

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO (MCC)

TÍTULO: “APOCININA VERSUS DIAPOCININA COMO INIBIDOR DA PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E ÁCIDO HIPOCLOROSO POR NEUTRÓFILOS ATIVADOS”

Orientador: Prof. Dr. VALDECIR FARIAS XIMENES

Orientado: ADRIANO DE SOUZA PESSOA

BAURU - SP

Dezembro / 2009

ADRIANO DE SOUZA PESSOA

TÍTULO: “APOCININA VERSUS DIAPOCININA COMO INIBIDOR DA PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E ÁCIDO HIPOCLOROSO POR NEUTRÓFILOS ATIVADOS”

Monografia de Conclusão de Curso (MCC)
do curso de Licenciatura em Química, da
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho – UNESP

Prof. Dr. VALDECIR FARIAS XIMENES

BAURU-SP

2009

Pessoa, Adriano de Souza.

Apocinina versus Diapocinina como inibidor da
Produção de Peróxido de Hidrogênio e Ácido
Hipocloroso por Neutrófilos Ativados / Adriano de
Souza Pessoa, 2009.

56 f. : il.

Orientador: Valdecir Farias Ximenes

Monografia (Graduação)–Universidade Estadual
Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2009

1. Espécies Reativas de Oxigênio. 2. Apocinina. 3.
Diapocinina I. Universidade Estadual Paulista.
Faculdade de Ciências. II. Apocinina versus
Diapocinina.

DEDICATÓRIA

Dedico este a trabalho primeiramente a Deus, por ter me dado saúde, inteligência e a oportunidade de fazer o que gosto. Dedico também a minha mãe Leopoldina, meu pai Darcy, minha irmã Alessandra, a meus avós, Orozina e Joaquim, meus tios, Clarice e João, e é claro meu primo Mikhael, por me darem a estrutura familiar que precisava para me fortalecer nas horas de necessidade, e pela paciência nos momentos de desespero. Onde meus pais nunca mediram esforços para que eu tivesse essa oportunidade, e neste trabalho na verdade atuei como um mero figurante, onde os atores principais foram eles que sempre se esforçaram tanto para que isso fosse possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que colaboraram com este trabalho, em especial a Michele, meu carma, amiga pra todas as horas e que tanto me ajudou. Agradeço também ao Prof^o Valdecir pela oportunidade de trabalhar com o que gosto e pela paciência que teve comigo. A Camila por sempre estar presente nos momentos fáceis e nos difíceis também. Aos amigos do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Estadual Bauru, aos amigos da Agência Transfusional, em especial a Maira, que sempre me ajudou, tendo sempre uma palavra de conforto nas horas difíceis, sem esquecer é claro do meu camarada Aléx. Agradeço ainda aos meus colegas de sala, pois afinal foram cinco anos de convivência que chegarão ao fim e deixaram saudades.

“Que Deus nos de a sabedoria para descobrir o correto, à vontade para elegê-lo e a força para fazer que seja duradouro.” (Autor desconhecido)

RESUMO

A apocinina tem sido utilizada como um eficiente inibidor do complexo multienzimático NADPH oxidase em muitos modelos experimentais envolvendo células fagocíticas e não fagocíticas. O mecanismo de inibição tem sido associado com a ativação celular da apocinina através da ação de peroxidases levando à formação de um produto dimérico por oxidação, a diapocinina. Neste estudo a apocinina e a diapocinina puras foram comparadas a respeito de seus efeitos como supressor de peróxido de hidrogênio e hipocloroso gerados pela glicose / glicose oxidase e mieloperoxidase, respectivamente, e como inibidores da produção de peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso por neutrófilos ativados. A produção de peróxido de hidrogênio, foi medida pela oxidação da substância fluorescente Amplex[®] Red e a produção de ácido hipocloroso foi medida com taurina-cloramina utilizando o substrato cromogênico 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Neutrófilos (1×10^6 células / mL) foram pré-incubados em tampão PBS suplementado com 1 mM de cloreto de cálcio, 0,5 mM de cloreto de magnésio, 1 mg/mL de glicose e 5 mM de taurina na presença ou ausência dos inibidores. As reações foram desencadeadas pela adição ao estímulo solúvel acetato de formol miristato (PMA) ou zimozan e incubadas por mais 30 minutos. Descobrimos que a diapocinina purificada não foi melhor do que a apocinina no que diz respeito à sua propriedade de supressão e inibição da produção de H_2O_2 e HOCl por neutrófilos ativados. Estes resultados sugerem que o mecanismo de ação da apocinina não esteja, necessariamente, relacionado à sua conversão em diapocinina.

Palavras chave – Apocinina, ácido hipocloroso e peróxido de hidrogênio

ABSTRACT

Apocynin has been used as an efficient inhibitor of the multi-enzymatic complex NADPH oxidase in many experimental models involving phagocytic and nonphagocytic cells. The mechanism of inhibition has been linked with the previous activation of apocynin through the action of cellular peroxidases leading to the formation of a dimeric oxidation product, diapocynin. In this study we compared apocynin with pure diapocynin regarding their effects as scavenger of hydrogen peroxide and hypochlorous generated by glucose/glucose oxidase and myeloperoxidase respectively, and as inhibitors of the production of hydrogen peroxide and hypochlorous acid by activated neutrophils. The production of hydrogen peroxide was measured by the oxidation of the fluorescent substance Amplex Red and the production of hypochlorous acid by was measured as taurine-chloramine derivative using the chromogenic substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). Neutrophils (1×10^6 cells/mL) were pre-incubated in PBS buffer supplemented with 1 mM calcium chloride, 0.5 mM magnesium chloride, 1 mg/mL glucose and 5 mM taurine in the presence or absence of inhibitors. The reactions were triggered by adding the soluble stimulus Forbol Miristate Acetate PMA or zymosan and incubated by additional 30 minutes. We found that pure diapocynin was not better than apocynin regarding its scavenger and inhibitory properties. These results suggest that the formation of diapocynin is not essential for the action of apocynin as inhibitor of NADPH oxidase activation.

Keywords: Apocynin, hypochlorous acid and hydrogen peroxide.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Neutrófilos.....	13
2.2 NADPH oxidase, burst oxidativo e espécies reativas de oxigênio	15
2.3 Mieloperoxidase.....	19
2.4 O papel fisiológico e patológico do complexo NADPH oxidase	22
2.5 Mecanismos de defesa antioxidantes	25
2.6 Apocinina	26
3 OBJETIVOS	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 Materiais	30
4.1.1 Compostos químicos e solventes.....	30
4.1.2 Equipamentos	30
4.1.3 Leucócitos humanos	30
4.2 Métodos	31
4.2.1 Soluções Estoque e Tampões	31
4.2.1.1 Tampão PBS e Tampão PBS suplementado.....	31
4.2.1.2 Solução de Amplex [®] Red	31
4.1.2.3 Solução de PMA.....	31
4.1.2.4 Solução de HRP	32
4.1.2.5 Solução de H ₂ O ₂	32
4.1.2.6 Solução de HClO	32

4.1.2.7 Solução de Alséver.....	32
4.1.2.8 Solução de Apocinina e Diapocinina	33
4.1.2.9 Solução de Zimosan opsonizado.....	33
4.1.2.10 Suspensão de Neutrófilos.....	34
4.1.2.11 Solução de glicose oxidase	35
4.1.2.12 Solução de TMB	35
4.1.1.13 Solução de Taurina.....	35
4.2.2 Preparo de Reações	36
4.2.2.1 Curvas de calibração	36
4.2.2.1.1 Curva de calibração de H ₂ O ₂	36
4.2.2.1.2 Curva Analítica para Quantificação de Ácido Hipocloroso	36
4.2.2.1 Reação para Determinação da Produção de Peróxido de Hidrogênio por Oxidação Enzimática da Glicose na presença de Glicose-Oxidase	37
4.2.2.2 Reação para Determinação da Produção de Peróxido de Hidrogênio por Neutrófilos Ativados.....	37
4.2.2.3 Determinação da produção de ácido hipocloroso por neutrófilos ativados	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1 Curvas de calibração	39
5.1.1 Curva analítica para quantificação de H ₂ O ₂	39
5.1.2 Curva analítica para quantificação de ácido hipocloroso	40
5.2 Determinação da Produção de Peróxido de Hidrogênio por Oxidação Enzimática da Glicose na presença de Glicose-Oxidase	41

