1998; MOORE, 2001).

Vários estudos já demonstraram a inibição dessas citocinas liberadas por PBMC por antioxidantes naturais (BALIGA *et al.*, 2012; LIN, WANG, 2012; YAN *et al.*, 2004; YIN *et al.*, 2009; KANEGAE *et al.*, 2010). O ácido protocatecúico já demonstrou inibir a produção de TNF- $\alpha$  por determinados tipos celulares estimulados por LPS (MIN *et al.*, 2010) e apresentou efeito

protetor na injúria aguda pulmonar desenvolvida por camundongos, processo inflamatório caracterizado pela presença de altos níveis dessa citocina. Neste estudo, o ácido inibiu a produção de várias citocinas inflamatórias incluindo TNF- $\alpha$ , interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), e IL-6, após 6 horas de pré-tratamento do fluido de lavado broncoalveolar, após estimulação com LPS (WEI *et al.*, 2012).

Nossos ensaios de quantificação de citocinas mostraram resultados equivalentes aos apresentados por vários pesquisadores, onde o ácido protocatecúico inibiu a produção de TNF- $\alpha$  por monócitos ativados (**Figura 39A, 39B**). No entanto, os ésteres do ácido protocatecúico apresentaram resultados muito mais promissores em comparação ao seu precursor. Mostrando que sua esterificação e o consequente aumento da hidrofobicidade das substâncias também foi um fator determinante para esse efeito inibidor. Os ésteres alquílicos também apresentaram melhor inibição da produção de IL-10 quando comparado ao seu precursor (**Figura 39C e 39D**), resultado diferente do reportado por Yan e colaboradores (2004), onde o éster isopropil do ácido protocatecúico apresentou aumento de produção de IL-10 em modelos de sepse, onde a infecção já está instalada, sendo, portanto, um resultado promissor para o tratamento e prevenção nestes casos, já que o aumento de TNF- $\alpha$  é um fator determinante para a falência de órgãos durante o processo e a superprodução de IL-10 ajudaria no decréscimo da produção dessa e outras citocinas pró-inflamatórias.

Para nossas culturas, foi utilizado um modelo saudável, sendo que os doadores de sangue voluntários se apresentavam saudáveis. Para tanto, a inibição de TNF- $\alpha$  se fez importante porque demonstrou um efeito protetor dos ésteres do ácido protocatecúico no caso de ativação celular por bactérias como *Staphylococcus aureus*, o que poderia garantir o mesmo efeito protetor num caso de estresse oxidativo desencadeado pelo mesmo ou outro antígeno que utiliza a mesma via de ativação. Sendo assim, a inibição da produção

desta citocina pró-inflamatória pelas substâncias em estudo não implicaria na necessidade da superprodução de uma citocina anti-inflamatória como IL-10, que também é responsável por inibir a anterior e conseqüentemente regular negativamente a resposta inflamatória.

Assim, conclui-se que a inibição de TNF- $\alpha$  pode ser um fator importante na inibição de um processo inflamatório crônico, não somente por ser um iniciador de mediadores da cascata da inflamação, e sim porque tal citocina é também capaz de promover ativação parcial da NADPH oxidase, enzima responsável por mediar o estresse oxidativo que está envolvido na progressão de vários processos patológicos.

A inibição de IL-10 não se faz menos importante, uma vez que na ausência de um processo inflamatório não se faz necessária a produção de citocinas que o interrompa.

Apesar de o sistema imune ser especializado e altamente eficiente no combate a infecções microbianas, certos patógenos têm desenvolvido a capacidade de explorar isso em benefício próprio, o que os tornam capazes de persistirem no organismo do hospedeiro e promover infecções crônicas que podem causar sérias conseqüências como imunodeficiência, câncer e morte.

KANEGAE e colaboradores (2010), reporta que vários estudos têm apontado o papel da IL-10 e o dano na resposta anti-viral em relação a capacidade do vírus persistir no hospedeiro e, que a indução da produção da IL-10 pelo hospedeiro durante a infecção parece ser um dos meios virais de indução da supressão imune. Portanto, a inibição da produção da IL-10 pode ser um meio para combater a cronicidade de uma infecção. Seus resultados mostram que, assim como os ésteres do ácido protocatecúico, aqui estudados, a apocinina também inibiu a produção da IL-10. Esta tendência observada contradiz os efeitos característicos de outros antioxidantes clássicos, os quais promovem a manutenção dos níveis dessa citocina em

respostas inflamatórias (YANG et al., 2008; LI et al., 2009; NOVOSELOVA et al., 2009).

Estudos futuros deverão buscar o entendimento do mecanismo exato pelo qual o aumento da hidrofobicidade dos ésteres provocou a inibição do complexo NADPH oxidase e das citocinas. No entanto, podemos sugerir que a maior acessibilidade dos mesmos a membrana celular deve estar por trás desse aumento significativo de eficácia, pois como descrito, NADPH oxidase é um complexo proteico associado à membrana.



## 6. CONCLUSÕES

1. Diante dos resultados obtidos concluiu-se que a esterificação do ácido protocatecúico foi um fator decisivo para o melhoramento de seus efeitos biológicos, o que sugere que a hidrofobicidade molecular e não apenas a oxidabilidade é crucial no contexto aqui estudado.
2. A necessidade de baixas concentrações em adição a baixa citotoxicidade destas substâncias para que resultados significativos sejam alcançados as tornam fortes candidatas para seu uso medicinal, no tratamento de doenças inflamatórias crônicas.
3. A seletividade dos ésteres do ácido protocatecúico em inibirem a atividade de NADPH oxidase, porém não induzirem alteração na atividade fagocítica de neutrófilos pode ser uma característica importante e vantajosa, já que esta é uma atividade efetora importante do sistema imune para o reconhecimento e eliminação bacteriana, no combate a infecções por este tipo de patógeno.
4. A inibição da produção de TNF- $\alpha$ , uma citocina pró-inflamatória, indica o efeito imunorregulador dos ésteres do ácido protocatecúico e se faz importante por inibir um potente mediador da inflamação e ativador parcial de NADPH oxidase. A inibição de IL-10 não se faz menos importante devido a ausência da necessidade de um inibidor da inflamação quando há ausência dela.

## ***Referências Bibliográficas***

---

---

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS \*\*

ABO, A.; WEBB, M.R.; GROGAN, A.; SEGAL, A.W. Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21rac from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane. *Biochem. J.*, v. 298, n. 3, p. 585-591, 1994.

ABU-SOUD, H.M.; HAZEN, S.L. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.*, v. 275, n. 8, p. 5425-5430, 2000.

AGO, T.; KITAZONO, T.; OOBOSHI, H.; IYAMA, T.; HAN, Y.H.; TAKADA, J.; WAKISAKA, M.; IBAYASHI, S.; UTSUMI, H.; IIDA, M. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation*, v. 109, n. 2, p. 227-233, 2004.

AHMAD, A.; MONDELLO, S.; DI PAOLA, R.; MAZZON, E.; ESPOSITO, E.; CATANIA, M.A.; ITALIANO, D.; MONDELLO, P.; ALOISI, C.; CUZZOCREA, S. Protective effect of apocynin, a NADPH-oxidase inhibitor, against contrast-induced nephropathy in the diabetic rats: a comparison with n-acetylcysteine. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 674, n. 2-3, p. 397-406, 2012.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 4, n. 7, p. 499-511, 2004.

ALVES, C.M.O.S.; MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; CARVALHO, I.F.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Application of the chemiluminescence systems to evaluate the role of Fcγ and complement receptors in stimulating the oxidative burst in neutrophils. *Talanta*, v. 60 n. 2-3, p. 601-8, 2003.

ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp. Pesquisa*, v. 1, n. 1, p. 37-58, 2007.

ANTER, J.; ROMERO-JIMÉNEZ, M.; FERNÁNDEZ-BEDMAR, Z.; VILLATORO-PULIDO, M.; ANALLA, M.; ALONSO-MORAGA, A.; MUÑOZ-



- SERRANO, A. Antigenotoxicity, cytotoxicity, and apoptosis induction by apigenin, bisabolol, and protocatechuic acid. *J. Med. Food.*, v. 14, n. 3, p. 276-283, 2011.
- ANUP, R.; BALASUBRAMANIAN, K.A. Review. Surgical stress and the gastrointestinal tract. *J. Surg. Res.*, v. 92, n. 2, p. 291-300, 2000.
- BABICH, H.; SEDLETCAIA, A.; KENIGSBURG, B. In Vitro Cytotoxicity of Protocatechuic Acid to Cultured Human Cells from Oral Tissue: Involvement in Oxidative Stress. *Pharmacol. Toxicol.*, v. 91, n. 5, p. 245-253, 2002.
- BABIOR, B.M. NADPH oxidase: An Update. *Blood.*, v. 93, n. 5, p. 1464-1476, 1999.
- BABIOR, B.M. Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood.*, v. 64, n. 5, p. 959-966, 1984.
- BABIOR, B. M.; COHEN, H. J. Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.*, v. 109, n. 1, p. 3-44, 2000.
- BABIOR, B.M.; KIPNES, R.S.; CURNUTTE, J.T. Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.*, v. 52, n. 3, p. 741-744, 1973.
- BAI, Y.P.; HU, C.P.; CHEN, M.F.; XU, K.P.; TAN, G.S.; SHI, R.Z.; LI, Y.J.; ZHANG, G.G. Inhibitory effect of reinoside C on monocyte-endothelial cell adhesion induced by oxidized low-density lipoprotein via inhibiting NADPH oxidase/ROS/NF-kappaB pathway. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.*, v. 380, n. 5, p. 399-406, 2009.
- BALIGA, M.S.; JOSEPH, N.; VENKATARANGANNA, M.V.; SAXENA, A.; PONEMONE, V.; FAYAD, R. Curcumin, an active component of turmeric in the prevention and treatment of ulcerative colitis: preclinical and clinical observations. *Food Funct.*, v. 3, n. 11, p. 1109-1117, 2012.

- BANDRES, J.C.; TRIAL, J.; MUSHER, D.M.; ROSSEN, R.D. Increased phagocytosis and generation of reactive oxygen products by neutrophils and monocytes of men with stage 1 human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.*, v. 168, n. 1, p. 75-83, 1993.
- BANFI, B.; MALGRANGE, B.; KNISZ, J.; STEGER, K.; DUBOIS-DAUPHIN, M.; KRAUSE, K.H. NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J. Biol. Chem.*, v. 279, n. 44, p. 46065-46072, 2004.
- BANFI, B.; MOLNAR, G.; MATURANA, A.; STEGER, K.; HEGEDUS, B.; DEMAUREX, N.; KRAUSE, K.H. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J. Biol. Chem.*, v. 276, n. 40, p. 37594-37601, 2001.
- 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, n. 2, p. 156-65, 2004.
- BARTH, BM.; GUSTAFSON, S.J.; HANKINS, J.L.; KAISER, J.M.; HAAKENSON, J.K.; KESTER, M.; KUHN, T.B. Ceramide kinase regulates TNF $\alpha$ -stimulated NADPH oxidase activity and eicosanoid biosynthesis in neuroblastoma cells. *Cell. Signal.*, v. 24, n. 6, p. 1126-1133, 2012.
- BEDARD, K.; LARDY, B.; KRAUSE, K.H. NOX family NADPH oxidases: not just in mammals. *Biochimie.*, v. 89, n. 9, p. 1107-1112, 2007.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.*, v. 87, n. 1, p. 245-313, 2007.
- BEGUM, A.N.; TERAU, J. Protective effects of alpha-tocotrienol against free radical-induced impairment of erythrocyte deformability. *Biosc. Biotech. & Biochem.*, v. 66, n. 2, p. 398-403, 2002.

- BELAIBA, R.S.; DJORDJEVIC, T.; PETRY, A.; DIEMER, K.; BONELLO, S.; BANFI, B.; HESS, J.; POGREBNIK, A.; BICKEL, C.; GORLACH, A. NOX5 variants are functionally active in endothelial cells. *Free Radic. Biol. Medic.*, v. 42, n. 4. P. 446-459, 2007.
- BERGMAN, M.; DJALDETTI, M.; SALMAN, H.; BESSLER, H. On the combined effect of statins and lycopene on cytokine production by human peripheral blood cells. *Heart Vessels*, v. 25, n. 5, p. 426-431, 2010.
- BEUTLER, B.; HOEBE, K.; DU, X.; ULEVITCH, R.J. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J. Leukoc. Biol.*, v. 74, n. 4, p. 479-485, 2003.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr.*, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- BOKOCH, G.M.; PROSSNITZ, V. Isoprenoid metabolism is required for stimulation of the respiratory burst oxidase of HL-60 cells. *J. Clin. Invest.*, v. 89, n.2, p. 402-408, 1992.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.*, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRAR, S.S.; CORBIN, Z.; KENNEDY, T.P.; HEMENDINGER, R.; THORNTON, L.; BOMMARIUS, B.; ARNOLD, R.S.; WHORTON, A.R.; STURROCK, A.B.; HUECKSTEADT, T.P.; QUINN, M.T.; KRENITSKY, K.; ARDIE, K.G.; LAMBETH, J.D.; HOIDAL, J.R. NOX5 NAD(P)H oxidase regulates growth and apoptosis in DU 145 prostate cancer cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, v. 285, n. 2, p. C353-369 2003.
- BROWN, D.I.; GRIENGLING, K.K. Nox proteins in signal transduction. *Free Radic. Biol. Medic.*, v. 47, n. 9, p. 1239-1253, 2009.
- BUSSOLATI, B.; MARIANO, F.; MONTRUCCHIO, G.; PICCOLI, G.; CAMUSSI, G. Modulatory effect of interleukin-10 on the production of

platelet-activating factor and superoxide anions by human leukocytes. *Immunology*, v. 90, n. 3, p. 440-447, 1997.

CAMPOS, A.M.; SOTOMAYOR, C.P.; PINO, E.; LISSI, E. A pyranine based procedure for evaluation of the total antioxidant potential (TRAP) of polyphenols. A comparison with closely related methodologies. *Biol. Res.*, v. 37, n. 2, p. 287-292, 2004.

CARLOS, I.Z.; CARLI, C.B.A.; MAIA, D.C.G.; BENZATTI, F.P.; LOPES, F.C.M.; ROESE, F.M.; WATANABE, M.; MICHELETTI, A.C.; DOS SANTOS, L.C.; VILEGAS, W.; HONDA, N.K. Immunostimulatory effects of the phenolic compounds from lichens on nitric oxide and hydrogen peroxide production. *Braz. J. Pharmacog.*, v. 19, n. 4, p. 847-852, 2009.

CARMONA-CUENCA, I.; HERRERA, B.; VENTURA, J.J.; RONCERO, C.; FERNANDEZ, M.; FABREGAT, I. EGF blocks NADPH oxidase activation by TGF-beta in fetal rat hepatocytes, impairing oxidative stress, and cell death. *J. Cell. Physiol.*, v. 207, n. 2, p. 322-330, 2006.

CASTOR, L.R.; LOCATELLI, K.A.; XIMENES, V.F. Pro-oxidant activity of apocynin radical. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 48, n. 12, p. 1636-43, 2010.

CASSATELLA, M.A.; MEDA, L.; BONORA, S.; CESKA, M.; CONSTANTIN, G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.*, v. 178, n. 6, p. 2207-2211, 1993.

CASSATELLA, M.A. The neutrophil: one of the cellular targets of interleukin-10. *Int. J. Clin. Lab. Res.*, v. 28, n. 3, p. 148-161, 1998.

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, n. 1464, p. 2327-34, 2005.

- CHALAS, J.; CLAISE, C.; EDEAS, M.; MESSAOUDI, C.; VERGNES, L.; ABELLA, A.; LINDENBAUM, A. Effect of ethyl esterification of phenolic acids on low-density lipoprotein oxidation. *Biomed. Pharmacother.*, v. 55, n. 1, p. 54-60, 2001.
- CHAMULITRAT, W.; STREMMEL, W.; KAWAHARA, T.; ROKUTAN, K.; FUJII, H.; WINGLER, K.; SCHMIDT, H.H.; SCHMIDT, R. A constitutive NADPH oxidase-like system containing gp91phox homologs in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, v. 122, n. 4, p. 1000-1009, 2004.
- CHEN, C.H.; LIN, W.C.; KUO, C.N.; LU, F.J. Role of redox signaling regulation in propyl gallate-induced apoptosis of human leukemia cells. *Food. Chem. Toxicol.*, v. 49, n. 2, p. 494-501, 2011.
- CHENG, G.; CAO, Z.; XU, X.; VAN MEIR, E.G.; LAMBETH, J.D. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene*, v. 269, n. 1-2, p. 131-140, 2001.
- CHEN, K.; KIRBER, M.T.; XIAO, H.; YANG, Y.; KEANEY, J.F. JR. Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization. *J. Cell. Biol.*, v. 181, n. 7, p. 1129-1139, 2008.
- CIARLINI, P.C.; ANTONIO, D.B.A.; BARBIERE, F.; BONELLO, F.L.; FEITOSA, F.L.F. Efeito da vacina contra brucelose bovina sobre a capacidade neutrofílica de redução do NBT. *Ars. Veterinaria*, Jaboticabal, v. 21, n. 2, 251-256, 2005.
- CUCORANU, I.; CLEMPUS, R.; DIKALOVA, A.; PHELAN, P.J.; ARIYAN, S.; DIKALOV, S.; SORESCU, D. NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Circ. Res.*, v. 97, n. 9, p. 900-907, 2005.
- CUI, X.L.; BROCKMAN, D.; CAMPOS, B.; MYATT, L. Expression of NADPH oxidase isoform 1 (Nox1) in human placenta: involvement in preeclampsia. *Placenta*, v. 27, n. 4-5, p. 422-431, 2006.

- DAHLGREN, C.; KARLSSON, A. Respiratory burst in human neutrophils. *J. Immunol. Meth.* 232: 3–14, 1999.
- DANDONA, P.; ALJADA, A.; MOHANTY, P.; GHANIM, H.; HAMOUDA, W.; ASSIAN, E.; AHMAD, S. Insulin inhibits intranuclear factor kappaB and stimulates IkappaB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect? *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 86, n. 7, p. 3257-3265, 2001.
- DANDONA, P.; MOHANTY, P.; HAMOUDA, W.; GHANIM, H.; ALJADA, A.; GARG, R.; KUMAR, V. Inhibitory effect of a two day fast on reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes and plasma ortho-tyrosine and meta-tyrosine concentrations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 86, v. 6, p. 2899-2902, 2001.
- DANG, P.M.; CROSS, A.R.; BABIOR, B.M. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558 II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 98, n. 7, p 3001-3005, 2001.
- DANG, P.M.; ELBIM, C.; MARIE, J.C.; CHIANDOTTO, M.; GOUGEROT-POCIDALO, M.A.; EL-BENNA, J. Anti-inflammatory effect of interleukin-10 on human neutrophil respiratory burst involves inhibition of GM-CSF-induced p47PHOX phosphorylation through a decrease in ERK1/2 activity. *FASEB J.*, v. 20, n. 9, p. 1504-1506, 2006.
- DANG, P.M.; FONTAYNE, A.; HAKIM, J.; EL-BENNA, J.; PÉRIANIN, A. Protein kinase C zeta phosphorylates a subset of selective sites of the NADPH oxidase component p47phox and participates in formyl peptide-mediated neutrophil respiratory burst. *J. Immunol.*, v. 166, n. 2, p. 1206-1213, 2001.
- DANG, P.M.; MOREL, F.; GOUGEROT-POCIDALO, M.A.; EL-BENNA, J. Phosphorylation of the NADPH oxidase component p67(PHOX) by ERK2 and P38MAPK: selectivity of phosphorylated sites and existence of an

intramolecular regulatory domain in the tetratricopeptide-rich region. *Biochemistry*, v. 42, n. 15, p. 4520-4526, 2003.

DE ALMEIDA, A.C.; MARQUES, O.C.; ARSLANIAN, C.; CONDINO-NETO, A.; XIMENES, V.F. 4-Fluoro-2-methoxyphenol, an apocynin analog with enhanced inhibitory effect on leukocyte oxidant production and phagocytosis. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 660, n. 2-3, p. 445-53, 2011.

DE DEKEN, X.; WANG, D.; MANY, M.C.; COSTAGLIOLA, S.; LIBERT, F.; VASSART, G.; DUMONT, J.E.; MIOT, F. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J. Biol. Chem.*, v. 275, n. 30, p. 23227-23233, 2000.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DELEO, F.R.; NAUSEEF, W.M.; JESAITIS, A.J.; BURRITT, J.B, CLARK, R.A.; QUINN, M.T. A domain of p47phox that interacts with human neutrophil flavocytochrome b558. *J. Biol. Chem.*, v. 270, n. 44, p. 26246-26251, 1995.

DEWAS, C.; DANG, P.M.; GOUGEROT-POCIDALO, M.A.; EL-BENNA, J. TNF-alpha induces phosphorylation of p47(phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol.*, v. 171, n. 8, p. 4392-4398, 2003.

DIATCHUK, V.; LOTAN, O.; KOSHKIN, V.; WIKSTROEM, P.; PICK, E. Inhibition of NADPH oxidase activation by 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride and related compounds. *J. Biol. Chem.*, v. 272, n. 20, p. 13292-13301, 1997.

DIKALOV, S.I.; DIKALOVA, A.E.; BIKINEYEVA, A.T.; SCHMIDT, H.H.; HARRISON, D.G.; GRIENDLING, K.K. Distinct roles of Nox1 and Nox4 in basal and angiotensin II-stimulated superoxide and hydrogen peroxide production. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 45, n. 9, p. 1340-1351, 2008.

- DODD-O, J.M.; WELSH, L.E. SALAZAR, J.D.; WALINSKY, P.L.; PECK, E.A.; SHAKE, J.G.; CAPARRELI, D.J.; ZIEGELSTEIN, R.C. Effect of NADPH oxidase inhibition on cardiopulmonary bypass-induced lung injury. *Am. J. Physiol. Hearth Circ. Physiol.*, v. 287, n. 2, p. 927-936, 2004.
- DRUMMOND, G.R.; SELEMIDIS, S.; GRIENDLING, K.K.; SOBEY, C.G. Reviews: Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, v. 10, n. 6, p. 453-71, 2011.
- 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, n. 3, p. 199-206; 2005.
- EL-BENNA, J.; DANG, P.M.; GOUGEROT-POCIDALO, M.A. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin. Immunopathol.*, v. 30, n. 3, p. 279-89, 2008.
- EL-BENNA, J.; RUEDI, J.M.; BABIOR, B.M. Cytosolic guanine nucleotide-binding protein Rac2 operates in vivo as a component of the neutrophil respiratory burst oxidase. Transfer of Rac2 and the cytosolic oxidase components p47phox and p67phox to the submembranous actin cytoskeleton during oxidase activation. *J. Biol. Chem.*, v. 269, n. 9, p. 6729-6734, 1994.
- 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, n. 3, p. 249-52, 1974.
- EVELSON, P.A. Estrés Oxidativo y Apoptosis. In: MARRONI, N.P. et al. *Estresse oxidativo e antioxidantes*. Porto Alegre: Ultra, 2002. p. 153-162.
- FARIA, C.C.Q.G. *Avaliação da resposta imune após estimulação de monócitos via Toll-Like Receptor 2 (TLR-2) em recém-nascidos a termo e*



*pré-termo*. 2013. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto da Criança do Hospital das Clínicas FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2013.

FARIA, C.M.Q.G.; NAZARÉ, A.C.; PETRÔNIO, M.S.; PARACATU, L.C.; ZERAIK, M.L.; REGASINI, L.O.; SILVA, D.H.; DA FONSECA, L.M.; XIMENES, V.F. Protocatechuic acid alkyl esters: hydrophobicity as a determinant factor for inhibition of NADPH oxidase. *Curr. Med. Chem.*, v. 19, n. 28, p. 4885-4889, 2012.

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. *Williams Hematol.* 7th ed. McGraw-Hill, 2003. p. 224.

FENG, Q.; KUMAGAI, T.; NAKAMURA, Y.; UCHIDA, K.; OSAWA, T. Correlation of antimutagenic activity and suppression of CYP1A with the lipophilicity of alkyl gallates and other phenolic compounds. *Mutat. Res.*, v. 537, n. 1, p. 101-108, 2003.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Ass. Med. Brasil*, v. 43, n. 1, p. 61-8, 1997.

FISCHER, M.T.; SHARMA, R.; LIM, J.L.; HAIDER, L.; FRISCHER, J.M.; DREXHAGE, J.; MAHAD, D.; BRADL, M.; VAN HORSSSEN, J.; LASSMANN, H. NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain*, v. 135, n. 3, p. 886-899, 2012.

FLANNAGAN, R.S.; COSÍO, G.; GRINSTEIN, S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 7, n. 5, p. 355-66, 2009.

- FORD, D.A. Lipid oxidation by hypochlorous acid: chlorinated lipids in atherosclerosis and myocardial ischemia. *Clin. Lipidol.*, v. 5, n. 6, p. 835-852, 2010.
- FOREMAN, J.; DEMIDCHIK, V.; BOTHWELL, J.H.; MYLONA, P.; MIEDEMA, H.; TORRES, M.A.; LINSTED, P.; COSTA, S.; BROWNLEE, C.; JONES, J.D.; DAVIES, J.M.; DOLAN, L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, v. 422, n. 6930, p. 442-446, 2003.
- FORTEZA, R.; SALATHE, M.; MIOT, F.; FORTEZA, R.; CONNER, G.E. Regulated hydrogen peroxide production by Duox in human airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, v. 32, n. 5, p. 462-469, 2005.
- FRECER, V. QSAR analysis of antimicrobial and haemolytic effects of cyclic cationic antimicrobial peptides derived from protegrin-1. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 14, n. 17, p. 6065-6074, 2006.
- FREIRE, B.F.A.; QUELUZ, T.H.A.T. Neutrófilo: morfologia, cinética e funções. *J. Pneumol.* v. 21, n. 4, p. 180-184, 1995.
- FUKUMOTO, L.R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, v. 48, n. 8, p. 3597-3604, 2000.
- FURUKAWA, S.; FUJITA, T.; SHIMABUKURO, M.; IWAKI, M.; YAMADA, Y.; NAKAJIMA, Y.; NAKAYAMA, O.; MAKISHIMA, M.; MATSUDA, M.; SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.*, v. 114, n. 12, p. 1752-1761, 2004.
- GASBARRINI, A.; PASINI, P.; NARDO, B.; DE NOTARIIS, S.; SIMONCINI, M.; CAVALLARI, A.; RODA, E.; BERNARDI, M.; RODA, A. Chemiluminescent real time imaging of post-ischemic oxygen free radicals formation in livers isolated from young and old rats. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 24, n. 2, p. 211-216, 1998.

- GEISZT, M.; KOPP, J.B.; VARNAI, P.; LETO, T.L. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 97, n. 14, p. 8010-8014, 2000.
- GHOSE, A.K.; CRIPPEN, G.M. Atomic physicochemical parameters for three-dimensional-structure-directed quantitative structureactivity relationships. 2. Modeling dispersive and hydrophobic interactions. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, v. 27, n. 1, p. 21-35; 1987.
- GILLE, C.; LEIBER, A.; MUNDLE, I.; SPRING, B.; ABELE, H.; SPELLERBERG, B.; HARTMANN, H.; POETS, C.H.F.; ORLIKOWSKY, T.W. Phagocytosis and postphagocytic reaction of cord blood and adult blood monocyte after infection with green fluorescent protein-labeled *Escherichia coli* and group B *Streptococci*. *Cytometry B. Clin. Cytom.*, v. 76, n. 4, p. 271-284, 2009.
- GROEMPING, Y.; RITTINGER, K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem. J.*, v. 386, Pt. 3, p. 401-416, 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, n. 3, p. 596-605, 2006.
- GUIMARÃES, D.D.; CARVALHO, C.C.; BRAGA, V.A. Scavenging of NADPH Oxidase-derived Superoxide Anions Improves Depressed Baroreflex Sensitivity in Spontaneously Hypertensive Rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, v. 39, n. 4, p. 373-378, 2012.
- HALLIWELL, B.; GUITTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* v. 186, p. 01-85, 1990.

- HAMPTON, M.B.; KETTLE, A.J.; WINTERBOURN, C.C. Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. *Blood*, v. 92, n. 9, p. 3007-3017, 1998.
- HANSSON, M.; OLSSON, I.; NAUSEEF, W.M. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 445, n. 2, p. 214-24, 2006.
- HARPER, R.W.; XU, C.; EISERICH, J.P.; CHEN, Y.; KAO, C.Y.; THAI, P.; SETIADI, H.; WU, R. Differential regulation of dual NADPH oxidases/peroxidases, Duox1 and Duox2, by Th1 and Th2 cytokines in respiratory tract epithelium. *FEBS Lett.*, v. 579, n. 21, p. 4911-4917, 2005.
- HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. *J. Immunol. Methods.*, v. 117, n. 1, p. 53-8, 1989.
- HEIDENREICH, S.; SCHMIDT, M.; AUGUST, C.; CULLEN, P.; RADEMAEKERS, A.; PAUELS, H.G. Regulation of human monocyte apoptosis by the CD14 molecule. *J. Immunol.*, v. 159, n. 7, p. 3178-88, 1997.
- 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, n. 2, p. 211-217, 2008.
- HILENSKI, L.L.; CLEMPUS, R.E.; QUINN, M.T.; LAMBETH, J.D.; GRIENGLING, K.K. Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 24, n. 4, p. 677-683, 2004.
- HIRATA, L.L.; SATO, M.E.O.; SANTOS, C.A.M. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. *Acta. Farm. Bonaerense*, v. 23, n. 3, p. 418-24, 2004.