5.3 Determinação da Produção de Peróxido de Hidrogênio por Neutrófilos Ativados	44
5.4 Determinação da produção de ácido hipocloroso por neutrófilos ativados..	49
6 CONCLUSÃO.....	51
7 REFERÊNCIAS.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Mecanismo de Produção de Espécies Reativas de Oxigênio	16
2: Mecanismo das reações envolvendo mieloperoxidase	22
3. Curva de calibração para determinação de H ₂ O ₂	39
4. Curva de calibração para determinação de HOCl	40
5. Princípio da reação utilizada para determinação de H ₂ O ₂ utilizando o reagente Amplex® Red	41
6. A produção de peróxido de hidrogênio e efeito de apocinina e diapocinina.....	42
7. Curva dose/resposta para o efeito de apocinina e diapocinina na supressão de H ₂ O ₂	43
8. Produção de H ₂ O ₂ e efeito da apocinina e diapocinina em neutrófilos ativados por PMA	45
9. Curva dose/resposta para o efeito de apocinina e diapocinina na supressão de H ₂ O ₂ produzido por neutrófilos estimulados por PMA.....	46
10. Produção de H ₂ O ₂ e efeito da apocinina em neutrófilos ativados por zimosan.....	47
11. Curva dose/resposta para o efeito de apocinina e diapocinina na supressão de H ₂ O ₂ produzido por neutrófilos estimulados por zimosan opsonizado	48
12. Curva dose/resposta para o efeito de apocinina e diapocinina como inibidores da produção de HOCl por neutrófilos estimulados por zimosan opsonizado	50

1 INTRODUÇÃO

Os leucócitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) são importantes células do sistema inato de defesa imunológica do organismo animal. Para a eliminação de células patogênicas como fungos e bactérias, os neutrófilos utilizam o processo de fagocitose, mecanismos dependentes e independentes de oxigênio, no qual essas células são englobadas e em seguida mortas pela ação de ácido hipocloroso.

A produção de ácido hipocloroso é iniciada por um processo chamado *burst oxidativo* ou explosão oxidativa. Neste processo é ativado o complexo multienzimático NADPH oxidase, sendo este o responsável pela redução uni - eletrônica do oxigênio molecular ao radical livre, ânion superóxido. Após este processo é iniciada uma série de reações bioquímicas, que levam a geração de várias espécies reativas de oxigênio.

O complexo NADPH oxidase é formado por uma série de subunidades, tais como as proteínas citossólicas p47-phox e p67-phox, uma proteína G citossólica, denominada p21 rac, e um citocromo b558 ligado à membrana, sendo este constituído por uma subunidade protéica de 22 KD, p22phox, e uma subunidade de glicoproteína de 91 KD, gp91phox, ambas contendo o grupo heme. Alterações em quaisquer das subunidades podem provocar o funcionamento deficiente desta enzima e por conseqüência a deficiência na produção das espécies reativas de oxigênio.

Se por um lado a produção de espécies reativas é importante para defesa do organismo, sua superprodução pode causar danos ligados à progressão de inúmeras doenças ou lesões de cunho inflamatório e degenerativo tais como hipertensão, aterosclerose, diabetes, doenças renais crônicas, câncer entre outros. É este contexto

que explica a intensa busca, como se pode verificar na literatura científica, por substâncias naturais ou sintéticas que possam atuar na inibição da produção ou neutralização desses oxidantes. A substância de origem natural conhecida como apocinina se enquadra neste contexto, pois é considerada uma inibidora da ativação do complexo NADPH oxidase e por consequência, das espécies reativas de oxigênio. Uma das hipóteses para este efeito é que a apocinina deva ser convertida ao seu produto de oxidação dimérico conhecido como diapocinina por meio da ação do peróxido de hidrogênio e peroxidase presente nos neutrófilos.

É neste contexto que este trabalho se justifica, pois estudou-se a supressão de peróxido de hidrogênio gerado pelo sistema enzimático glicose/glicose oxidase e por neutrófilos ativados quando os mesmos foram incubados com apocinina e diapocinina. Adicionalmente estudou-se o efeito inibitório destas substâncias sobre a produção de ácido hipocloroso também gerados por neutrófilos ativados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leucócitos Polimorfonucleares Neutrófilos (PMN)

Os neutrófilos são células que fazem parte do sistema imunológico inato, compondo a primeira linha de defesa juntamente com células epiteliais, outros fagócitos, linfócitos Natural Killer (NK) e o sistema de complemento. Além de fornecer a defesa inicial contra infecções, as respostas da imunidade inata estimulam as respostas de linfócitos B e T, anticorpos e células T efetoras que compõe o sistema imunológico adquirido contra os agentes patogênicos que porventura ultrapassem a primeira linha de defesa. Os neutrófilos ou granulócitos são fagócitos, células de defesa capazes de englobar patógenos ou corpos estranhos, particularmente os causadores de infecções bacterianas e fúngicas (ABBAS, LICHMAN, 2007). Apresentam o núcleo segmentado, sendo também chamados de polimorfonucleares (PMN) e compõem cerca de 50 a 70% dos leucócitos ou células brancas do sangue. Os neutrófilos apresentam grânulos primários e secundários. Os grânulos primários (azurófilos) são compostos por enzimas digestivas, peroxidase neutrofílica, ou seja, mieloperoxidase (MPO), lisozima e outras enzimas hidrolíticas. Os grânulos secundários em menor quantidade são compostos por colagenase, lactoferrina e lisozima (SEGAL, 2005).

Em processos infecciosos a produção de neutrófilos a partir de células tronco da medula óssea é estimulada por citocinas conhecidas como fatores estimulantes de colônias (GM-CSF), que são produzidas por muitos tipos celulares em resposta às infecções. Os neutrófilos então migram para o sítio da infecção e se ligam às moléculas de adesão endotelial em resposta a estímulos quimioatrativos que são produzidos na presença dos patógenos (ABBAS, LICHMAN, 2007).

Na fagocitose, no sangue ou nos tecidos, os microorganismos são reconhecidos através de receptores específicos. Existem vários tipos de receptores específicos, como o Toll – Like receptor (TLR-2) usado na resposta de macrófagos a lipoglicanos bacterianos, o TLR-4 para o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS ou endotoxina), o TLR-5 para um componente do flagelo bacteriano, e o TLR-9 para os nucleotídeos CpG não metilados das bactérias. Os sinais gerados pela ligação dos receptores ativam um fator de transcrição que estimula a produção de citocinas, enzimas e outras proteínas envolvidas nas funções antimicrobianas dos fagócitos ativados. Além disso, as células fagocíticas expressam receptores para produtos da ativação do complemento e para anticorpos (ABBAS, LICHMAN, 2007). Quando os fagócitos reconhecem na membrana dos patógenos anticorpo ou componente de complemento apropriado, se ligará prontamente à membrana do fagócito, sendo este prontamente fagocitado. Sendo assim, os anticorpos e complementos funcionam como opsoninas, moléculas que se ligam no antígeno e também nos fagócitos, estimulando o processo de fagocitose, processo chamado de opsonização (GOLDSBY, KINDT, OSBORN, 2000). O fagócito então estende sua membrana plasmática em torno da partícula microbiana reconhecida, a membrana se fecha e a partícula é englobada em uma vesícula ligada à membrana chamada fagossomo. Concomitantemente com a ligação dos microorganismos aos receptores de fagócitos e sua ingestão, os receptores enviam sinais para a ativação de diversas enzimas no fagolisossomo (ABBAS, LICHMAN, 2007).

A eficiência da ação microbicida dos fagócitos depende de dois eventos:

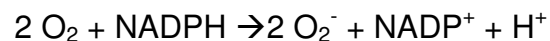
i) No processo metabólico dependente de oxigênio, são produzidas espécies reativas de oxigênio (EROs) através do estímulo de uma enzima chamada oxidase

fagocitária (NADPH oxidase) e que causam a explosão respiratória (*burst* oxidativo), processo este não dependente de mitocôndria.

ii) No processo metabólico não dependente de oxigênio, são liberadas enzimas contidas nos grânulos citoplasmáticos. Uma delas é chamada sintase do óxido nítrico induzido, que catalisa a conversão da arginina em óxido nítrico (NO), outra substância microbicida. Outras enzimas como as proteases lisossômicas quebram as proteínas microbianas (ABBAS, LICHMAN, 2007).

2.2 NADPH oxidase, burst oxidativo e espécies reativas de oxigênio

O *burst* oxidativo é o fenômeno resultante da ativação do complexo multienzimático NADPH oxidase, formado no interior das células fagocíticas e responsável pela redução unieletrônica de oxigênio molecular ao radical livre ânion superóxido (O_2^-) (BABIOR, 2008).



O complexo protéico NADPH oxidase é composto pela junção de vários constituintes na membrana citoplasmática em resposta a um sinal que ativa o neutrófilo. Dentre estes compostos estão as proteínas citossólicas de 47 KD, 67 KD, denominadas respectivamente p47-phox e p67-phox, uma proteína G citossólica, denominada p21 rac, e um citocromo b558 ligado à membrana, sendo este constituído por uma subunidade protéica de 22 KD, p22phox, e uma subunidade de glicoproteína de 91 KD, gp91phox, ambas contendo o grupo heme (ROSEN et al., 1999).

A subunidade gp-91 é uma flavoproteína que contém o sítio de ligação da NADPH oxidase, onde são transportados os elétrons para o oxigênio molecular, para a formação do radical superóxido. A subunidade p-47 é importante na ativação da oxidase, quando esta é fosforilada. Já a proteína G p21-rac é importante na estabilização do complexo (ROSEN et al., 1999).

Após a complexação do NADPH oxidase e a formação do radical ânion superóxido, iniciam uma série de outros eventos bioquímicos no fagossomo, levando à formação de outras espécies reativas de oxigênio (EROs), como demonstrado na Figura 1 (ROSEN et al., 1999).

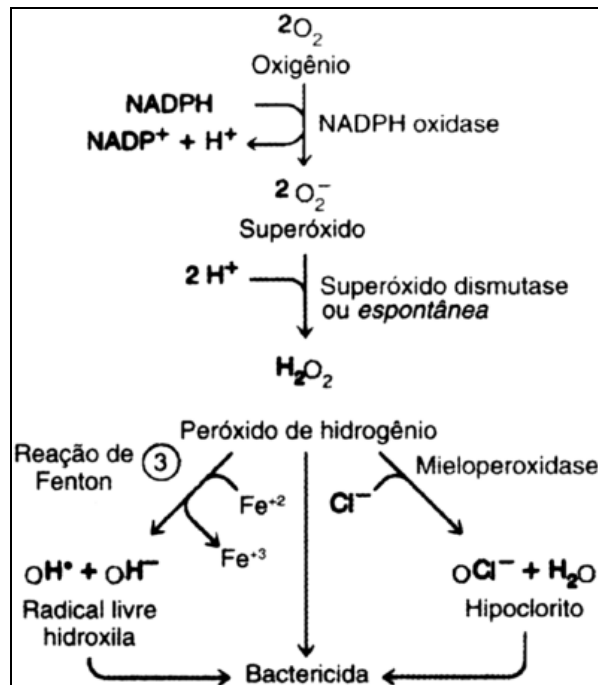


Figura 1. Mecanismo de Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (KLEBANOFF, 2005).

Radical superóxido (O₂⁻)

O radical superóxido O₂⁻ ou O₂⁻ é formado a partir primeira redução do O₂. Está presente na maioria das células aeróbicas, sendo produto da ativação de neutrófilos,

monócitos, macrófagos e eosinófilos, e que mesmo sendo pouco reativo, está associado a lesões biológicas (FERREIRA, MATSUBARA, 1997; VELLOSA, BARBOSA, OLIVEIRA, 2007).

Peróxido de hidrogênio.

Grande parte do oxigênio consumido pelo organismo é transformada em peróxido de hidrogênio pela dismutação do radical ânion superóxido espontaneamente ou pela ação de uma enzima chamada superóxido dismutase (SOD). Mesmo o peróxido de hidrogênio não sendo um radical livre, por não possuir elétrons desemparelhados na última camada, causa sérios danos ao organismo, por se reduzir no radical hidroxil. Além disso, por ter vida longa, o H_2O_2 tem a capacidade de atravessar as camadas lipídicas, reagindo com componentes de membrana e proteínas ligadas ao Fe^{++} (VELLOSA, BARBOSA, OLIVEIRA, 2007), sendo que em presença de ferro sua toxicidade é aumentada em cem vezes (FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

Ácido hipocloroso.

A formação do HOCl acontece pela oxidação de íons cloreto, catalisada por uma peroxidase chamada mieloperoxidase na presença de peróxido de hidrogênio. O HOCl é considerado o mais abundante oxidante gerado por leucócitos sendo um oxidante extremamente forte, atacando biomoléculas de importância fisiológica, tais como tióis, tioéteres, aminas, aminoácidos, nucleotídeos e ascorbato. A partir do HOCl são geradas outras EROs como: oxigênio singlete e radical hidroxil respectivamente por reação com peróxido de hidrogênio e ânion superóxido. O HOCl apresenta duas ações bem distintas, protegendo o organismo participando do processo de destruição de

microorganismos, porém em consequência, agride os tecidos, pois nem células de mamíferos nem de bactérias podem detoxicar o HOCl por via catalítica, visto que estão ausentes defesas enzimáticas contra oxidantes clorados (VELLOSA, BARBOSA, OLIVEIRA, 2007).

Oxigênio Singlete

O oxigênio singlete é o oxigênio em seu estado excitado, mesmo não sendo um radical por não ter os elétrons desemparelhados, reage com uma grande variedade de compostos biológicos, como componentes de membrana. Sua produção ocorre através da reação do H_2O_2 com HOCl ou pela dismutação espontânea do $O_2^{\cdot-}$ (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1990).

Radical hidroxila (HO^{\cdot})

O radical hidroxila é um dos mais reativos radicais conhecidos. Obtido a partir da reação do HOCl e $O_2^{\cdot-}$ ou pelas reações de Fenton e Harber-Weiss. Sua complexação extremamente rápida com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirmam sua alta reatividade. A alta reatividade do radical hidroxil causa sérios danos ao organismo como no caso de ser produzido próximo ao DNA e a este DNA estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases nitrogenadas, levando à inativação ou mutação do DNA. Além disso, poderá ocorrer inativação de várias proteínas pela oxidação dos grupos sulfidrílicos formando pontes dissulfeto e iniciação da oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares processo chamado lipoperoxidação (VELLOOSA, BARBOSA, OLIVEIRA, 2007).