- HOIDAL, J.R.; REPINE, J.E; BEALL, G.D.; RASP JR., F.L.; WHITE, J.G. The effect of phorbol myristate acetate on the metabolism and ultrastructure of human alveolar macrophages. *Am. J. Pathol.*, v. 91, n. 3, p. 469-482, 1998.
- HUANG, Y.; YAN, L.; RONG, S.; HALLER, H.; KIRCH, T. TNF- $\alpha$  induces endothelial dysfunction via PKC- $\zeta$ -dependent NADPH oxidase activation. *J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.*, v. 32, n. 5, p. 642-647, 2012.
- HUTCHINSON, D.S.; CSIKASZ, R.I.; YAMAMOTO, D.L.; SHABALINA, I.G.; WIKSTRÖM, P.; WILCKE, M.; BENGTSSON, T. Diphenylene iodonium stimulates glucose uptake in skeletal muscle cells through mitochondrial complex I inhibition and activation of AMP-activated protein kinase. *Cell. Signal.*, v. 19, n. 7, p. 1610-1620, 2007.
- HURTADO-NEDELEC, M.; MAKNI-MAALEJ, K.; GOUGEROT-POCIDALO, MA.; DANG, PM.; EL-BENNA, J.; Assessment of priming of the human neutrophil respiratory burst. *Methods Mol. Biol.*, v. 1124, p. 405-412, 2014.
- IMPELLIZZERI, D.; MAZZON, E.; DI PAOLA, R.; PATERNITI, I.; BRAMANTI, P.; CUZZOCREA, S. Effect of NADPH-oxidase inhibitors in the experimental model of zymosan-induced shock in mice. *Free Radic. Res.*, v. 45, n. 7, p. 820-34, 2011.
- JANN, N.J.; SCHMALER, M.; FERRACIN, F.; LANDMANN, R. TLR2 enhances NADPH oxidase activity and killing of *Staphylococcus aureus* by PMN. *Immunol. Lett.*, v. 135, n. 1-2, p. 17-23, 2011.
- JAQUET, V.; SCAPOZZA, L.; CLARK, R A.; KRAUSE, K.H.; LAMBETH, J.D. Small-molecule NOX inhibitors: ROS generating NADPH oxidases as therapeutic targets. *Antioxid. Redox Signal.*, v. 11, n. 10, p. 2535-2552, 2009.
- JAY, D.B.; PAPA HARALAMBUS, C.A.; SEIDEL-ROGOL, B.; DIKALOVA, A.E.; LASSEGUE, B.; GRIENDLING, K.K. Nox5 mediates PDGF-induced proliferation in human aortic smooth muscle cells. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 45, n. 3, p. 329-335, 2008.

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.

KAMPALATH, B.; CLEVELAND, R.P.; KASS, L. Reduced CD4 and HLA-DR expression in neonatal monocytes. *Clin Immunol Immunopathol.*, v. 87, n. 1, p. 93-100; 1998.

KAHLES, T.; LUEDIKE, P.; ENDRES, M.; GALLA, H.J.; STEINMETZ, H.; BUSSE, R.; NEUMANN-HAEFELIN, T.; BRANDES, R.P. NADPH oxidase plays a central role in blood-brain barrier damage in experimental stroke. *Stroke*, v. 38, n. 11, p. 3000-3006, 2007.

KAMIGUTI, A.S.; SERRANDER, L.; LIN, K.; HARRIS, R.J.; CAWLEY, J.C.; ALLSUP, D.J.; SLUPSKY, J.R.; KRAUSE, K.H.; ZUZEL, M. Expression and activity of NOX5 in the circulating malignant B cells of hairy cell leukemia. *J. Immunol.*, v. 175, n. 12, p. 8424–8430. 2005.

KAMPALATH, B.; CLEVELAND, R.P.; KASS, L. Reduced CD4 and HLA-DR expression in neonatal monocytes. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 87(1):93-100, 1998.

KANEGAE, M.P.; CONDINO-NETO, A.; PEDROZA, L.A.; DE ALMEIDA, A.C.; REHDER, J.; DA FONSECA, L.M.; XIMENES, V.F. Diapocynin versus apocynin as pretranscriptional inhibitors of NADPH oxidase and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 393, n. 3, p. 551-554, 2010.

KANEGAE, M.P.; DA FONSECA, L.M.; BRUNETTI, I.L.; SILVA, S.O.; XIMENES, V.F. 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. *Biochem. Pharmacol.*, v. 74, n. 3, p. 457-64, 2007.

KAWAHARA, T.; RITSICK, D.; CHENG, G.; LAMBETH, J.D. Point mutations in the proline-rich region of p22phox are dominant inhibitors of Nox1- and Nox2-dependent reactive oxygen generation. *J. Biol. Chem.*, v. 280, n. 36, p. 31859-31869, 2005.

KEANEY, J.F.; LARSON, M.G.; VASAN, R.S.; WILSON, P.W.; LIPINSKA, I.; COREY, D.; MASSARO, J.M.; SUTHERLAND, P.; VITA, J.A.; BENJAMIN, E.J. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 23, n. 3, p. 434-439, 2003.

KLEBANOFF, S.J. Myeloperoxidase: Friend and Foe. *J. Leukoc. Biol.*, v. 77, n. 5, p. 598-625, 2005.

KLENIEWSKA, P.; PIECHOTA, A.; SKIBSKA, B.; GORACA, A. The NADPH Oxidase Family and its Inhibitors. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, v. 60, n. 4, p. 277-294, 2012.

KO, F.N.; HSIAO, G.; KUO, Y.H. Protection of oxidative hemolysis by demethyl-diisoeugenol in normal and  $\beta$ -thalassemic red blood cells. *Free Radical Biol. Med.*, v. 22, n. 1-2, p. 215-222, 1997.

KOKUBO, Y.; IWAI, N.; TAGO, N.; INAMOTO, N.; OKAYAMA, A.; YAMAWAKI, H.; NARABA, H.; TOMOIKE, H. Association analysis between hypertension and CYBA, CLCNKB, and KCNMB1 functional polymorphisms in the Japanese population: the Suita Study. *Circ. J.*, v. 69, n. 2, p. 138-142, 2005.

KUBO, I.; FUJITA, K.; NIHEI, K.; NIHEI, A. Antibacterial activity of alkylgallates against *Bacillus subtilis*. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, n. 5, p. 1072-1076, 2004.

- LAFEBER, F.P.J.G.; BEUKELMAN, J.C.; VAN DEN WORM, E.; VAN ROY L.A.M.J.; VIANEN, M.E.; VAN ROON, A.G.J.; VAN DIJK, H.; BIJLSMA, J.W.J. Apocynin, a plant-derived, cartilage - saving drug, might be useful in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, v. 38, n. 11, p. 1088-93, 1999.
- LAICHALK, L.; DANFORTH, J.M.; STANDIFORD, T.J. Interleukin-10 inhibits neutrophil phagocytic and bactericidal activity. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v. 15, n. 4, p. 181-187, 1996.
- LAPENNA, D.; CUCCUROLLO, F. Hypochlorous acid and its Pharmacological Antagonism: An update pictures. *Gen. Pharmacol.*, v. 27, n. 7, p. 1145-1147, 1996.
- LASSEGUE, B.; GRIENDLING, K.K. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 30, n. 4, p. 653-661, 2010.
- LAURINDO, F.R.M.; PEDRO, M.A.; DA LUZ, P.L. Oxygen-derived free radicals as signaling mediators in the vascular system. *Ciênc. Cul.*, v. 46, n. 4, p. 18-27, 1996.
- LEE, N.K.; CHOI, Y.G.; BAIK, J.Y.; HAN, S.Y.; JEONG, D.W.; BAE, Y.S.; KIM, N.; LEE, S.Y. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood*, v. 106, n. 3, p. 852-859, 2005.
- LENDE, A.B.; KSHIRSAGAR, A.D.; DESHPANDE, A.D.; MULEY, M.M.; PATIL, R.R.; BAFNA, P.A. Anti-inflammatory and analgesic activity of protocatechuic acid in rats and mice. *Inflammopharmacol.*, v. 19, n. 5, p. 255-263, 2011.
- 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, n. 6-7, p. 538-546, 2009.



- LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Braz. J. Pharm. Sci.*, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.
- LIN, C.Y.; HUANG, C.S.; HUANG, C.Y.; YIN, M.C. Anticoagulatory, antiinflammatory, and antioxidative effects of protocatechuic acid in diabetic mice. *J. Agric. Food Chem.*, v. 57, n. 15, p. 6661-7, 2009.
- LIN, C.; WANG, H. NADPH oxidase is involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced differentiation of human promyelocyticleukaemia HL-60 cells. *Cell. Biol. Int.*, v. 36, n. 4, p. 391-395, 2012.
- LINDENBAUM, A. Effect of ethyl esterification of phenolic acids on lowdensity lipoprotein oxidation. *Biomed. Pharmacother.*, v. 55, n. 1, p. 54-60, 2001.
- LI, Q.; HARRAZ, M.M.; ZHOU, W.; ZHANG, L.N.; DING, W.; ZHANG, Y.; EGGLESTON, T.; YEAMAN, C.; BANFI, B.; ENGELHARDT, J.F. Nox2 and Rac1 regulate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent recruitment of TRAF6 to endosomal interleukin-1 receptor complexes. *Mol. Cell. Biol.*, v. 26, n. 1, p. 140-154, 2006.
- LIU, C.L.; WANG, J.M.; CHU, C.Y.; CHENG, M.T.; TSENG, T.H. In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. *Food Chem. Toxicol.*, v. 40, n. 5, p. 635-641, 2002.
- LOCATELLI, C.; ROSSO, R.; SANTOS-SILVA, M.C.; DE SOUZA, C.A.; LICÍNIO, M.A.; LEAL, P.; BAZZO, M.L.; YUNES, R.A.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 16, n. 7, p. 3791-3799, 2008.
- LONG, T.; LIU, G.; WANG, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, Y.; QIN, D. TNF- $\alpha$ , erectile dysfunction, and NADPH oxidase-mediated ROS generation in corpus cavernosum in high-fat 6 diet/streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Sex. Med.*, v. 9, n. 7, p. 1801-1814, 2012.

- MAKRIS, D.P.; ROSSITER, J.T. Comparison of quercetin and a nonorthohydroxy flavonol as antioxidants by competing in vitro oxidation reactions. *J. Agric. Food Chem.*, v. 49, n. 7, p. 3370-3377, 2001.
- MENEGHINI, R.; MARTINS, EL. Hydrogen peroxide and DNA damage. In: HALLIWELL, B.; ARUOMA, O.I. eds. *DNA and Free Radicals*. New York: Ellis Horwood, 1993. p. 83-93.
- MIN, S.W.; RYU, S.N.; KIM, D.H. Anti-inflammatory effects of black rice, cyanidin-3-O-beta-D-glycoside, and its metabolites, cyanidin and protocatechuic acid. *Int. Immunopharmacol.*, v. 10, n. 8, p. 959-966, 2010.
- MITTAL, A.; PHILLIPS, A.R.; LOVEDAY, B.; WINDSOR, J.A. The potential role for xanthine oxidase inhibition in major intra-abdominal surgery. *World J. Surg.*, v. 32, n. 2, p. 288-95, 2008.
- MOHANTY, P.; HAMOUDA, W.; GARG, R.; ALJADA, A.; GHANIM, H.; DANDONA, P. Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 85, n. 8, p. 2970-2973, 2000.
- MONTEZANO, A.C.; TOUYZ, R.M. Molecular mechanisms of hypertension--reactive oxygen species and antioxidants: a basic science update for the clinician. *Can. J. Cardiol.*, v. 28, n. 3, p. 288-95, 2012.
- MOORE, K.W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 19, p. 683-765, 2001.
- MORAIS, M.C.; LUQMAN, S.; KONDRATYUK, T.P.; PETRONIO, M.S.; REGASINI, L.O.; SILVA, D.H.; BOLZANI, V.S.; SOARES, C.P.; PEZZUTO, J.M. Suppression of TNF- $\alpha$  induced NF $\kappa$ B activity by gallic acid and its semi-synthetic esters: possible role in cancer chemoprevention. *Nat. Prod. Res.*, v. 24, n. 18, p. 1758-1765, 2010.

- MORA-PALE, M.; KWON, S.J.; LINHARDT, R.J.; DORDICK, J.S. Trimer hydroxylated quinone derived from apocynin targets cysteine residues of p47phox preventing the activation of human vascular NADPH oxidase. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 52, n. 5, p. 962-9, 2012.
- MORENO, M.U.; JOSE, G.S.; FORTUNO, A.; BELOQUI, O.; DIEZ, J.; ZALBA, G. The C242T CYBA polymorphism of NADPH oxidase is associated with essential hypertension. *J. Hypertens.*, v. 24, n. 7, p. 1299-1306, 2006.
- MORGAN, J.F.; KLUCAS, R.V.; GRAYER, R.J.; ABIAN, J.; BECANA, M. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 22, n. 5, p. 861-870, 1997.
- MÜNZEL, T.; AFANAS'EV, I.B.; KLESCHYOV, A.L.; HARRISON, D.G. Detection of Superoxide in Vascular Tissue. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 22, n. 11, p. 1761-8, 2002.
- NAKAMURA, Y.; TORIKAI, K.; OHIGASHI, H. A catechol antioxidant protocatechuic acid potentiates inflammatory leukocyte-derived oxidative stress in mouse skin via a tyrosinase bioactivation pathway. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 30, n. 9, p. 967-978, 2001.
- NAKAMURA, Y.; TORIKAI, K.; OHTO, Y.; MURAKAMI, A.; TANAKA, T.; OHIGASHI, H. A simple phenolic antioxidant protocatechuic acid enhances tumor promotion and oxidative stress in female ICR mouse skin: dose- and timing-dependent enhancement and involvement of bioactivation by tyrosinase. *Carcinogenesis*, v. 21, n. 10, p. 1899-1907, 2000.
- NEWTON, A.C. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactor, and macromolecular interactions. *Chem. Rev.*, v. 101, n. 8, p. 2353-64, 2001.

- NICHOLS, B.A.; BAINTON, D.F.; FARQUHAR, M.G. Differentiation of monocytes. Origin, nature, and fate of their azurophil granules. *J. Cell. Biol.*, v. 50, n. 2, p. 498-515, 1971.
- NISIMOTO, Y.; MOTALEBI, S.; HAN, C.H.; LAMBETH, J.D. The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *J. Biol. Chem.*, v. 274, n. 33, p. 22999-3005, 1999.
- 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, n. 1-3, p. 234-240, 2009.
- O'DONNELL, V.B.; SMITH, G.C.; JONES, O.T. Involvement of phenyl radicals in iodonium inhibition of flavoenzymes. *Mol. Pharmacol.*, v. 46, n. 4, p. 778-785, 1994.
- O'DONNELL, B.V.; TEW, D G.; JONES, O.T.; ENGLAND, P.J. Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochem. J.*, v. 290, Pt 1, p. 41-49, 1993.
- OLIVEIRA, A.C; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S. Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes. *Quim. Nova*, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.
- PANDEY, D.; FULTON, D.J.R. Molecular regulation of NADPH oxidase 5 via the MAPK pathway. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, v. 300, n. 4, p. H1336-1344, 2011.
- PARACATU, L.C.; BONACORSI, C.; FARIA, C.M.Q.G.; NAZARE, A.C.; PETRONIO, M.S.; REGASINI, L.O.; SILVA, D.H.; RADDI, M.S.; DA FONSECA, L.M.; XIMENES, V.F. Alkyl caffeates as anti-Helicobacter pylori and scavenger of oxidants produced by neutrophils. *Med. Chem.*, v. 10, n. 1, p. 74-80, 2014.