Óxido Nítrico (NO[•]) e Peróxinitrito (OONO⁻)

O óxido nítrico é um radical gasoso lipossolúvel e hidrossolúvel, faz parte das espécies reativas de nitrogênio que, em meio aquoso, reage com o oxigênio para formar outras espécies reativas. O peróxinitrito é produto formado pela reação do O₂^{•-} com o óxido nítrico (NO[•]) que reage com íon H⁺ formando ONOOH que após se decompõe em HO[•] e radical dióxido de nitrogênio (NO₂[•]). O óxido nítrico e o peróxinitrito são formados no meio biológico a partir da ativação catalítica da enzima óxido nítrico sintase (NOS). A produção de óxido nítrico se dá quando a NOS oxida uma molécula de L-arginina em óxido nítrico e L-citrulina. São encontrados dois tipos de NOS, a constitutiva, de baixa atividade, presente no endotélio vascular e sistema nervoso central responsável por baixa produção de óxido nítrico como molécula sinalizadora; e a indutiva, que possui alta atividade e é produzida por fagócitos quando estes são estimulados (VELLOOSA, BARBOSA, OLIVEIRA, 2007).

Radical hidroperoxila (HO₂[•])

O radical hidroperoxil é a forma protonada do radical superóxido. Sendo este mais reativo que o radical superóxido por ter maior facilidade de iniciar o processo de destruição dos componentes de membrana (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1990).

2.3 Mieloperoxidase

A mieloperoxidase faz parte da família das peroxidases humanas que inclui também a peroxidase eosinofílica (EPO), lactoperoxidase (LPO), peroxidase salivar

(SPO), peroxidase da tireóide (TPO) e a prostaglandina endoperóxido sintase (PGHS) (VELLOOSA, BARBOSA, OLIVEIRA, 2007). As peroxidases são uma classe de enzimas capazes de catalisar reações químicas utilizando peróxido de hidrogênio como co-substrato. Inicialmente foi chamada de verdoperoxidase devido a sua intensa coloração esverdeada. Sua presença foi sugerida em estudos citoquímicos de 1900, como sendo um tipo de peroxidase presente nos grânulos citoplasmáticos de granulócitos maduros, e estudos subseqüentes indicaram a sua presença inteiramente nos grânulos (preliminares) do azurófilo destas células (KLEBANOFF, 2005).

A síntese da MPO é iniciada no estágio promielócito do desenvolvimento dos neutrófilos, representando 5% do seu peso, e termina no começo do estágio do mielócito. Na qual a MPO contida nos grânulos azurófilos são distribuídos às células jovens, e se misturam com a recém formada peroxidase negativa nos grânulos específicos (secundários) (KLEBANOFF, 2005), sendo posteriormente secretada no meio extracelular e fagolisossomal (VELLOOSA, BARBOSA, OLIVEIRA, 2007). A MPO é uma hemeproteína glicosilada catiônica de aproximadamente 144 KDa, constituída por duas cadeias idênticas unidas por ponte dissulfeto, onde cada subunidade apresenta uma cadeia leve e uma cadeia pesada. Cada subunidade apresenta um grupamento heme que funciona independente na oxidação de íons cloreto. O grupo heme da MPO apresenta uma particularidade em relação às outras peroxidases. A ligação covalente da protoporfirina IX com o resíduo da metionina 243 (Met243) e com Glu408 e Asp260 apresentam uma distorção. Em pH ácido a ligação à histidina distal (His95) é liberada e o grupo heme torna-se menos distorcido, facilitando a ligação de íons cloreto (KLEBANOFF, 2005).

A MPO compõe o sistema peróxido de hidrogênio-MPO-haleto sistema mais importante e eficiente de ação antimicrobiana. Quando o neutrófilo sintetiza peróxido de hidrogênio pela ação da enzima superóxido desmutase (SOD) a partir de duas moléculas de superóxido. A MPO converte o peróxido de hidrogênio em presença de uma hialida como o cloreto (Cl^-) em HOCl^- , sendo este um poderosíssimo oxidante. O HOCl^- mata a bactéria oxidando sua membrana plasmática e criando ligações moleculares prejudiciais (HAMPTON, KETTLE, WINTERBOURN, 1998).

O mecanismo de ação da MPO (Figura 2) é iniciado com a reação na sua forma férrica com H_2O_2 formado um intermediário redox, composto I (MPO I) que pode oxidar íons como Cl^- , Br^- e I^- e outros substratos. A oxidação de outros radicais, como fenóis, envolve os intermediários MPO I e MPO II através de transferências constantes de elétrons. A MPO- Fe^{III} reage de maneira reversível com o H_2O_2 formando a MPO I, que oxida haletos através de uma transferência sucessiva de dois elétrons, formando seus respectivos ácidos. A MPO nativa ainda pode reagir sendo reduzida gerando um intermediário inativo, a MPO- Fe^{II} . Este quando ligado a oxigênio forma o composto III, que também pode ser formado pela ligação do ânion superóxido a MPO nativa (HAMPTON, KETTLE, WINTERBOURN, 1998).

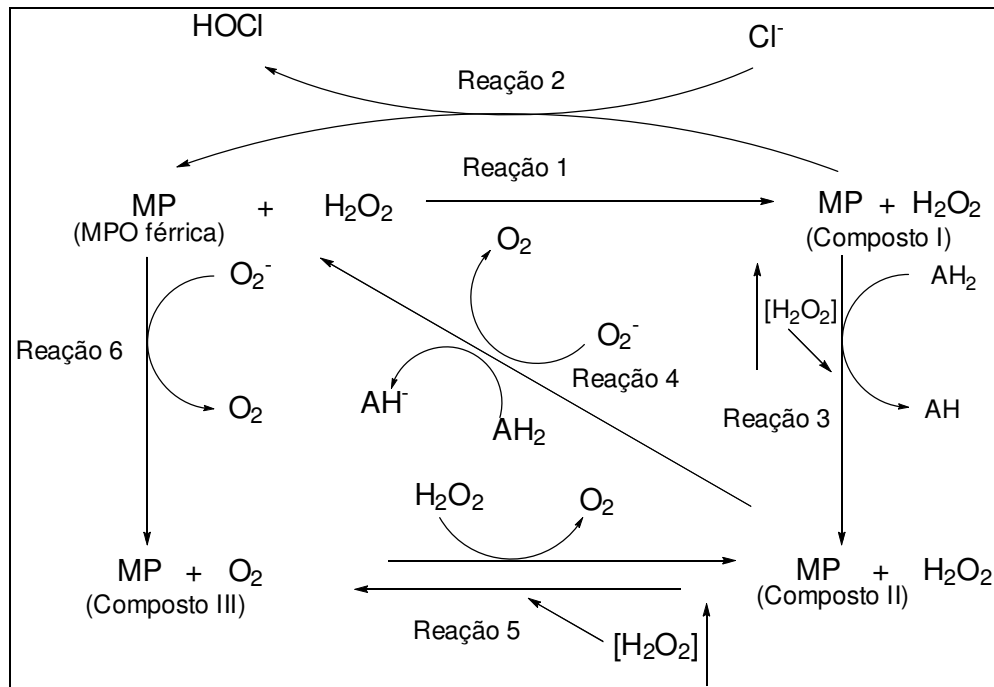


Figura 2: Mecanismo das reações envolvendo mieloperoxidase (Morales, Roche, Sánchez, 1998).

2.4 O papel fisiológico e patológico do complexo NADPH oxidase

Qualquer alteração genética nas proteínas que compõem o sistema NADPH oxidase, tais como na gp91-phox, p22-phox, p47-phox ou p67-phox, causa falha no sistema de transporte de elétrons, que levam ao fenótipo da Doença Granulomatosa Crônica (DGC), onde o portador fica vulnerável a infecções, já que seu organismo não é capaz de produzir HOCl (LEUSEN, VERHOEVEN, 1998). A forma mais comum da DGC é causada por um defeito na gp91-phox, tendo padrão hereditário ligado ao cromossomo X (X-DGC, 56%), seguida pelas formas autossômicas recessivas por alteração na p47-phox (A47-DGC, 30%), p22-phox (A22-DGC, 5 a 7%) e p67-phox (A67-DGC, 5 a 7%). Sua incidência é de aproximadamente 1: 250.000 nascidos vivos.

Clinicamente, manifesta-se em crianças, pois na sua grande maioria não chegam à fase adulta, caracterizada por freqüentes infecções causadas por microorganismos catalase positiva, principalmente *Staphylococcus aureus*, além de gram negativas e *Aspergillus*, entre outros que comprometem freqüentemente a pele, pulmões, fígado, baço e ossos (WINKELSTEIN et al., 2000). O diagnóstico da DGC é estabelecido do sexo masculino ou feminino com teste do nitroblue tetrazolium (NBT) ou burst respiratório de neutrófilos alterados e que apresentem mutação nas proteínas do complexo NADPH ou teste de NBT alterado para mãe, primos, tios ou sobrinhos diz o Grupo Pan-Americano de Estudo em Imunodeficiências Primárias (PAGID) (CONLEY, 1999).

Se por um lado a produção de EROs é absolutamente essencial nos mecanismos de defesa imunológico, a produção exacerbada e desregulada do mesmo está, por outro lado, totalmente ligada à gênese e/ou progressão de inúmeras doenças de cunho inflamatório e degenerativo. A formação em excesso de EROs, ou mecanismos deficientes para neutralização dos mesmos, recebe o nome de estresse oxidativo. Um desequilíbrio elevando a produção de EROs pode implicar em várias patologias como a hipertensão, aterosclerose, diabetes e doenças renais crônicas, já que influenciam em muitos processos fisiológicos, sendo estes de defesa, biosíntese hormonal, fertilização, sinalização celular e inclusive a causa de danos a biomoléculas como DNA, lipídios, proteínas e carboidratos.

Todas as células do corpo estão suscetíveis à ação das EROs, sendo que a membrana celular é um dos mais atingidos pela peroxidação lipídica, que causa alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Conseqüentemente, acarretando a perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, chegando até a morte celular. A lipoperoxidação também pode

estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade. Porém sabe-se que a lipoperoxidação nem sempre é prejudicial, pois os produtos de reação em cascata do ácido aracdônico para a formação de prostaglandinas são importantes na resposta inflamatória, mas que em excesso se tornam lesivos. Nas doenças pulmonares a produção exacerbada de EROs é tratada com suma importância, pois podem causar enfisema, displasia broncopulmonar, pneumoconiose, asma e a síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA). Sendo que na SARA, estudos mostram que a chegada de neutrófilos excitados no interstício pulmonar, gera grande quantidade de EROs, que lesa diretamente a membrana das células intersticiais e do endotélio, causando lesão pulmonar por edemas, atelectasia, depósitos de fibrina, enrijecimento arteriolar, hiperplasia e hipertrofia alveolar (FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

Doenças cardíacas como a aterosclerose, trombose ou inflamações nos vasos sanguíneos podem ser causadas por uma grande produção de EROs, uma vez que o endotélio possui propriedades anti-inflamatórias naturais e promove a vasodilatação através da produção de óxido nítrico (NO), prostaciclina e outros vasodilatadores, a produção exacerbada das espécies reativas de oxigênio torna o endotélio disfuncional, levando a promoção de trombose, inflamações e perda de vasodilatação. A superprodução de EROs altera a produção de NO, aumentando a expressão gênica de mecanismo pró-coagulantes. Disfunções do endotélio têm sido demonstradas como precursoras de doenças vasculares mais sérias como a aterosclerose (GUZIK, HARRISON, 2006). A aterosclerose ainda possui origem incerta, porém acredita-se que tenha a lesão origina-se por um mecanismo hemodinâmico. Em ocasiões onde os macrófagos são ativados, liberam radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e

enzimas hidrolíticas, que por sua vez causam lesões celulares e estimula a proliferação de músculo liso subendotelial. Se esta produção for exacerbada catalisa a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), e é esta oxidação que estimula a internalização de partículas de colesterol nos macrófagos, que por sua vez são convertidos em células esponjosas, que contribuem para formação de ateroma (FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

Doenças relacionadas à velhice como doenças de Parkinson, Alzheimer, esclerose múltipla entre outras são relacionadas ao estresse oxidativo, porém ainda não se tem certeza se estas doenças são causa ou consequência da produção em excesso de EROs.

2.5 Mecanismos de defesa antioxidantes

No organismo estão presentes dois sistemas antioxidantes naturais de eliminação de Radicais Livres. Tanto o sistema enzimático ou o não-enzimático, previnem a produção ou a eliminação ou ainda impedem a transformação em produtos mais tóxicos para as células. Algumas enzimas que compõem esses sistemas enzimáticos são: Glutathione Peroxidase (que necessita do Selênio), Catalase, Metionina Redutase e Superóxido Dismutase (as duas principais necessitam de Zinco e Cobre, e Manganês), que combatem no organismo os seguintes Radicais Livres: Peróxido de Hidrogênio, Superóxido, Oxigênio Singlete, Íon Hidroxila, Óxido Nítrico e Óxido Nitroso.

Os Antioxidantes não enzimáticos na sua grande maioria são exógenos, ou seja, necessitam ser absorvidos pela alimentação. Os principais podem ser vitaminas

lipossolúveis como a vitamina A, vitamina E, e o beta-caroteno, e vitaminas hidrossolúveis como a vitamina C e vitaminas do complexo B, e os oligoelementos como zinco, cobre, selênio, magnésio. Além dos antioxidantes não enzimáticos mais comuns, existem outros compostos que auxiliam na defesa contra as espécies reativas de oxigênio nos sistemas biológicos como a ubiquinona, a ceruloplasmina, o ácido úrico, a taurina, os flavonóides e outros compostos fenólicos de origem vegetal (KUSS, 2005). Dentre esses compostos esta a apocinina que é a droga estudada neste trabalho.

2.6 Apocinina

A apocinina ou acetovanilona são os nomes comuns da molécula 4-hidroxi- 3-metoxi-acetofenona, uma acetofenona de peso molecular de 166,17 g/mol e que após a recristalização fica disposta em formas de agulhas. Descrita pela primeira vez por Schmiedeberg em 1883 isolada das raízes do cânhamo canadenses (*Apocynum cannabinum*) (STEFANSKA, PAWLIEZAK, 2008). Foi identificada também isolada nas raízes da *Picrorhiza kurroa*, planta rasteira nativa existente nas montanhas asiáticas da Índia, Nepal, Tibet e Paquistão (WIND, 2006). A medicina Ayurveda tem sido usada para tratar doenças hepáticas, distúrbios do trato respiratório superior, diarreia crônica, hemorróidas, epilepsia, e febre. A *Picrorhiza kurroa* contém vários princípios ativos, incluindo acetofenona derivados que possuem propriedades antiasmáticas, kutkin com propriedades hepato-protetoras e o cuucibitancins com propriedades antitumorais. Sendo a apocinina um polifenol possui propriedades de ação biológicas semelhantes,

como o poderoso poder antiinflamatório e antioxidante exercendo sua ação sobre uma grande variedade de células e modelos animais (WANG et al., 2008).