- PARAVICINI, T.M.; TOUYZ. R.M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*, v. 31, n. 2, p. S170-180, 2008.
- PASTENE, E.; SPEISKY, H.; TRONCOSO, M.; ALARCON, J.; FIGUEROA, G. In Vitro Inhibitory Effect of Apple Peel Extract on the Growth of *Helicobacter pylori* and Respiratory Burst Induced on Human Neutrophils. *J. Agric. Food Chem.*, v. 57, n. 17, p. 7743–7749, 2009.
- PENDYALA, S.; NATARAJAN, V. Redox regulation of Nox proteins. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, v. 174, n. 3, p. 265-71, 2010.
- PETERS, E.A.; HILTERMANN, J.T.N.; STOLK, J. Effect of apocynin on ozone-induced airway hyperresponsiveness to methacholine in asthmatics. *Free Rad. Biol. and Med.*, v. 31, n. 11, p. 1442-1447; 2001.
- PETRÔNIO, M.S.; ZERAIK, M.L.; DA FONSECA, L.M.; XIMENES, V.F. Apocynin: chemical and biophysical properties of a NADPH oxidase inhibitor. *Molecules*, v. 18, n. 3, p. 2821-2839, 2013.
- 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, n. 2, p. 429-437, 1995.
- PFARR, N.; KORSCH, E.; KASPERS, S.; HERBST, A.; STACH, A.; ZIMMER, C.; POHLENZ, J. Congenital hypothyroidism caused by new mutations in the thyroid oxidase 2 (THOX2) gene. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, v. 65, n. 6, p. 810-815, 2006.
- PUKA, J.; MATTOS, H.H.R.V.; GAVRON, C.; VIANNA, S.O.; VAZ, R.S. Origem e tipos de fagócitos. *RUBS.*, v. 1, n. 1, p. 25-35, 2005.
- 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, n. 1, p. 1-20, 2006.

- RADA, B.; HABLY, C.; MECZNER, A.; TIMÁR, C.; LAKATOS, G.; ENYEDI, P.; LIGETI, E. Role of Nox2 in elimination of microorganisms. *Semin Immunopathol.*, v. 30, n. 3, p. 237-253, 2008.
- RAMOS, C.L.; POU, S.; BRITIGAN, B.E.; COHEN, M.S.; ROSEN, G.M. Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes. *J. Biol. Chem.*, v. 267, n. 1, p. 8307-12, 1992.
- REIS, B.; MARTINS, M.; BARRETO, B.; MILHAZES, N.; GARRIDO, E.M.; SILVA, P.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Structure-property-activity relationship of phenolic acids and derivatives. Protocatechuic acid alkyl esters. *J. Agric. Food Chem.*, v. 58, n. 11, p. 6986-6993, 2010.
- 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, n. 5, p. 408-414, 2001.
- RICHARDSON, M.P.; AYLIFFE, M.J.; HELBERT, M.; DAVIES, E.G. A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *J. Immunol. Methods.*, v. 219, n. 1-2, p. 187-93, 1998.
- RINALDI, M.; MORONI, P.; PAAPE, M.J.; BANNERMAN, D.D. Evaluation of assays for the measurement of bovine neutrophil reactive oxygen species. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 115, n. 1-2, p. 107-125, 2007.
- RIS-STALPERS, C. Physiology and pathophysiology of the DUOXes. *Antioxid. Redox Signal.*, v. 8, n. 9-10, p. 1563–1572, 2006.
- ROMAN, R.M.; WENDLAND, A.E.; POLANCZYK, C.A. Myeloperoxidase and Coronary Arterial Disease: From Research to Clinical Practice. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 91, n. 1, p. 12-19, 2007.

- ROMERO-JIMÉNEZ, M.; CAMPOS-SÁNCHEZ, J.; ANALLA, M.; MUNÓZ-SERRANO, A.; ALONSO-MORAGA, A. Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. *Mutat. Res.*, v. 585, n. 1-2, p. 147-155, 2005.
- ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In: VIGO-PELFREY C: *Membrane lipid oxidation*. 1th ed. Boca Raton: CRC Press., 1991. v. 54, p. 151-170.
- 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.*, v. 63, n. 2, p. 323-330, 2004.
- SAITO, S.; KAWABATA, J. DPPH (=2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) Radical-Scavenging Reaction of Protocatechuic Acid (=3,4-Dihydroxybenzoic Acid): Difference in Reactivity between Acids and Their Esters. *Helv. Chim. Acta.*, v. 89, n. 7, p. 1395-1407, 2006.
- SANTOS, K.C. *Análise proteômica comparativa entre neutrófilos não ativados e neutrófilos ativados com PMA, um análogo do diacilglicerol*. 2007. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília. 2007.
- SATO, Y.; KAMO, S.; TAKAHASHI, T.; SUZUKI, Y. Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes: hemolysis by water-solution radical initiator. *Biochemistry*, v. 34, n. 28, p. 8940-8949, 1995.
- SCHMITZ, W.O.; SIMÃO, A.N.C.; CECCHINI, R.; SARIDAKIS, H.O. Estresse oxidativo em eritrócitos: efeito antioxidante e antihemolítico do chá verde (*Camellia sinensis*). *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, Umuarama, v. 12, n. 3, p. 175-179, 2008.

SELEMIDIS, S.; SOBEY, C.G.; WINGLER, K.; SCHMIDT, H.H.; DRUMMOND, G.R. NADPH oxidases in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. *Pharmacol. Ther.* v. 120, n. 3, p. 254-291, 2008.

SILVA, S.O. *Oxidação de melatonina catalisada por mieloperoxidase em neutrófilos ativados*. 2001. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2001

SIMÃO, A. N. C. et al. Genistein abrogates prehemolytic and oxidative stress damage inuced by 2,2'-Azobis (Amidinopropane). *Life Scienc.*, v. 78, n. 11, p. 1202-1210, 2006.

SIMONYI, A.; HE, Y.; SHENG, W.; SUN, A.Y.; WOOD, W.G.; WEISMAN, G.A.; SUN, G.Y. Targeting NADPH oxidase and phospholipases A2 in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.*, v. 41, n. 2-3, p. 73-86; 2010.

SIMONYI, A.; SERFOZO, P.; LEHMIDI, T.M.; CUI, J.; GU, Z.; LUBAHN, D.B.; SUN, A.Y.; SUN, G.Y. The neuroprotective effects of apocynin. *Front Biosci (Elite Ed)*, v. 4, p. 2183-2193, 2012.

SHALEKOFF, S.; TIEMESSEN, C.T.; GRAY, C.M.; MARTIN, D.J. Depressed phagocytosis and oxidative burst in polymorfonuclear leukocytes from individuals with pulmonary tuberculosis with or without human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v. 5, n. 1, p. 41-44, 1998.

SHARMA, P.; MONGAN, P.D. Ascorbate reduces superoxide production and improves mitochondrial respiratory chain function in human fibroblasts with electron transport chain deficiencies. *Mitochondrion*, v. 1, n. 2, p. 191-198, 2001.

SHEPPARD, F.R.; KELHER, M.R.; MOORE, E.E.; MCLAUGHLIN, N.J.; BANERJEE, A.; SILLIMAN, C.C. Structural organization of the neutrophil



NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J. Leukoc. Biol.*, v. 78, n. 5, p. 1025-1042, 2005.

SHI, G.F.; AN, L.J.; JIANG, B.; GUAN, S.; BAO, Y.M. Alpinia protocatechuic acid protects against oxidative damage in vitro and reduces oxidative stress in vivo. *Neurosc. Lett.*, v. 403, n. 3, p. 206-210, 2006.

SHI, J.; ROSS, C.R.; LETO, T.L.; BLECHA, F. PR-39, a proline-rich antibacterial peptide that inhibits phagocyte NADPH oxidase activity by binding to Src homology 3 domains of p47phox. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 93, n. 12, p. 6014-6018, 1996.

SMITH, J.A.; WEIDEMANN, M.J. Short communication. Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry. *J. Immunol. Methods.*, v. 162, n. 2, p. 261-268, 1993.

STAREK, A.; SZABLA, J.; KIEC-KONONOWICZ, K.; SZYMCZAK, W. Comparison of the in vitro hemolytic effects produced by alkoxyacetic acids on human and rat erythrocytes. *Int J Occup Med Environ Health.*, v. 21, n. 2, p. 147-155, 2008.

STEFANSKA, J.; SARNIAK, A.; WLODARCZYK, A.; SOKOLOWSKA, M.; PNIEWSKA, E.; DONIEC, Z.; NOWAK, D.; PAWLICZAK, R. Apocynin reduces reactive oxygen species concentrations in exhaled breath condensate in asthmatics. *Exp. Lung Res.*, v. 38, n. 2, p. 90-99, 2012.

STEFANSKA, J.; PAWLICZAK, R. Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators of Inflamm.*, v. 2008, p. 1-10, 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 methoxysubstituted catechol. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, v. 11, n. 1, p. 95-102, 1994.

- STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.*, 2001.
- STUEHR, D.J.; FASEHUN, O.A.; KWON, N.S.; GROSS, S.S.; GONZALEZ, J.A.; LEVI, R.; NATHAN, C.F. Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleiodonium and its analogs. *FASEB J.*, v. 5, n. 1, p. 98-103, 1991.
- TAKAC, I.; SCHRÖDER, K.; ZHANG, L.; LARDY, B.; ANILKUMAR, N.; LAMBETH, J.D.; SHAH, A.M.; MOREL, F.; BRANDES, R.P. The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4. *J. Biol. Chem.*, v. 286, n. 15, p. 13304-13313, 2011.
- TAN, A.S.; BERRIDGE, M.V. Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: a simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents. *J. Immunol. Methods.*, v. 238, n. 1-2, 59-68, 2000.
- TOPIC, B.; TANI, E.; TSIAKITZIS, K.; KOUROUNAKIS, P.N.; DERE, E.; HASENÖHRL, R.U.; HACKER, R.; MATTERN, C.M.; HUSTON, J.P. Enhanced maze performance and reduced oxidative stress by combined extracts of zingiberofficinale and ginkgo biloba in the aged rat. *Neurobiol. Aging.*, v. 23, n. 1, p. 135-143, 2002.
- UEDA, J.I.; SAITO, N.; SHIMAZU, Y.; OZAWA, T. A comparison of scavenging abilities of antioxidants against hydroxyl radicals. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 333, n. 2, p. 377-384, 1996.
- 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. 3, n. 1, p. 44-84, 2007.
- VALLET, P.; CHARNAY, Y.; STEGER, K.; OGIER-DENIS, E.; KOVARI, E.; HERRMANN, F.; MICHEL, J.P.; SZANTO, I. Neuronal expression of the

- NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia. *Neuroscience*, v. 132, n. 2, p. 233-238, 2005.
- VASSELON, T.; DETMERS, P.A. Toll receptors: a central element in innate immune responses. *Infect. Immun.*, v. 70, n. 3, p. 1033-1041, 2002.
- VON ANDRIAN, U.H.; MACKAY, C.R. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N. Engl. J. Med.*, v. 343, n. 14, p. 1020-1034, 2000.
- WASSMANN, S.; LAUFS, U.; MÜLLER, K.; KONKOL, C.; AHLBORY, K.; BÄUMER, A.T.; LINZ, W.; BÖHM, M.; NICKENIG, G. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 22, n. 2, p. 300-305, 2002.
- WEI, M.; CHU, X.; JIANG, L.; YANG, X.; CAI, Q.; ZHENG, C.; CI, X.; GUAN, M.; LIU, J.; DENG, X. Protocatechuic acid attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Inflammation*, v. 35, n. 3, p. 1169-1178, 2012.
- WEISS, S.J. Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.*, v. 320, n. 6, p. 365-376, 1989.
- WICKENS, A.P. Ageing and the free radical theory. *Respir. Physiol.*, v. 128, n. 3, p. 379-391, 2001.
- WHITE-OWEN, C.; ALEXANDER, J.W.; SRAMKOSKY, R.M.; BABCOCK, G.F. Rapid wholeblood microassay using flow cytometry for measuring neutrophil phagocytosis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 30, n. 8, p. 2071-2076, 1992.
- WITKO-SARSAT, V.; RIEU, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; LESAVRE, P.; HALBWACHS-MECARELLI, L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Invest.*, v. 80, n. 5, p. 617-653, 2000.
- 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, n. 48, p. 7353-7360, 2008.

- YANG, S.; MADYASTHA, P.; BINGEL, S.; RIES, W.; KEY, L. A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts. *J. Biol. Chem.* v. 276, n. 8, p. 5452-5458, 2001.
- YAN, J.J.; JUNG, J.S.; HONG, Y.J.; MOON, Y.S.; SUH, H.W.; KIM, Y.H.; YUN-CHOI, H.S.; SONG, D.K. Protective effect of protocatechuic acid isopropyl ester against murine models of sepsis: inhibition of TNF-alpha and nitric oxide production and augmentation of IL-10. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 27, n. 12, p. 2024-2027, 2004.
- YIN, M.C.; LIN, C.C.; WU, H.C.; TSAO, S.M.; HSU, C.K. Apoptotic effects of protocatechuic acid in human breast, lung, liver, cervix, and prostate cancer cells: potential mechanisms of action. *J. Agric. Food Chem.*, v. 57, n. 14, p. 6468-73. 2009.
- YOU, B.R.; PARK, W.H. The enhancement of propyl gallate-induced apoptosis in HeLa cells by a proteasome inhibitor MG132. *Oncol. Rep.*, v. 25, n. 3, p. 871-877, 2011.
- XIMENES, V.F.; LOPES, M.G.; PETRÔNIO, M.S.; REGASINI, M.O.; SILVA, D.H.S.; DA FONSECA, L.M. Inhibitory Effect of Gallic Acid and Its Esters on 2,20-Azobis (2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH)-Induced Hemolysis and Depletion of Intracellular Glutathione in Erythrocytes. *J. Agric. Food Chem.*, v. 58, n. 10, p. 5355-5362, 2010.
- XIMENES, V.F.; MAGHZAL, G.J.; TURNER, R.; KATO, Y.; WINTERBOURN, C.C.; KETTLE, A.J. Serotonin as a physiological substrate for myeloperoxidase and its superoxide-dependent oxidation to cytotoxic tryptamine-4,5-dione. *Biochem J.*, v. 425, n. 1, p. 285-293, 2009.
- ZALBA, G.; SAN JOSE, G.; MORENO, M.U.; FORTUNO, A.; DIEZ, J. NADPH oxidase-mediated oxidative stress: genetic studies of the p22(phox) gene in hypertension. *Antioxid. Redox Signal.*, v. 7, n. 9-10, p. 1327-1336, 2005.

ZERAIK, M.L.; XIMENES, V.F.; REGASINI, L.O.; DUTRA, L.A.; SILVA, D.H.; FONSECA, L.M.; COELHO, D.; MACHADO, S.A.; BOLZANI, V.S. 4'-Aminochalcones as novel inhibitors of the chlorinating activity of myeloperoxidase. *Curr. Med. Chem.*, v. 19, n. 31, p. 5405-13, 2012.

ZHANG, X.; SHAN, P.; JIANG, G.; COHN, L.; LEE, P.J. Toll-like receptor 4 deficiency causes pulmonary emphysema. *J. Clin. Invest.*, v. 116, n. 11, p. 3050–3059, 2006.

ZHOU, M.; DIWU, Z.; PANCHUK-VOLOSHINA, N.; HAUGLAND, R.P. A stable non-fluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal. Biochem.*, v. 253, n. 2, p. 162-168, 1997.

\*\* A tese segue as normas da ABNT.