Seu poder antioxidante está relacionado à eficiente inibição do complexo NADPH oxidase, demonstrado em inúmeros modelos experimentais com células fagocíticas e não fagocíticas. O mecanismo de inibição ainda não é todo conhecido, porém envolve a translocação do componente citossólico p47-phox do complexo NADPH oxidase para a membrana. Sendo que há relato importante dizendo que a apocinina é convertida por peroxidases através de sua oxidação em um dímero, que se mostrou ser mais eficiente que a própria apocinina. Como a apocinina é um inibidor seletivo da atividade NADPH oxidase e concomitantemente da produção de EROs em neutrófilos humanos ativados, apresentando sempre uma defasagem no tempo de ação. A apocinina atua impedindo a translocação de p47-phox para Nox2 em leucócitos, monócitos e células endoteliais. Sendo que nas células endoteliais o processo parece envolver MPO, porque a apocinina não inibe o complexo NADPH oxidase em células desprovidas ou deficientes de MPO, neste caso, agentes como o zimosan que promovem a liberação de MPO auxiliam na eficácia da apocinina (STEFANSKA, PAWLIEZAK, 2008).

Relatos sugerem que o mecanismo de ação da apocinina como inibidor do complexo NADPH oxidase requer ativação por MPO. Acredita-se que a apocinina é ativada por H_2O_2 e MPO para formar um radical apocinina que em seguida, oxida tióis do complexo NADPH oxidase. Como os tióis são estritamente necessários para o funcionamento do p47-phox, agentes oxidantes como a apocinina têm sido mostrados capazes de bloquear a ativação do complexo NADPH oxidase. Em consequência, observou-se que a suplementação de tióis com glutathiona cisteína, por exemplo,

impede que o efeito inibitório da apocinina sobre o complexo NADPH oxidase (STEFANSKA, PAWLIEZAK, 2008).

Outras indicações tentam explicar uma explicação alternativa para a defasagem de tempo no efeito inibitório da apocinina relatando que através da formação do radical apocinina é formado um dímero e que na verdade seria apenas o dímero ativo que inibiria a atividade do complexo NADPH oxidase (STEFANSKA, PAWLIEZAK, 2008). Uma vez que há indícios de que a apocinina pode ser convertido para diapocinina através peroxidases como, por exemplo, mieloperoxidase (XIMENES et al., 2007), não se sabe ao certo se o efeito inibitório da apocinina é devido ao seu metabolito ou ambos (WANG et al., 2008).

3 OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivo comparar a apocinina com a diapocinina purificada a respeito de seus efeitos como supressor de peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso gerado por glicose/glicose oxidase e mieloperoxidase respectivamente, e como inibidores da produção de peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso por neutrófilos ativados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Compostos químicos e solventes

Amplex Red (Amplex[®] Red Reagent) foi adquirido da Invitrogen (Oregon, USA), Acetato de Forbol Miristato (PMA), Dimetilsulfoxido (DMSO), apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona), o seu dímero (1,1'-(6,6'-dihidroxi-5,5'-dimetoxi-1,1'-bifenil-3,3'-diil) dietanona), Glicose Oxidase, HRP, Zimosan, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidine (TMB), dimetilformamida (DMF) e taurina foram obtidos da Sigma-Aldrich (CA, USA). Peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso foram obtido da Merck (Darmstadt, Germany).

Os sais utilizados na preparação de tampões foram de grau analítico e solventes utilizados na preparação de fases móveis foram de grau cromatográfico.

4.1.2 Equipamentos

Balança analítica e semi-analítica METTLER TOLED, banho-maria Kacil, Estufa de incubação de CO₂ (Thermo Eletrocorporation) REVCO, detector de fluorescência Spectramax M2 (Molecular Devices), centrífuga Marconi (modelo MA 860) e centrífuga Heraeus (modelo Labofuge 400 R), agitador de tubos Marconi (modelo MA 162), microscópio óptico Carl Zeiss Jena.

4.1.3 Leucócitos humanos

Os neutrófilos foram isolados de sangue humano periférico de voluntários sadios.

4.2 Métodos

4.2.1 Soluções Estoque e Tampões

4.2.1.1 Tampão PBS e Tampão PBS suplementado

O tampão fosfato pH 7.4 isotônico ao meio celular (phosphate buffered saline, PBS) foi preparado diluindo as seguintes massas de sais: 8,0 g de NaCl, 1,15 g de Na₂HPO₄, 0,2 g de KCl, 0,2 g de KH₂PO₄ diluídos em 1,0 L de água destilada.

Para as reações conduzidas com células, o tampão PBS foi suplementado com glicose 50 mmol, MgCl₂ 0,5 mmol e CaCl₂ 1,0 mmol.

4.2.1.2 Solução de Amplex[®] Red

A solução estoque 0,1 M de Amplex[®] Red foi preparada pela dissolução da massa de 5 mg de Amplex[®] Red em DMSO, alíquotada e mantida em freezer. No momento de uso a solução foi diluída em PBS para 0,5 mM em PBS.

4.1.2.3 Solução de PMA

A solução estoque 1,6 mM de PMA foi preparado pela dissolução de todo o conteúdo do frasco comercial (1mg) em 1mL de DMSO, alíquotada e mantida em freezer. No momento de uso a solução foi diluída para $1,6 \cdot 10^{-2}$ mmol em PBS e utilizada imediatamente. Observações: i) Como o PMA é um composto químico que se degrada rapidamente ao entrar em contato com o meio aquoso, sua dissolução deve

ser realizada apenas no exato momento de sua adição ao meio celular. ii) Por tratar-se de reagente altamente cancerígeno, utilizou-se os devidos EPI's.

4.1.2.4 Solução de HRP

A solução estoque de 10 u/mL de HRP foi preparada pela dissolução da massa adequada em água e mantida sob refrigeração.

4.1.2.5 Solução de H₂O₂

A solução estoque de peróxido de hidrogênio foi preparada pela diluição da solução comercial e sua concentração medida por meio do seu coeficiente de absorvidade molar ($\epsilon_{240\text{nm}} = 43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

4.1.2.6 Solução de HClO

A solução estoque de ácido hipocloroso foi preparada pela dissolução da solução comercial e sua concentração foi medida pelo através do seu coeficiente de absorvidade molar ($\epsilon_{292\text{nm}} = 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

4.1.2.7 Solução de Alséver

A solução de Alséver usada como anticoagulante foi preparada usando 8,0 g de citrato trissódico. ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 4,2 g de cloreto de sódio (NaCl) e 20,5 g de

glicose ($C_6H_{12}O_6$). Esses reagentes foram diluídos em 1,0 L de água destilada e o pH ajustado para 6,1 utilizando-se para isso ácido cítrico 10% (m/v).

4.1.2.8 Solução de Apocinina e Diapocinina

A solução estoque de apocinina 1 M teve a sua massa diluída em etanol e no momento do uso a mesma foi diluída em água destilada para atingir as concentrações desejadas.

No preparo da solução estoque do dímero da apocinina adicionou-se à massa adequada, aproximadamente 100 μ L de NaOH 0,1 M e o volume foi completado com água destilada. Este procedimento se fez necessário, pois a substância é solúvel apenas em pH alcalino.