## **CAPÍTULO 2**

# Protocatechuic Acid Alkyl Esters: Hydrophobicity As a Determinant Factor for Inhibition of NADPH Oxidase

C.M.Q.G. de Faria<sup>1,2</sup>, A.C. Nazaré<sup>2</sup>, M.S. Petrónio<sup>1,2</sup>, L.C. Paracatu<sup>2</sup>, M.L. Zeraik<sup>3</sup>, L.O. Regasini<sup>3</sup>, D.H.S. Silva<sup>3</sup>, L.M. da Fonseca<sup>2</sup> and V.F. Ximenes<sup>\*,1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Sciences, São Paulo State University (UNESP), P. O. Box 473, 17033-360, Bauru, São Paulo, Brazil; <sup>2</sup>Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), P. O. Box 502, 14801-902, Araraquara, São Paulo, Brazil; <sup>3</sup>Department of Organic Chemistry, Nuclei of Bioassays, Ecophysiology and Biosynthesis of Natural Products (NuBBE), Institute of Chemistry, São Paulo State University (UNESP), P. O. Box 355, 14800-900, Araraquara, São Paulo, Brazil

**Abstract:** This study presents the increased efficiency of NADPH oxidase inhibition produced by esterification of protocatechuic acid (P0). Alkyl esters bearing chain lengths of 4 (P4), 7 (P7) and 10 (P10) carbons were synthesized and their oxidation potential, hydrophobicity, antiradical activity, inhibition of superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), and the abilities to affect hypochlorous acid (HOCl) production by leukocytes and inhibit myeloperoxidase (MPO) chlorinating activity were studied. The increased hydrophobicity (logP, 0.81-4.82) of the esters was not correlated with a significant alteration in their oxidation potential (0.222-0.298 V). However, except for P10, the esters were ~2-fold more effective than the acid precursor for the scavenging of DPPH and peroxy radicals. The esters were strong inhibitors of  $O_2^{\cdot-}$  released by activated neutrophils (PMNs) and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). A correlation was found between the carbon chain length and the relative inhibitory potency. P7, the most active ester, was ~10-fold more efficient as NADPH oxidase inhibitor than apocynin. The esters strongly inhibited the release of HOCl by PMNs, which was a consequence of the inhibition of NADPH oxidase activity in these cells. In conclusion, as effective inhibitors of NADPH oxidase, the esters of protocatechuic acid are promising drugs for treatment of chronic inflammatory diseases. Moreover, this is the first demonstration that, besides the redox active moiety, the hydrophobicity can also be a determinant factor for the design of NADPH oxidase inhibitors.

**Keywords:** Hypochlorous acid, hydrogen peroxide, myeloperoxidase, NADPH oxidase, oxidative burst, neutrophils, peripheral blood mononuclear cells, protocatechuic acid, protocatechuic acid alkyl esters, superoxide anion.

## INTRODUCTION

Evidence has been accumulating that the hydrophobicity, besides the redox properties of phenolic acids, can be a decisive factor regarding their anti-inflammatory activity, cytotoxicity for tumor cells, antimutagenicity, antifungal and antibacterial effects. For instance, ethyl esters of caffeic, sinapic, and ferulic acids are more potent inhibitors of copper-induced low-density lipoprotein oxidation than their respective acid precursors [1]. The toxicity of phenolic compounds such as caffeic and gallic acids and their ester derivatives against human promyelocytic leukemia is associated with both their pro-oxidant and lipophilicity properties [2]. Methyl, ethyl, propyl, lauryl, and cetyl gallates show antimutagenicity activity against activated 2-aminoanthracene (2AA)-induced SOS responses in *Salmonella typhimurium*, and the effect is dependent on alkyl chain length [3]. The antibacterial activity of alkyl gallates against *Bacillus subtilis* was demonstrated as a parabolic function of their lipophilicity and was maximum with alkyl chain lengths between C8 and C11 [4]. Gallates are more effective than their acid precursors as inhibitors of TNF- $\alpha$ -induced NF $\kappa$ B activation in human embryonic kidney cells [5], and as inhibitors of hemolysis of erythrocytes [6].

NADPH oxidases comprise a family of multi-subunit enzyme complexes which catalyze the reduction of molecular oxygen to superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ) [7, 8]. As a primary source of reactive oxygen species (ROS), the involvement of NADPH oxidase in the development and progression of a myriad of vascular, inflammatory, and degenerative diseases is well-established. Some recent evidence includes the involvement of NADPH oxidase and its downstream oxidative signaling pathways in the toxic effects elicited by amyloid-beta in Alzheimer's disease [9]. The effect of rotenone, a pesticide that reproduces Parkinsonism in rodents, is associated with the activation of gp91(phox), which is the membrane component of NADPH oxidase [10], the involvement of oxidative

burst in activated microglia and macrophages in demyelination, and free radical-mediated tissue injury in the pathogenesis of multiple sclerosis [11]. The differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 is mediated by NADPH oxidase [12]. The induction of NADPH oxidase in response to cardiovascular risk factors and inflammatory mediators contributes to the development of endothelial dysfunction and vascular diseases [13].

For these reasons, specific and potent inhibitors of NADPH oxidase are potential therapeutic agents for the treatment chronic inflammatory disease [14]. Regarding phytochemical compounds, apocynin, a substituted methoxy-catechol, despite some controversy about its selectivity and potency [15, 16], is the most used NADPH oxidase inhibitor for *in vitro* and *in vivo* experimental models. Some recent applications include: the beneficial effect of nebulized apocynin as an effective and safe drug for treatment of bronchial asthma [17]; the neuroprotective effects of apocynin in the prevention and treatment of neurodegenerative diseases [18]; the depressed baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats being restored by apocynin administration [19]; the attenuation of iomeprol-induced nephropathy in diabetic rats by apocynin [20]; the application of apocynin in the treatment of inflammation associated with spinal cord trauma [21].

Protocatechuic acid (3,4-dihydroxybenzoic acid) is a natural phenolic compound found in many edible and medicinal plants. Besides antiradical activity, protocatechuic acid has analgesic and anti-inflammatory properties which are comparable with those of standard drugs [22]. Following the well-established tendency of alkylation as a way of improving the pharmacological effects of phenolic acids, we synthesized and studied the esters of protocatechuic acid. The results confirmed our hypothesis, because increasing hydrophobicity resulted in the increased inhibition of NADPH oxidase in leukocytes.

## MATERIALS AND METHODS

### 1. Chemicals

Protocatechuic acid, ethyl protocatechuate, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH), 5-fluorotryptamine, 8-

\*Address correspondence to this author at the Department of Chemistry, Faculty of Science, São Paulo State University (UNESP), P. O. Box 473, 17033-360, Bauru, São Paulo, Brazil; Tel: +55 14 3301-6088; E-mail: [vfximenes@fc.unesp.br](mailto:vfximenes@fc.unesp.br)

hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt (pyranine), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), zymosan, 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (TMB), lucigenin, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), taurine, *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide, dimethyl sulfoxide (DMSO), Histopaque®-1077, and Histopaque®-1119 were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The agent 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt (WST-1) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Myeloperoxidase (MPO) (EC 1.11.1.7) was purchased from Planta Natural Products (Vienna, Austria) and its concentration was determined from its absorption at 430 nm ( $\epsilon_{430} = 89,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) was prepared by diluting a 30% stock solution and calculating its concentration from its absorption at 240 nm ( $\epsilon_{240} = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). All reagents used for buffers and mobile phases were of analytical grade. Stock solutions of antioxidants for cellular and enzymatic studies were prepared in DMSO, and in ethanol for electrochemical studies. Ultrapure Milli-Q water from Millipore (Belford, MA, USA) was used for the preparation of buffers and solutions. PMA solution was prepared in DMSO at a concentration of 16.0  $\mu\text{M}$ . TMB solution was prepared by dissolving 14 mM TMB and 100  $\mu\text{M}$  potassium iodide in 50% dimethylformamide and 50% acetic acid (800 mM) (v/v). A working suspension of human serum opsonized zymosan was prepared as previously described [23] at a final concentration of 10 mg/mL.

## 2. Synthesis of Butyl, Heptyl and Decyl Protocatechuates

The esters of protocatechuic acid were prepared using standard esterification reactions. A 3 mL solution of *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 1.0 mmol) in *p*-dioxane was added to a cooled (5°C) solution of 0.2 mmol protocatechuic acid and 20 mmol of butyl, heptyl, or decyl alcohols in 6 mL *p*-dioxane. The solution was stirred for 48 hours and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was partitioned 3 times with ethyl acetate and filtered. The filtrate was washed successively with saturated aqueous citric acid solution (3 times), saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$  (3 times), water (2 times), dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , and evaporated under reduced pressure. The crude products were purified over a silica gel column (0.06–0.20 mm, ACROS Organics, USA) and eluted isocratically with  $\text{CHCl}_3$ – $\text{CH}_3\text{OH}$  (98:2). All compounds were identified using  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectral data obtained from a Varian DRX-500 spectrometer (11.7 T). Chemical shifts ( $\delta$ ) were expressed in ppm. Coupling constants (*J*) were expressed in Hz, and splitting patterns are described as follows: s = singlet; d = doublet; dd = doublet of doublets; t = triplet; q = quintuplet; s = sextet; m = multiplet, and dd = doublet of doublets.

### Butyl Protocatechuate

White solid.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  9.68 (s; 4-OH), 9.28 (s; 3-OH), 7.34 (d; *J* = 2.0 Hz, H-2'), 7.29 (dd; *J* = 2.0, 8.0 Hz, H-6), 6.78 (d; *J* = 8.5 Hz, H-5), 4.16 (t; *J* = 7.0 Hz, H-1'), 1.62 (q; *J* = 7.0 Hz, H-2'), 1.38 (s; *J* = 7.5 Hz; H-3'), 0.90 (t; *J* = 7.5 Hz; H-4').  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  165.6 (C-7), 150.3 (C-4), 145.0 (C-3), 121.6 (C-6), 120.7 (C-1), 116.2 (C-2), 115.2 (C-5), 63.6 (C-1'), 30.3 (C-2'), 18.7 (C-3') 13.5 (C-4').

### Heptyl Protocatechuate

White solid.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  -OH), 7.33 (d; *J* = 2.0 Hz, H-2'), 7.29 (dd; *J* = 2.0, 8.5 Hz, H-6), 6.78 (d; *J* = 8.5 Hz, H-5), 4.15 (t; *J* = 6.5 Hz, H-1'), 1.63 (q; *J* = 6.5 Hz, H-2'), 1.29 (m; H-3'–H-6'), 0.83 (t; *J* = 7.0 Hz; H-7').  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  165.7 (C-7), 150.4 (C-4), 145.0 (C-3), 121.7 (C-6), 120.7 (C-1), 116.2 (C-2), 115.2 (C-5), 63.9 (C-1'), 31.1 (C-2'), 22.0–28.3 (C-3'–C-6'), 13.8 (C-7').

### Decyl Protocatechuate

White solid.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  -OH), 7.33 (d; *J* = 2.0 Hz, H-2'), 7.28 (dd; *J* = 2.0, 8.0 Hz, H-6), 6.78 (d; *J* = 8.0 Hz,

H-5), 4.14 (t; *J* = 6.5 Hz, H-1'), 1.63 (q; *J* = 6.5 Hz, H-2'), 1.26 (m; H-3'–H-9'), 0.82 (t; *J* = 7.5 Hz; H-7').  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  165.6 (C-7), 150.3 (C-4), 145.0 (C-3), 121.6 (C-6), 120.7 (C-1), 116.2 (C-2), 115.2 (C-5), 63.9 (C-1'), 31.2 (C-2'), 22.0–28.8 (C-3'–C-9'), 13.8 (C-10').

## 3. Estimation of Logarithm of Partition Coefficient (log P)

The molecular hydrophobicity of protocatechuic acid and its alkyl esters were calculated based on their log P values (partitioning coefficient in n-octanol/water) based on Crippen's fragmentation method and performed using ChemDraw software (ChemDraw Ultra 7.0.1, CambridgeSoft) [24].

## 4. Cyclic Voltammetry Measurements

Voltammetric studies were performed and the redox potentials were obtained using an Autolab PGSTAT 30 potentiostat/galvanostat (Eco-Chemie, Utrecht, Netherlands). Voltammetric curves were recorded at room temperature using a 3-electrode setup cell. The working electrode was a glassy carbon disk electrode (GC electrode, 3 mm diameter). The counter electrode was a platinum plate and the reference an Ag/AgCl saturated KCl at 3 M electrode. The working electrode surface was carefully polished with 0.5  $\mu\text{m}$  alumina slurries before each experiment and thoroughly rinsed with distilled water. A solution of sodium phosphate buffer 0.2 M (pH = 7) was used as a supporting electrolyte. The solutions were purged with nitrogen for 5 min before recording the voltammograms. The ethanolic solutions (5 mM) of the compounds were diluted in the electrochemical cell at final concentrations of 0.1 mM using the supporting electrolyte solution. The cyclic voltammograms were recorded at a potential scan rate of 5  $\text{mV s}^{-1}$ .

## 5. Antioxidant Activity: DPPH Scavenging Assay

The relative antiradical potency of the protocatechuic acid and its esters were compared by characterizing their capacity to reduce 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) [25]. The tested compounds were incubated for 30 min with 100  $\mu\text{M}$  DPPH in methyl alcohol in the dark. The scavenger activity was evaluated spectrophotometrically at 517 nm, using the absorbance of unreacted DPPH radical as a control. The scavenger activity was calculated as: [(Absorbance of control – absorbance of sample)/(absorbance of control)] $\times 100$ .

## 6. Antioxidant Activity: Peroxyl Radical Scavenging Assay

These studies were performed as previously described with minor modifications [26]. The fluorescent compound pyranine (5  $\mu\text{M}$ ) was incubated with 20 mM AAPH in PBS at 37°C in the absence (control) or presence of the tested compounds in the wells of a microplate for 3 hours. The fluorescence bleaching of the pyranine was monitored at  $\lambda_{\text{ex}}$  460 nm and  $\lambda_{\text{em}}$  510 nm in a Spectramax M2 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The final reaction volume was 300  $\mu\text{L}$ . The lag phase (induction time) obtained when the antioxidants were present was measured for various concentrations of each compound. The slopes of the curves of lag phase versus concentration were used to measure the relative reactivity of the tested compounds with AAPH-derived peroxyl radicals.

## 7. Isolation of Human Neutrophils and Peripheral Blood Mononuclear Cells

Blood samples were obtained from healthy volunteers. Experiments were performed in accordance with regulations of the Research Ethics Committee, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Unesp, São Paulo, Brazil). Polymorphonuclear (PMN) and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by centrifuga-



tion on a Histopaque<sup>®</sup>-1077/1119 gradient at 700 x g for 30 min at room temperature. After isolation, the cells were resuspended in 10 mM phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) supplemented with 1 mM calcium chloride, 0.5 mM magnesium chloride, and 1 mg/mL glucose (supplemented PBS) [27]. The cells were studied for cytotoxic effects of the tested substances using the trypan blue exclusion assay as previously described [28]. At the higher concentration used here (10  $\mu$ M) the viability of the cells was > 98%.

### 8. Superoxide Anion Radical Production by Activated Leukocytes: Lucigenin-Dependent Chemiluminescence Assay

PMN and PBMC (1 x 10<sup>6</sup> cells/mL) were pre-incubated at 37°C in supplemented PBS with protocatechuic acid or its esters for 10 min. Next, lucigenin (10.0  $\mu$ M) and opsonized zymosan (1.0 mg/mL) were added and the light emission was measured for 30 min at 37°C using a plate luminometer (Centro Microplate Luminometer LB960, Berthold Technologies, Oak Ridge, TN, USA). The final assay volume was 250  $\mu$ L. The integrated light emission was used as an analytical parameter for superoxide anion radicals produced by the stimulated cells. The inhibitory potency was calculated using the light emission generated by the control, in which the zymosan-activated cells were incubated in the absence of the tested compounds, as a reference [29].