4.1.2.9 Solução de Zimosan opsonizado

O preparo do zimosan opsonizado deu-se da seguinte maneira: 20 mg de zimosan foi suspenso em aproximadamente 10 mL de salina (solução de NaCl 0,9%) e levada ao banho-maria fervente por 30 minutos. A solução obtida foi centrifugada a 372 G durante 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado obtido foi ressuspenso em 10 mL de salina. Duas alíquotas foram separadas e armazenadas sob refrigeração. No momento do uso uma alíquota foi centrifugada a 372 G durante 5 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspenso em 1,0 mL de solução de soro sangüíneo (o soro sangüíneo foi separado após coleta de sangue

venoso em tubo sem anticoagulante, sendo então feito um pool com soro de vários doadores e no momento do uso foi diluído 1:2 em tampão PBS). A solução de zimosan com soro foi mantida em banho-maria por 30 minutos. Em seguida, centrifugado a 663 G por 5 minutos. O sedimento obtido foi lavado duas vezes com PBS sendo centrifugado a 663 G durante 5 minutos. Por fim, ressuspenso em 1,0 mL de PBS. A solução final obtida tem concentração 10 mg/mL e no instante do uso foi diluída 10 vezes (1mg/mL)

4.1.2.10 Suspensão de Neutrófilos

Para o preparo da suspensão de neutrófilos foi coletado 20 mL de sangue total por punção venosa e adicionado solução de alsever utilizada como anticoagulante, volume a volume. O sangue com solução de alsever foi centrifugado a 372 G por 10 min a 20° C. O sobrenadante com o plasma foi desprezado. Ao pellet celular foi adicionado uma solução de gelatina 2,5% em NaCl 0,15 M com volume proporcional a duas vezes o volume das células. Esta solução foi incubada em banho-maria a 37° C durante 30 minutos. O sobrenadante obtido contendo os granulócitos foi devidamente separado do precipitado e acrescido de uma solução de NaCl 0,15 M. Centrifugou-se a 165 G por 10 minutos a 20° C. Desprezou-se o sobrenadante e acresceu-se uma solução de NH₄Cl 0,83%. Isso se faz necessário para lisar hemácias remanescentes. Durante 5 minutos esta solução foi mantida em repouso e em seguida foi centrifugada a 165 G por 10 minutos a 20°C. Desprezou-se o sobrenadante e lavou-se o pellet celular obtido novamente com NaCl 0,15M por duas vezes. Esta última lavagem é imprescindível para remover os resíduos de NH₄Cl. Por fim, os granulócitos obtidos

foram ressuspensos em PBS suplementado e gelatina 0,1% para não grumarem. Após a separação, os neutrófilos foram contados em microscópio óptico, em câmara de NEUBAUER, em uma solução de 380 μ L de Solução de Lazarus e 20 μ L.

4.1.2.11 Solução de glicose oxidase

A solução estoque de glicose oxidase foi preparada diluindo o conteúdo do frasco original com concentração de 10.000 u/mL, para 100 u/mL, em PBS. No momento do uso esta solução foi diluída 100 vezes para atingir a concentração final de 1 u/mL.

4.1.2.12 Solução de TMB

O tetrametilbenzidina (TMB) 14 mM foi preparado dissolvendo a massa adequada em 50% de DMF e 50% de ácido acético 0,8M, sendo o DMF adicionado primeiro. Por fim, 100 μ M de iodeto de potássio foi adicionado à solução de TMB já na concentração de 14 mM.

4.1.1.13 Solução de Taurina

A taurina 5 mM foi preparada pesando-se a massa adequada e diluindo em PBS suplementado.

4.2.2 Preparo de Reações

4.2.2.1 Curvas de calibração

4.2.2.1.1 Curva de calibração de H₂O₂

A curva de calibração de peróxido de hidrogênio foi feita em micro-placa opaca, com volume final de reação de 300 µL. Foram utilizados volumes de peróxido de hidrogênio de 0 a 30 µL de uma solução 3 mM, 10µL de HRP 10 u/mL e 30 µL de Amplex Red 0,5 mM, completando o volume final com PBS. Depois de ser preparada a reação foi encubada por 5 minutos a 37°C e feita à leitura em ponto final (λ_{exc} 590nm/ λ_{em} 645nm) no leitor de placas Spectramax M2 Molecular Devices. Com os valores de obtidos de fluorescência e as concentrações de peróxido de hidrogênio foi plotado o gráfico da curva analítica.

4.2.2.1.2 Curva Analítica para Quantificação de Ácido Hipocloroso

A curva de analítica foi obtida adicionando 10 µL de soluções com concentrações conhecidas de ácido hipocloroso sobre 190 µL de uma solução 5 mM de taurina, em tampão fosfato (PBS) suplementado. Disparou-se a reação pela adição de 10 µL de uma solução 50 µL de TMB. As reações foram realizadas em microplacas transparentes e o volume final foi de 250 µL. Após cinco minutos de incubação a 37°C a absorbância foi medida em comprimento de onda de 655 nm no leitor de placas Spectramax M2 Molecular Devices. Com os valores de obtidos de absorbância e as concentrações de HOCl foi plotado o gráfico da curva analítica.

4.2.2.1 Reação para Determinação da Produção de Peróxido de Hidrogênio por Oxidação Enzimática da Glicose na presença de Glicose-Oxidase

Em tampão PBS foram adicionados 30 μL de Amplex Red 0,5 mM, 10 μL de HRP 10 u/mL, 10 μL de glicose 150 mM e 10 μL de glicose-oxidase 10 u/mL na presença ou ausência de concentrações variadas dos compostos a serem avaliados como inibidores. O meio de reação foi pré-incubado por 10 minutos a 37°C. As reações foram realizadas em microplacas opacas em um volume final de 300 μL . A produção de peróxido de hidrogênio foi monitorada durante 30min pela fluorescência emitida pela oxidação do Amplex Red (λ_{exc} 590nm/ λ_{em} 645nm), utilizando um fluorímetro adaptado para leitura em microplacas Spectramax M2 Molecular Devices. O cálculo da inibição na produção de peróxido de hidrogênio foi realizado tomando como base o controle positivo na ausência de inibidores.

4.2.2.2 Reação para Determinação da Produção de Peróxido de Hidrogênio por Neutrófilos Ativados

Em PBS suplementado foram adicionados 100 μL de células à 3.3×10^6 células/mL, 10 μL de HRP 10 u/mL e 30 μL de Amplex Red 0,5 mM na presença ou ausência de concentrações variadas dos compostos a serem avaliados como inibidores. O meio de reação foi pré-incubado por 10 minutos a 37°C e então adicionado os estímulos nas concentrações finais de 10^{-7}M PMA ou 1,0 mg/mL zimosan opsonizado. As reações foram realizadas em microplacas (opacas e de cor preta) de 96 poços em

um volume final de 300 μL . A produção de peróxido de hidrogênio foi monitorada durante 30min pela fluorescência emitida pela oxidação do Amplex Red (λ_{exc} 590nm/ λ_{em} 645nm), utilizando um fluorímetro adaptado para leitura em microplacas Spectramax M2 Molecular Devices. O cálculo da inibição na produção de peróxido de hidrogênio foi realizado tomando como base o controle positivo na ausência de inibidores.

4.2.2.3 Determinação da produção de ácido hipocloroso por neutrófilos ativados

As reações foram feitas em eppendorf com volume final de 300 μL . Os neutrófilos ($2 \times 10^6/\text{mL}$) foram incubados em PBS suplementado com taurina por 10 minutos a 37°C na presença ou ausência de concentrações variadas dos compostos a serem avaliados como inibidores. Na seqüência foram estimulados com 10^{-7}M PMA e novamente incubados por 10 minutos a 37°C. Durante este período os eppendorfs com as reações foram levemente agitados a cada 5 minutos. Após a incubação, adicionou-se 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de catalase e os eppendorfs foram colocados no gelo. Este procedimento se faz necessário para cessar a de produção de HOCl. Os eppendorfs foram centrifugados durante cinco minutos a 2744 G. Do sobrenadante obtido, 200 μL foram colocados na placa de reação e 50 μL de TMB 14 mM foram adicionados. Após 5 minutos foi feita a leitura de absorbância a 655 nm. Através da curva analítica a concentração de HOCl produzido pelas células foi determinada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Curvas de calibração

5.1.1 Curva analítica para quantificação de H_2O_2

Para a determinação quantitativa de H_2O_2 foi traçada uma curva analítica através de solução de concentração conhecida de H_2O_2 (Figura 3). Através da equação da reta foram calculadas as concentrações de H_2O_2 produzidas nas reações de glicose/glicose oxidase e por neutrófilos ativados.