### 9. Superoxide Anion Radical Production by Activated Neutrophils: WST-1 Assay

Assays were performed as previously described with minor modifications [30]. PMNs (1.0 x 10<sup>6</sup> cells/mL) were pre-incubated at 37°C in supplemented PBS with the test compounds for 10 min. Next, WST-1 (500  $\mu$ M) and PMA (100 nM) were added and the reduction of WST-1 was measured spectrophotometrically at 450 nm for 30 min at 37°C using a plate reader (SpectraMax M2, Molecular Devices). The inhibitory potency was calculated using the absorbance of the control, in which the PMA-activated cells were incubated in the absence of the tested compounds, as a reference.

### 10. Superoxide Anion Radical Production by Xanthine/Xanthine Oxidase: WST-1 Assay

The tested compounds (10  $\mu$ M) were incubated at 37°C in PBS with 500  $\mu$ M WST-1 and 100  $\mu$ M xanthine. The reactions were initiated by addition of 0.05 unit/mL xanthine oxidase and the reduction of WST-1 was measured spectrophotometrically at 450 nm for 15 min at 37°C using a plate reader (SpectraMax M2, Molecular Devices).

### 11. Neutrophil Morphology Assay

PMNs (1 x 10<sup>6</sup> cells/mL) were pre-incubated at 37°C in supplemented PBS with the test compounds for 10 min. Next, the cells were activated by 100  $\mu$ M PMA and incubated for 30 min at 37°C. The suspension of cells was centrifuged at 80 x g for 50 s at room temperature onto glass slides (Cytospin, FANEM, SP, Brazil). The cells were fixed in ethanol and stained with May Grounwald Giemsa. The morphological changes provoked by activation of NADPH oxidase and the protective effects of the tested compounds were evaluated by observing vacuolization in the cytoplasm and nuclear disruption of the cells.

### 12. Hypochlorous Acid Production: MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Measurement of HOCl production by MPO-catalyzed oxidation of chlorine was based on the reaction of HOCl with taurine to produce taurine chloramine, which oxidizes TMB [31]. The reactions were performed in a 96-well plate containing PBS, taurine (10 mM) and various concentrations of the tested compounds, MPO (50 nM) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50  $\mu$ M). The reactions were triggered by addition of

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and incubated at 37°C (the final volume was 200  $\mu$ L). After 30 min, the reactions were stopped by addition of catalase (20  $\mu$ g/mL) and the accumulated taurine chloramine was measured by adding 50  $\mu$ L of TMB solution. The resulting oxidation product was detected spectrophotometrically at 655 nm using a plate reader (SpectraMax M2, Molecular Devices). The chlorination inhibitory potency was calculated by measuring the concentration of taurine chloramine produced in the control. A standard curve was generated by adding reagent HOCl to PBS containing taurine and used to calculate the amount of HOCl produced by MPO.

### 13. Hypochlorous Acid Production: Activated Neutrophils

Determination of HOCl production by neutrophils was also based on the reaction of the produced HOCl with taurine to produce taurine chloramine. The difference in this case was that MPO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were substituted with PMA-stimulated PMNs. The cells (1.0 x 10<sup>6</sup> cells/mL) were pre-incubated at 37°C for 10 min in supplemented PBS containing 10 mM taurine and the tested compounds. Next, the cells were stimulated by the addition of PMA (100 nM) and incubated for an additional 30 min at 37°C. The reactions were stopped by addition of catalase (20  $\mu$ g/mL) and centrifuged at 2000 rpm. The supernatants (200  $\mu$ L) were transferred to a 96-well plate and 50  $\mu$ L TMB solution was added, as described above. The inhibitory potency was calculated by measuring the amount of taurine chloramine produced in the control, in which the cells were incubated in the absence of the tested compounds. As an additional control, the direct scavenging capacity of the tested compounds for taurine chloramine was evaluated. For that purpose, taurine chloramine was produced by adding 40  $\mu$ M HOCl to 10 mM taurine in PBS. Next, the substances (50  $\mu$ M) were added and incubated for 30 min at 37°C. The decrease in absorbance was measured and compared with that of the control.

### 14. MPO Activity: Amperometric Assay

The consumption of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by the catalytic activity of MPO was monitored using an amperometric detector and a biosensor specific for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (TRB 4100, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA). The reactions were performed in 0.1 M PBS with the tested compounds, 50 nM MPO and 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The reactions were initiated by addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 25°C, and the final reaction volume was 1 mL.

### 15. Statistical Analysis

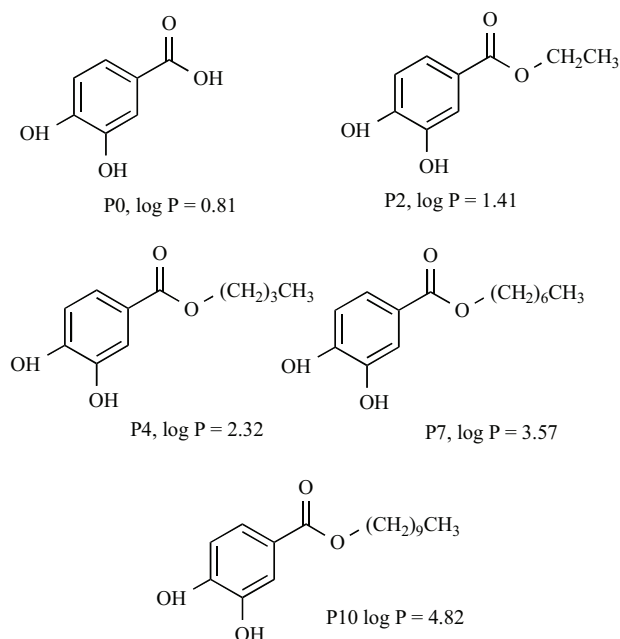
The results were expressed as means  $\pm$  SD. All tests were performed in duplicate and repeated at least 3 times using samples from different blood donors. Statistical difference was determined by the Student's t-test using the control as a reference. A *p*-value < 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

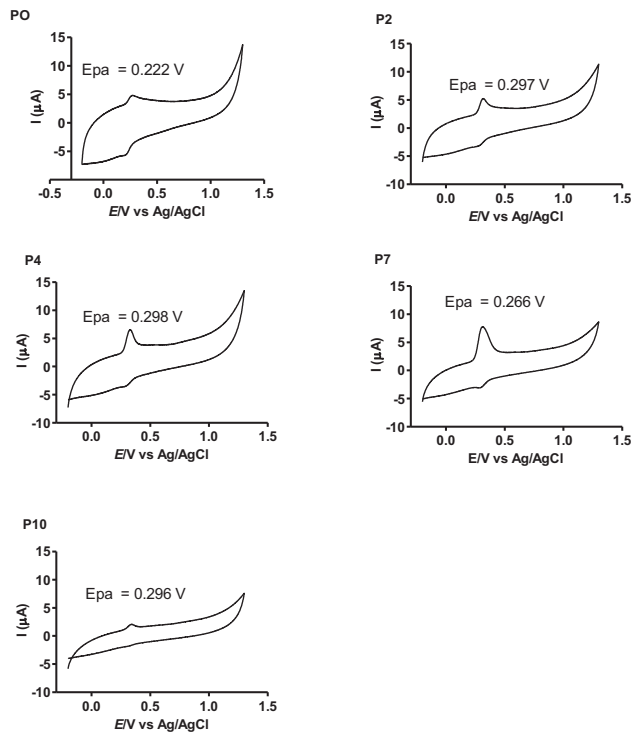
In searching for a structure activity relationship between protocatechuic acid (P0) and its alkyl esters regarding their inhibitory potency on the oxidative burst of leukocytes, we synthesized and purified alkyl esters of protocatechuic acid containing chains of 4 (P4), 7 (P7) and 10 (P10) carbons using standard esterification reactions. The commercial ethyl protocatechuate (P2) was also employed in this study. The molecular structures of the compounds studied are depicted in Fig. (1). As can be seen, the esterification provoked a significant alteration in the hydrophobicity calculated as Log P (partition coefficients n-octanol/water) [24].

Protocatechuic acid and its esters were investigated by cyclic voltammetry using a glassy carbon working electrode to identify the correlation between the oxidation potential, measured as anodic peak potentials (E<sub>pa</sub>), and the inhibition of NADPH oxidase and/or

cell-free antiradical activities. The overall cyclic voltammograms Fig. (2) of the esters obtained at pH 7.0 showed a well-defined anodic wave peaking in the range 0.222 to 0.298 V.

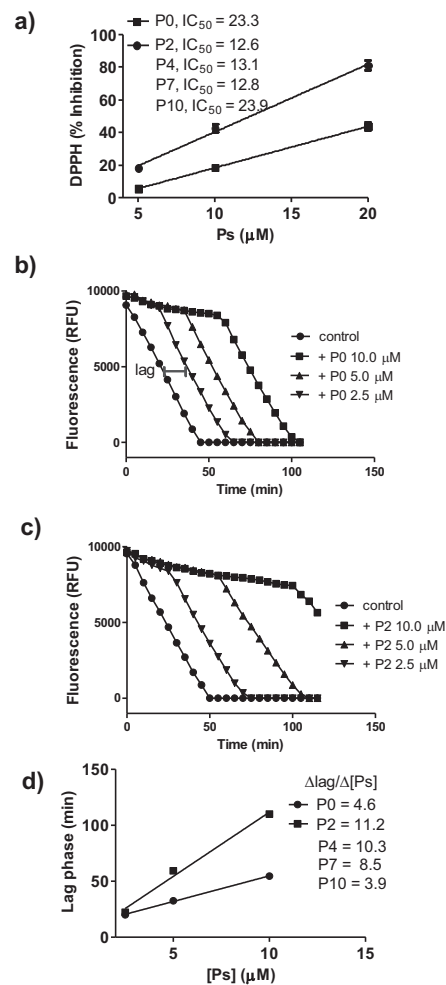


**Fig. (1).** Molecular structures of protocatechuic acid, its alkyl esters, and their hydrophobicity indexes (log P). Acid protocatechuic (P0), ethyl protocatechuate (P2), butyl protocatechuate (P4), heptyl protocatechuate (P7) and decyl protocatechuate (P10).



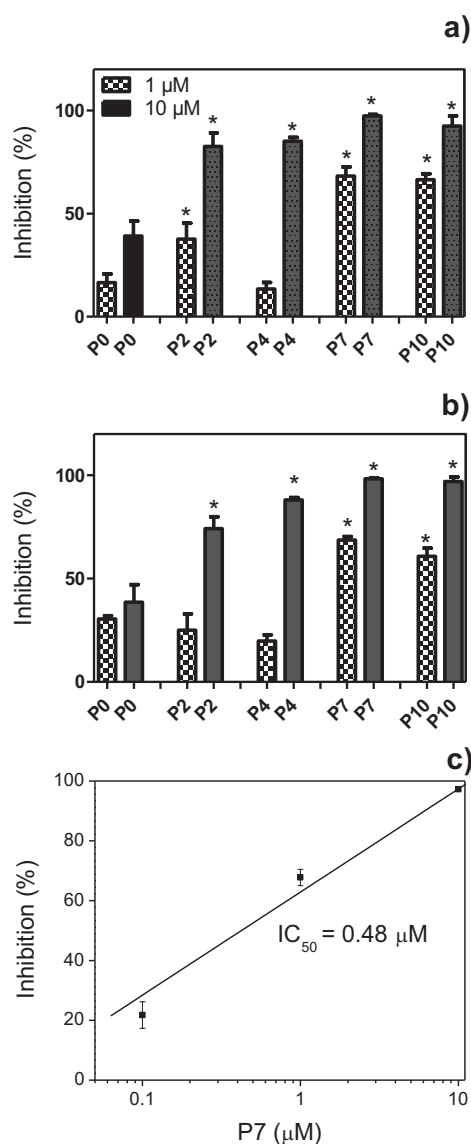
**Fig. (2).** Cyclic voltammograms for protocatechuic and its alkyl esters (0.1 mM) obtained in 0.2 M sodium phosphate buffer at pH 7.0. The scan rate was 5 mV.s<sup>-1</sup>.

Although the oxidation potential was not significantly altered, the increased hydrophobicity of the esters provoked an augment regarding their efficacy as free radical scavengers as compared to the acid precursor. The results depicted in Fig. (3a) show that, except for P10, the esters were ~2-fold more efficient than the acid regarding their ability to scavenge the stable DPPH free radical. The reactivity of protocatechuic acid and its esters with AAPH-derived peroxy radicals (ROO<sup>•</sup>) was also studied. The azo-compound AAPH decomposes at physiological temperature (37°C) in aqueous solutions to generate an alkyl radical (R<sup>•</sup>), which in the presence of molecular oxygen is converted to the corresponding ROO<sup>•</sup> [32]. In this assay, the relative reactivity of the antioxidants with peroxy radicals was evaluated by the lag phase in the pyranine fluorescence bleaching [25]. Figs. (3b and 3c) show the bleaching of pyranine provoked by its oxidation by ROO<sup>•</sup> in the absence (control) or presence of P0 and P2. The linear relationship between the lag phase and the concentration of the tested compounds was used to measure their reactivity with ROO<sup>•</sup>. In this design, the slope of the curve is proportional to the efficiency of the antioxidant as a scavenger of ROO<sup>•</sup>. Fig. (3d) shows the linear correlation between concentration and lag phase for P0 and P2 and the slopes ( $\Delta\text{lag}/\Delta[\text{Ps}]$ ) for all the tested compounds. As can be observed, except for P10, the esters were also more effective than the acid precursor as scavengers of ROO<sup>•</sup>. The lower efficiency for decyl ester (P10) can be explained by its low aqueous solubility.



**Fig. (3).** Protocatechuic acid and its alkyl esters as free radical scavengers. a) DPPH scavenging; b,c) Pyranine bleaching by peroxy radical and the lag phase provoked by addition of P0 and P2; d) Correlation between the lag phase and concentration of Ps. The results are mean and SD of triplicate.

Protocatechuic acid and its esters were studied as inhibitors of lucigenin-dependent chemiluminescence elicited by opsonized zymosan-activated leukocytes. Lucigenin-dependent chemiluminescence is a sensitive, reproducible, and reliable technique for superoxide detection. In this reaction, superoxide reduces lucigenin to form its cation radical, which reacts with a second superoxide anion to form the energy-rich dioxetane molecule that decomposes, emitting light [33]. The results shown in Fig. (4) show a progressive increase in the inhibitory capacity of the esters compared to the acid precursor. Similar results were obtained for both PMNs and PBMCs. These inhibitory effects were not the result of a cytotoxic effect on leukocytes, as checked by the trypan blue exclusion assay [28]. At the higher concentration used for the leukocyte studies, the viability of the cells was >98%.



**Fig. (4).** Protocatechuic acid and its alkyl esters as inhibitors of superoxide anion radicals produced by stimulated leukocytes. **a)** Inhibition of lucigenin-dependent chemiluminescence elicited by opsonized zymosan-activated PMNs and **(b)** PBMCs. **c)** Inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) for P7 in PMNs. The cells ( $1 \times 10^6/mL$ ) were pre-incubated in supplemented PBS (pH 7.4) with the tested substances for 10 min and the reactions were started by addition of 1.0 mg/mL opsonized zymosan. Data represent the mean and SD of at least 3 different experiments conducted in duplicate. \* $p < 0.05$  relative P0 (Student's T-test).

Considering the similarity in the inhibitory potency between the esters P7 and P10, but the lower aqueous solubility of the latter, we decided to use the P7 ester for confirmatory experiments regarding the inhibition of the release of superoxide anion radicals by PMNs. For that purpose, the water soluble and membrane-impermeable sulfonated tetrazolium salt, WST-1, was used as a chromogenic probe for superoxide anion radical released into the extracellular medium. This assay is based on the reduction of WST-1 by superoxide anion radical, producing its soluble formazan, which can be measured by absorption at 450 nm [30]. The results in Fig. (5a) show the time course for superoxide anion radical production by activated PMNs, the inhibitory effect of P7, and the lack of effect of P0. It is worthy to note that P7 was also significantly more effective than apocynin, a substituted methoxy-catechol that has been widely employed as a NADPH oxidase inhibitor [34] Fig. (5b). Considering that the previous results could be the consequence of direct scavenging of superoxide anion radicals and not the inhibition of its production by the cells, P0 and P7 were also tested as scavengers of superoxide anion radicals generated by the enzymatic xanthine/xanthine oxidase system. As can be seen, at a concentration equal that used in the cellular systems, the P0 and P7 were not able to react with the superoxide anion radical Fig. (5c).

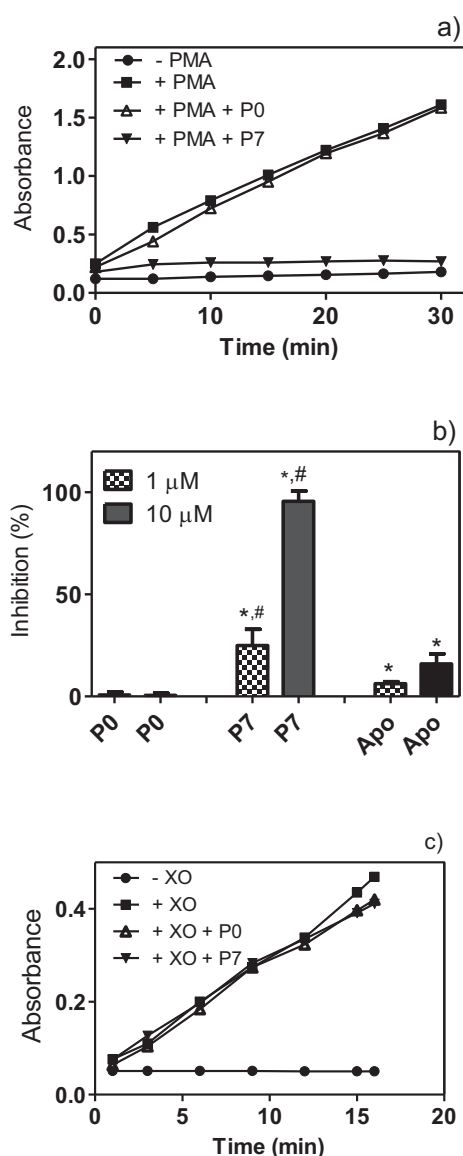
An additional confirmation of the increased potency of P7 regarding the inhibition of NADPH oxidase in PMNs was obtained through cell morphology studies. In these experiments, PMNs were incubated with P7, and after PMA-stimulation, the suspension of cells was centrifuged onto glass slides and stained for evaluation of alteration in cellular morphology. Fig. (6) shows the vacuolization in the cytoplasm and nuclear disruption of the cells provoked by activation of NADPH oxidase [35], and the protective effect of P7.

The inhibitory effect on the production of superoxide anion radicals would also imply a decreased extracellular release of HOCl by activated PMNs. This expectation was confirmed and the esters, particularly P7, were effective inhibitors compared to the acid precursor, which was unable to block the production of HOCl Fig. (7). In these assays, HOCl was detected by being trapped as taurine chloramine. Therefore, it was possible that the tested substances could be acting by scavenging HOCl, thereby preventing it from reacting with taurine in the buffer. However, at a concentration of 50 μM, which was 5-fold higher than that used in the cell studies, the protocatechuic acid and its esters were unable to prevent reagent HOCl from reacting with taurine, thus eliminating the possibility of a direct scavenger effect in this experimental model Fig. (7).

The substances were also studied using pure MPO. Contrary to the previous experiment, neither protocatechuic acid nor its alkyl esters were able to inhibit the chlorinating activity of MPO. On the other hand, 5-fluorotryptamine, a potent and well-known inhibitor of the chlorinating activity of MPO and used here as a reference substance [36], was a potent inhibitor Fig. (8). To confirm the absence of effect of the tested substance on MPO chlorinating activity, the reactions were monitored using a sensitive electrode specific for  $H_2O_2$ , hence eliminating interference with the chromogenic probe. The results in Fig. (8) show the inhibitory effect of 5-fluorotryptamine, and as expected, the lack of effect on the ester P7. Similar results were found with the other esters (data not shown).

## DISCUSSION

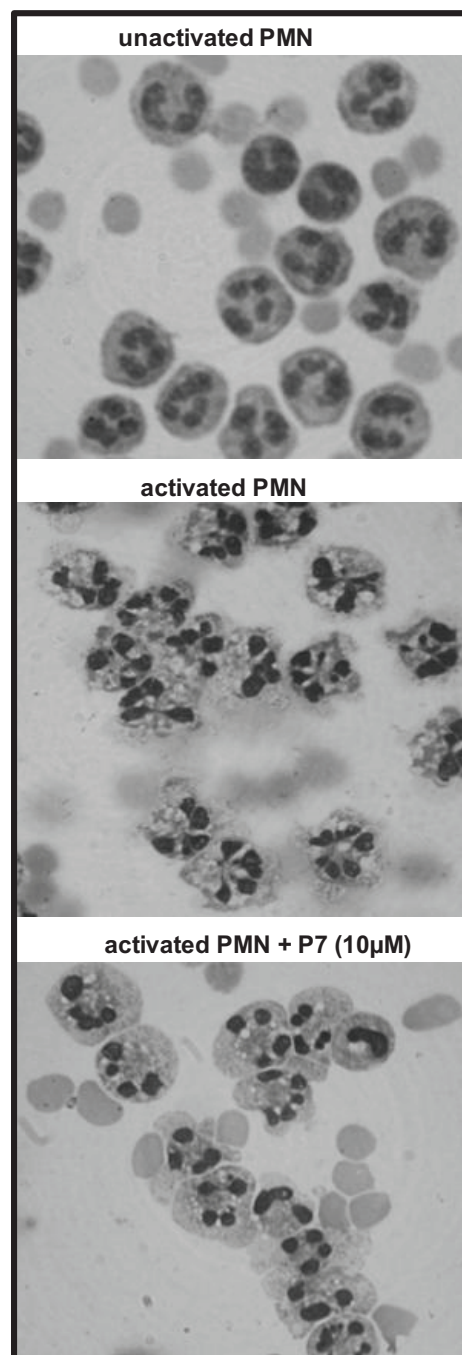
The esterification of phenolic acids has been used as a tool for improving the biological effects of these traditional antioxidant molecules. These effects include improvement of their potency as anti-inflammatory, cytotoxicity, anti-tumor, antimutagenicity, anti-fungal, and antibacterial agents [1-6]. Considering that these biological effects are usually linked to the redox properties of these molecules, a logical question is whether alkylation could change their antiradical features. To address this question, it was demonstrated that the DPPH scavenging capacity of the methyl ester of



**Fig. (5).** Protocatechuic acid and heptyl protocatechuate as inhibitors of superoxide anion radicals produced by PMNs and by xanthine oxidase. **a)** Kinetics of WST-1 reduction induced by superoxide anion radicals released by PMA-activated PMNs, and the effects of P0 and P7. **b)** WST-1 reduction elicited by PMA-activated PMNs and the inhibitory effects of P0, P7, and apocynin. The cells ( $0.5 \times 10^6/\text{mL}$ ) were pre-incubated in supplemented PBS (pH 7.4) with the tested substances for 10 min and the reactions were started by addition of 100 nM PMA. Data represent the mean and SD of at least 3 different experiments conducted in duplicate. \* $p < 0.05$  relative to P0; # $p < 0.05$  relative to apocynin (Student's T-test). **c)** Kinetics of WST-1 reduction induced by superoxide anion radicals produced by xanthine/xanthine oxidase and the effects of P0 and P7.

protocatechuic acid was 2-fold greater than that of the acid precursor [37]. This property was explained by the increased reactivity of the *o*-quinone intermediate generated by DPPH oxidation of the methyl protocatechuate in an alcoholic solvent, hence expanding its antioxidant capacity [37]. This characteristic was also demonstrated for the methyl, ethyl, and propyl esters of protocatechuic acid [38]. In agreement, we obtained similar results for the butyl and heptyl esters. Moreover, we demonstrated that the same property was observed regarding the reduction of peroxy radicals in aqueous me-

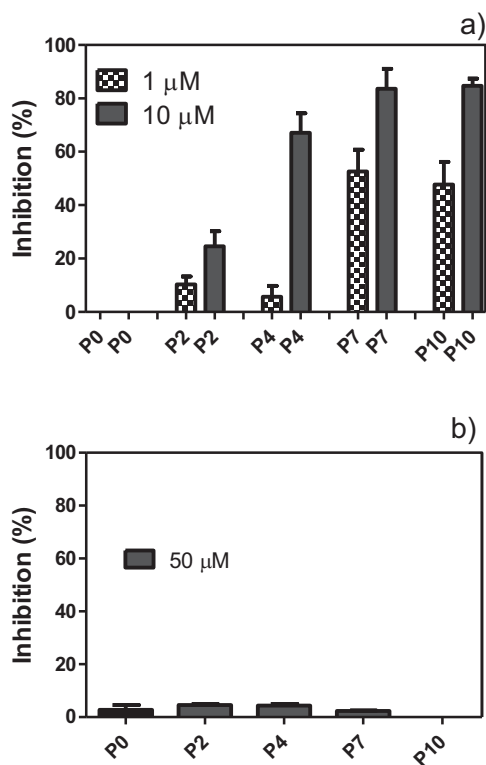
dium. This is evidence that the augmented antioxidant capacity of the esters of protocatechuic acid can also exist in aqueous solutions, which are closer to physiological conditions.



**Fig. (6).** Neutrophil morphological alteration induced by PMA and the protective effect of P7. The cells ( $1 \times 10^6/\text{mL}$ ) were activated by 100 nM PMA in the presence or absence of P7 for 30 min, concentrated by cytospin centrifugation, and hematologically stained (May Grounwald Giemsa).

The increased hydrophobicity of the esters had a strong effect on the capacity of these compounds to inhibit NADPH oxidase in leukocytes. In this regard, it is worthy to note that our results are not related to scavenging of  $\text{O}_2^{\cdot -}$ . This possibility was eliminated, because at the concentration used here, protocatechuic acid and its esters were not able to scavenge  $\text{O}_2^{\cdot -}$  produced by the enzymatic

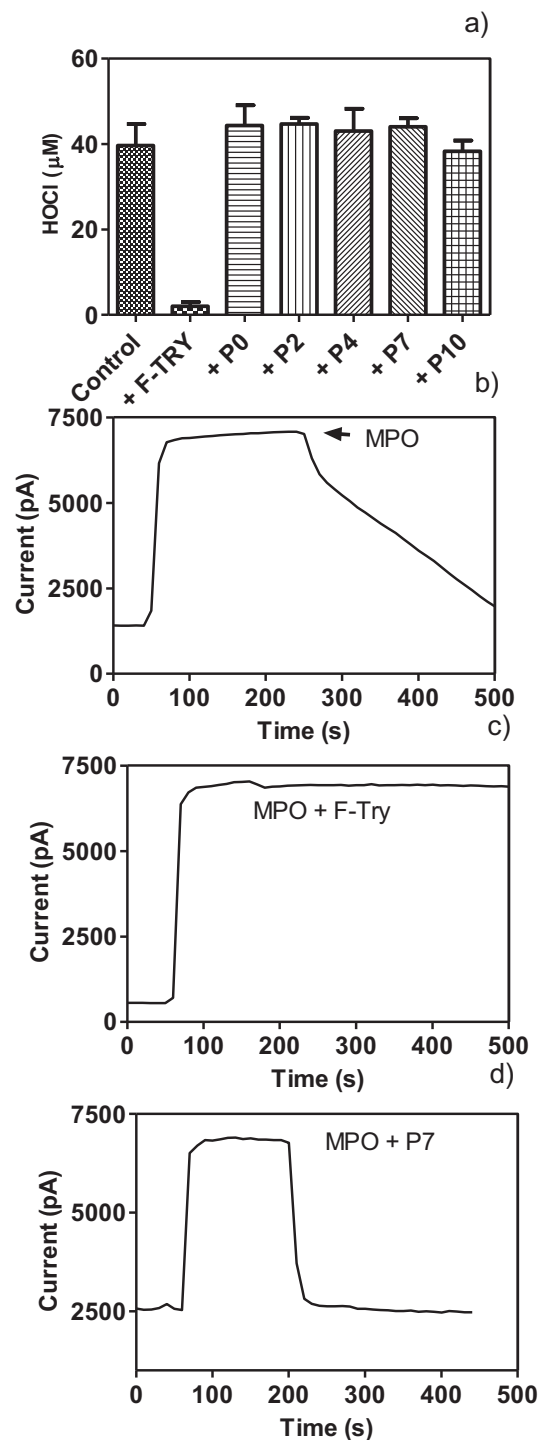
xanthine/xanthine oxidase system. Additional evidence that the inhibitory effect is not linked to scavenging of ROS or due to interaction of the esters with the luminescent and chromogenic probes used in our studies was the finding that the inhibitory capacity was also observed in the neutrophil morphology study, which did not involve addition of probes. As has been demonstrated, PMA stimulates a rapid formation of vacuoles derived from the cell surface of PMNs, which closely resemble the vacuoles that develop during uptake of particulates in the process of phagocytosis [35]. Here, a 10  $\mu\text{M}$  concentration of P7 had a significant protective effect against the disruption and vacuolization of the cells.



**Fig. (7).** Protocatechuic acid and its alkyl esters as inhibitors of hypochlorous acid produced by PMNs. **a)** The cells ( $1 \times 10^6/\text{mL}$ ) were pre-incubated in supplemented PBS (pH 7.4) with 10 mM taurine and the tested substances for 10 min. The reactions were initiated by addition of 100 nM PMA. The produced taurine chloramine was measured using the TMB assay. Data represent the mean and SD of at least 3 different experiments conducted in duplicate. **b)** Scavenging effect of the tested substances (50  $\mu\text{M}$ ) on taurine chloramine chemically produced by 40  $\mu\text{M}$  HOCl.

The potential for application of P7 as a potent inhibitor of NADPH oxidase can be also highlighted because it was  $\sim 10$ -fold more effective than apocynin. This substituted methoxy-catechol has been widely applied as a NADPH oxidase inhibitor [17-21]. A recent advance in this area was the use of a trimer hydroxylated quinone derived from apocynin [39]. This substance was significantly more effective than apocynin in endothelial cells, and its mechanism of action was related to the reaction between cysteine residues of p47phox, a cytosolic component of NADPH oxidase, and the quinone moiety of the trimer [39]. In theory, *o*-quinone, which is the product of oxidation of the esters of protocatechuic acid [37], could also have a similar role in the mechanism of action of the compounds studied here. Another characteristic that deserves attention is the greater intensity of the oxidation peaks obtained in the voltammograms of the esters compared to those from the acid precursor. This property, already observed for the methyl, ethyl,

and propyl esters, has been explained by the higher stability of the free radical intermediates generated during its oxidation [38]. This property could influence its reactivity with essential reactive groups in the protein components of NADPH oxidase, and as a consequence, contribute to the higher efficacy of the esters.



**Fig. (8).** Protocatechuic acid and its alkyl esters as inhibitors of hypochlorous acid produced by MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **a)** The tested substances and 5-fluorotryptamine (10  $\mu\text{M}$ ) were incubated in supplemented PBS (pH 7.4) with 10 mM taurine and 50 nM MPO. The reaction was initiated by addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50  $\mu\text{M}$ ); **b)** Chlorinating activity of MPO was measured by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption; **c-d)** Effects of 5-fluorotryptamine and P7 on MPO activity.

Another characteristic of the esters, and different from apocynin, was their efficacy in PBMCS, a cell population with low levels of MPO. It must be remembered that an important characteristic concerning the mechanism of inhibition of NADPH oxidase by apocynin is that it must be oxidized to perform its role through a MPO-dependent reaction [40]. A putative explanation for the absence of a difference between PMNs and PBMCS using the esters is that the catechol moiety is easily oxidized compared to the methoxy catechol apocynin; hence, a lower dependency of the catalytic affect of MPO could be expected.

The biological effect of the esters on NADPH oxidase in PMNs had consequences on the production of HOCl by these cells. This finding is highly significant because of the deleterious effect of HOCl on biomolecules and its correlation with tissue injury in several pathologies, including cardiovascular diseases, is widely accepted [41, 42]. Our findings clearly showed that the inhibition of release of HOCl is not related to the scavenger effects on HOCl or inhibition of the enzymatic chlorinating activity of MPO. Hence, the logical conclusion is the inhibition of production of O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, which is the precursor of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and through MPO, of HOCl.

## CONCLUSION

Considering the well-established relationship between several inflammatory and degenerative diseases and the activation of NADPH oxidase as a primary non-mitochondrial source of O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, the development of drugs able to inhibit this enzymatic source of ROS could bring enormous benefits for the treatment of these diseases. A common characteristic of NADPH oxidase inhibitors such as flavanols [43], catechols [44], methoxy-substituted catechols [45], diphenylene iodonium [46], etc, is the presence of a redox active or electrophilic moiety; however, here we demonstrated for the first time that the hydrophobicity is also relevant. This dependence is an indication that the membrane permeability and/or accessibility to the NADPH oxidase complex, which is a multi-component membrane complex, can be an important factor for the development of a NADPH oxidase inhibitor.

## CONFLICT OF INTEREST

The author(s) confirm that this article content has no conflicts of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) and from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## REFERENCES

- Chalas, J.; Claise, C.; Edeas, M.; Messaoudi, C.; Vergnes, L.; Abella, A.; Lindenbaum, A. Effect of ethyl esterification of phenolic acids on low-density lipoprotein oxidation. *Biomed. Pharmacother.*, **2001**, 55(1), 54-60.
- Locatelli, C.; Rosso, R.; Santos-Silva, M.C.; de Souza, C.A.; Licinio, M.A.; Leal, P.; Bazzo, M.L.; Yunes, R.A.; Creczynski-Pasa, T.B. Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, 16(7), 3791-3799.
- Feng, Q.; Kumagai, T.; Nakamura, Y.; Uchida, K.; Osawa, T. Correlation of antimutagenic activity and suppression of CYP1A with the lipophilicity of alkyl gallates and other phenolic compounds. *Mutat. Res.*, **2003**, 537(1), 101-108.
- Kubo, I.; Fujita, K.; Nihei, K.; Nihei, A. Antibacterial activity of alylgallates against *Bacillus subtilis*. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52(5), 1072-1076.
- Morais, M.C.; Luqman, S.; Kondratyuk, T.P.; Petronio, M.S.; Regasini, L.O.; Silva, D.H.; Bolzani, V.S.; Soares, C.P.; Pezzuto, J.M. Suppression of TNF- $\alpha$  induced NF $\kappa$ B activity by gallic acid and its semi-synthetic esters: possible role in cancer chemoprevention. *Nat. Prod. Res.*, **2010**, 24(18), 1758-1765.
- Ximenes, V.F.; Lopes, M.G.; Petrónio, M.S.; Regasini, L.O.; Silva, D.H.; da Fonseca, L.M. Inhibitory effect of gallic acid and its esters on 2,2'-azobis(2 amidinopropane)hydrochloride (AAPH)-induced hemolysis and depletion of intracellular glutathione in erythrocytes. *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, 58(9), 5355-5362.
- Groemping, Y.; Rittinger, K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem. J.*, **2005**, 386(3), 401-416.
- Ushio-Fukai, M. Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxid. Redox Signal.*, **2009**, 11(6), 1289-1299.
- Simonyi, A.; He, Y.; Sheng, W.; Sun, A.Y.; Wood, W.G.; Weisman, G.A.; Sun, G.Y. Targeting NADPH oxidase and phospholipases A2 in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.*, **2010**, 41(2-3), 73-86.
- Zhou, H.; Zhang, F.; Chen, S.H.; Zhang, D.; Wilson, B.; Hong, J.S.; Gao, H.M. Rotenone activates phagocyte NADPH oxidase by binding to its membrane subunit gp91phox. *Free Radic. Biol. Med.*, **2012**, 52(2), 303-313.
- Fischer, M.T.; Sharma, R.; Lim, J.L.; Haider, L.; Frischer, J.M.; Drexhage, J.; Mahad, D.; Bradl, M.; van Horssen, J.; Lassmann, H. NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain*, **2012**, 135(3), 886-899.
- Lin, C.; Wang, H. NADPH oxidase is involved in H2O2-induced differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Cell Biol. Int.*, **2012**, 36(4), 391-395.
- Takac, I.; Schröder, K.; Brandes, R.P. The Nox family of NADPH oxidases: friend or foe of the vascular system? *Curr. Hypertens. Rep.*, **2012**, 14(1), 70-78.
- Drummond, G.R.; Selemidis, S.; Griendling, K.K.; Sobey, C.G. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2011**, 10(6), 453-471.
- Heumüller, S.; Wind, S.; Barbosa-Sicard, E.; Schmidt, H.H.H.W.; Busse, R.; Schröder, K.; Brandes, R.P. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but a potent antioxidant. *Hypertension*, **2008**, 51, 211-217.
- Touyz, R.M. Apocynin, NADPH oxidase, and vascular cells: a complex matter. *Hypertension*, **2008**, 51(2), 172-174.
- Stefanska, J.; Sarniak, A.; Włodarczyk, A.; Sokolowska, M.; Pniowska, E.; Doniec, Z.; Nowak, D.; Pawliczak, R. Apocynin reduces reactive oxygen species concentrations in exhaled breath condensate in asthmatics. *Exp. Lung Res.*, **2012**, 38(2), 90-99.
- Simonyi, A.; Serfozo, P.; Lehmid, T.M.; Cui, J.; Gu, Z.; Lubahn, D.B.; Sun, A.Y.; Sun, G.Y. The neuroprotective effects of apocynin. *Front. Biosci. (Elite Ed)*, **2012**, 4, 2183-2193.
- Guimarães, D.D.; Carvalho, C.C.; Braga, V.A. Scavenging of NADPH Oxidase-derived Superoxide Anions Improves Depressed Baroreflex Sensitivity in Spontaneously Hypertensive Rats. *Clin Exp Pharmacol. Physiol.*, **2012**, 1440-1461.
- Ahmad, A.; Mondello, S.; Di Paola, R.; Mazzon, E.; Esposito, E.; Catania, M.A.; Italiano, D.; Mondello, P.; Aloisi, C.; Cuzzocrea, S. Protective effect of apocynin, a NADPH-oxidase inhibitor, against contrast-induced nephropathy in the diabetic rats: a comparison with *N*-acetylcysteine. *Eur. J. Pharmacol.*, **2012**, 674(2-3), 397-406.
- Impellizzeri, D.; Mazzon, E.; Esposito, E.; Paterniti, I.; Bramanti, P.; Cuzzocrea, S. Effect of Apocynin, an inhibitor of NADPH oxidase, in the inflammatory process induced by an experimental model of spinal cord injury. *Free Radic. Res.*, **2011**, 45(2), 221-236.
- Lende, A.B.; Kshirsagar, A.D.; Deshpande, A.D.; Muley, M.M.; Patil, R.R.; Bafna, P.A. Anti-inflammatory and analgesic activity of protocatechuic acid in rats and mice. *NatInflammopharmacology*, **2011**, 19(5), 255-263.
- Lojek, A.; Kubala, L.; CÍZOVÁ, H.; CÍZ, M. A comparison of whole blood neutrophil chemiluminescence measured with cuvette and microtitre plate luminometers. *Luminescence*, **2002**, 17(1) 1-4.
- Ghose, A.K.; Crippen, G.M. Atomic physicochemical parameters for three-dimensional-structure-directed quantitative structure-activity relationships. 2. Modeling dispersive and hydrophobic interactions. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **1987**, 27, 21-35.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft/Technologie*, **1995**, 28, 25-30.
- Campos, A.M.; Sotomayor, C.P.; Pino, E.; Lissi, E. A pyranine based procedure for evaluation of the total antioxidant potential (TRAP) of polyphenols. A comparison with closely related methodologies. *Biol. Res.*, **2004**, 37, 287-292.
- 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*, **1974**, 5(3), 249-252.
- Strober, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.*, Appendix 3:Appendix 3B, **2001**.
- de Almeida, A.C.; Marques, O.C.; Arslanian, C.; Condino-Neto, A.; Ximenes, V.F. 4-fluoro-2-methoxyphenol, an apocynin analog with enhanced inhibitory effect on leukocyte oxidant production and phagocytosis. *Eur. J. Pharmacol.*, **2011**, 660(2-3), 445-453.
- Tan, A.S.; Berridge, M.V. Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: a simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents. *J. Immunol. Methods*, **2000**, 238(1-2), 59-68.
- Ximenes, V.F.; Maghzal, G.J.; Turner, R.; Kato, Y.; Winterbourn, C.C.; Kettle, A.J. Serotonin as a physiological substrate for myeloperoxidase and its superoxide-dependent oxidation to cytotoxic tryptamine-4,5-dione. *Biochem J.*, **2009**, 425(1), 285-293.
- Niki, E. Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy

- radicals. *Methods Enzymol.*, **1990**, 186, 100-108.
- [33] Münzel, T.; Afanas'ev, I.B.; Kleschyov, A.L.; Harrison, D.G. Detection of Superoxide in Vascular Tissue. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2002**, 22(11), 1761-1768.
- [34] Castor, L.R.; Locatelli, K.A.; Ximenes, V.F. Pro-oxidant activity of apocynin radical. *Free Radic. Biol. Med.*, **2010**, 48(12), 1636-1643.
- [35] Hoidal, J.R.; Repine, J.E.; Beall, G.D.; Rasp, F.L. Jr.; White, J.G. The Effect of Phorbol Myristate Acetate on the Metabolism and Ultrastructure of Human Alveolar Macrophage. *Am. J. Pathol.*, **1978**, 91(3), 469-482.
- [36] Jantschko, W.; Furtmüller, P.G.; Zederbauer, M.; Neugschwandtner, K.; Lehner, I.; Jakopitsch, C.; Arnhold, J.; Obinger, C. Exploitation of the unusual thermodynamic properties of human myeloperoxidase in inhibitor design. *Biochem. Pharmacol.*, **2005**, 69(8), 1149-1157.
- [37] Saito, S.; Kawabata, J. DPPH (=2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) Radical-Scavenging Reaction of Protocatechuic Acid (=3,4-Dihydroxybenzoic Acid): Difference in Reactivity between Acids and Their Esters. *Helvetica Chimica Acta*, **2006**, 89(7), 1395-1407.
- [38] Reis, B.; Martins, M.; Barreto, B.; Milhazes, N.; Garrido, E.M.; Silva, P.; Garrido, J.; Borge, F. Structure-property-activity relationship of phenolic acids and derivatives. Protocatechuic acid alkyl esters. *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, 58(11), 6986-6993.
- [39] Mora-Pale, M.; Kwon, S.J.; Linhardt, R.J.; Dordick, J.S. Trimerhydroxylatedquinone derived from apocynin targets cysteine residues of p47phox preventing the activation of human vascular NADPH oxidase. *Free Radic. Biol. Med.*, **2012**, 52(5), 962-969.
- [40] 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*, **2002**, 9, 191-203.
- [41] Ford, D.A. Lipid oxidation by hypochlorous acid: chlorinated lipids in atherosclerosis and myocardial ischemia. *Clin. Lipidol.*, **2010**, 5(6), 835-852.
- [42] Bai, Y.P.; Hu, C.P.; Yuan, Q.; Peng, J.; Shi, R.Z.; Yang, T.L.; Cao, Z.H.; Li, Y.J.; Cheng, G.; Zhang, G.G. Role of VPO1, a newly identified heme-containing peroxidase, in ox-LDL induced endothelial cell apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.*, **2011**, 51(8), 1492-1500.
- [43] Steffen, Y.; Gruber, C.; Schewe, T.; Sies, H. Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2008**, 469(2), 209-219.
- [44] Karthik, D.; Viswanathan, P.; Anuradha, C.V. Administration of rosmarinic acid reduces cardiopathology and blood pressure through inhibition of p22phox NADPH oxidase in fructose-fed hypertensive rats. *Cardiovasc. Pharmacol.*, **2011**, 58(5), 514-521.
- [45] Kanegae, M.P.; da Fonseca, L.M.; Brunetti, I.L.; Silva, S.O.; Ximenes, V.F. 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. *Biochem. Pharmacol.*, **2007**, 74(3), 457-464.
- [46] Hancock, J.T.; White, J.I.; Jones, O.T.; Silver, I.A. The use of diphenyleneiodonium and its analogues to investigate the role of the NADPH oxidase in the tumoricidal activity of macrophages *in vitro*. *Free Radic. Biol. Med.*, **1991**, 11(1), 25-29.

Received: May 25, 2012

Revised: August 02, 2012

Accepted: August 15, 2012







Protocolo CEP/FCF/CAr nº 26/2011

Interessado: CAROLINA MARIA QUINELLO GOMES DE FARIA

Orientador: Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

Projeto: Ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos: propriedades anti e pró-oxidantes e seus efeitos no metabolismo oxidativo de leucócitos

### **Parecer nº 39/2011 – Comitê de Ética em Pesquisa**

O projeto "Ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos: propriedades anti e pró-oxidantes e seus efeitos no metabolismo oxidativo de leucócitos" encontra-se adequado em conformidade com as orientações constantes da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS.

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

Relatórios parciais do projeto de pesquisa deverão ser entregues em dezembro de 2012 e 2013. O relatório final e os Termos de Consentimento Livre Esclarecido dos sujeitos da pesquisa (originais e assinados em todas as folhas) deverão ser entregues em dezembro de 2014.

Araraquara, 25 de novembro de 2011.

Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA

Coordenador do CEP