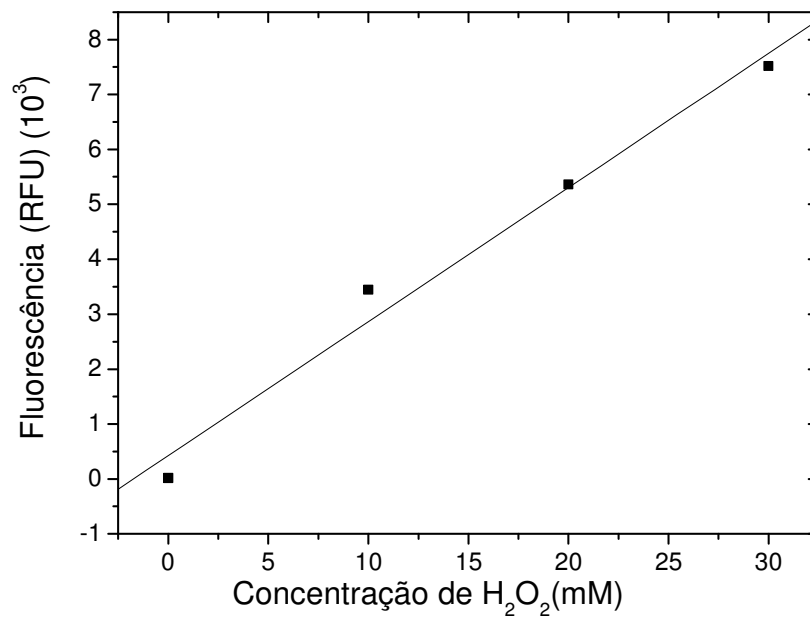


Figura 3. Curva de calibração para determinação de H_2O_2 . Condições de reação: Amplex Red 0,05 mM, HRP 0,033 u/mL e volume final de 300 μ L em PBS.

5.1.2 Curva analítica para quantificação de ácido hipocloroso

Para a determinação quantitativa de HOCl foi traçada uma curva analítica através de solução de concentração conhecida de HOCl (Figura 4). Através da equação da reta foram calculadas as concentrações de HOCl produzido por neutrófilos ativados.

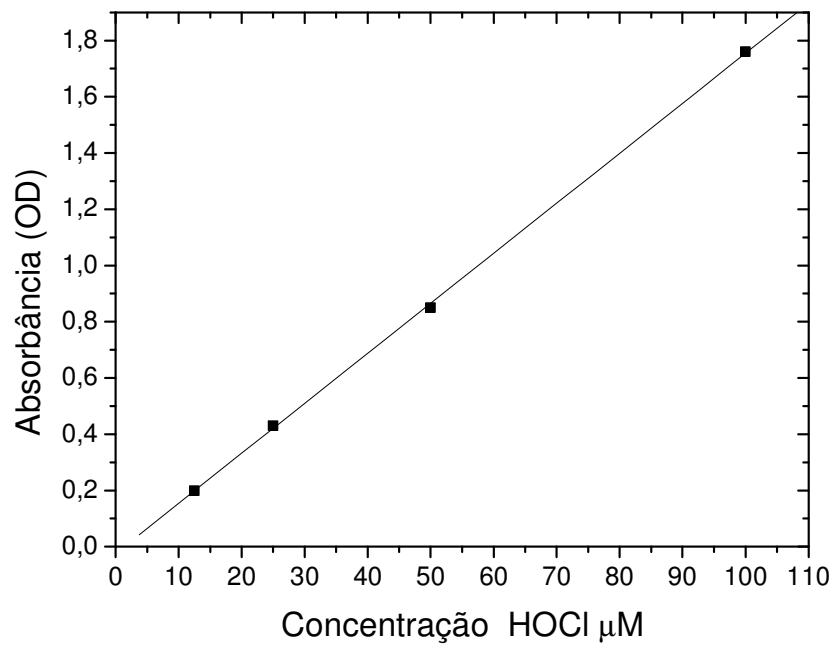


Figura 4. Curva de calibração para determinação de HOCl. Condições de reação: TMB 3,5 mM, taurina 5 mM, 37°C e volume final de 250 μL .

5.2 Determinação da Produção de Peróxido de Hidrogênio por Oxidação Enzimática da Glicose na presença de Glicose-Oxidase

A produção de H_2O_2 foi realizada pela oxidação de glicose através da ação catalítica de glicose oxidase. A glicose oxidase é uma enzima que catalisa a oxidação da β -D-Glicose. A reação tem como produtos finais o peróxido de hidrogênio e o ácido glicurônico (ZHOU, DIWU, 1997). Para a detecção da concentração de H_2O_2 foi utilizado o reagente Amplex[®] Red, um substrato incolor que reage com H_2O_2 em uma estequiometria de 1:1, produzindo um composto altamente fluorescente chamado resorufina, através da reação demonstrada na figura 5.

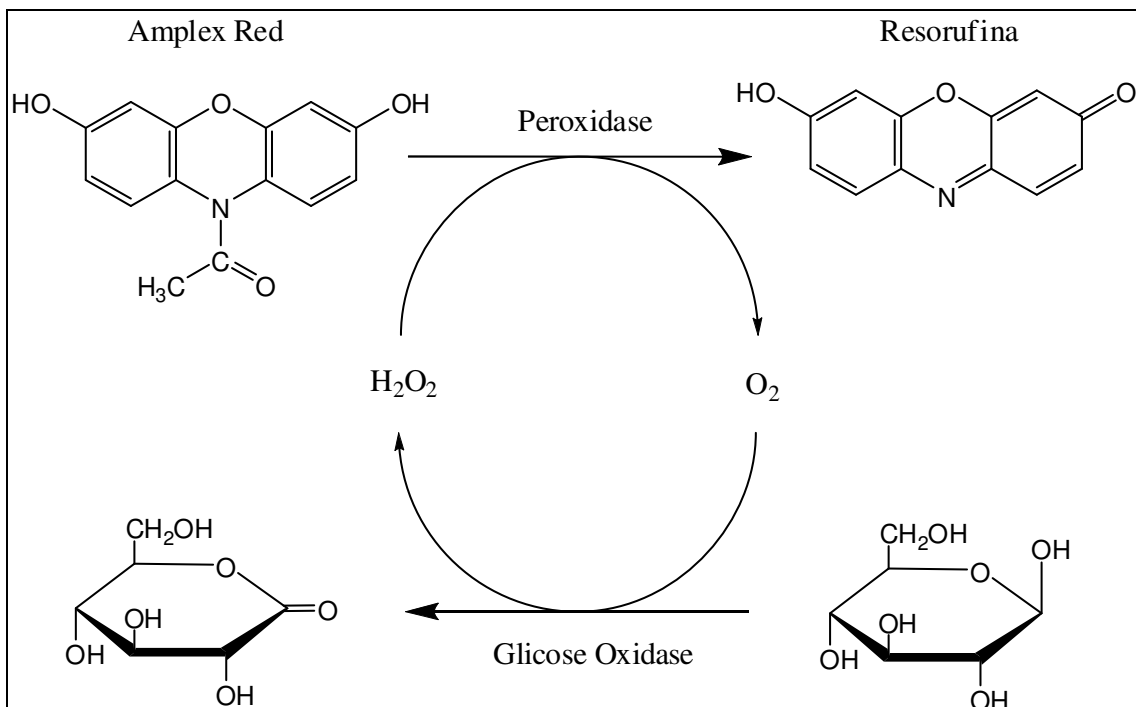


Figura 5. Princípio da reação utilizada para determinação de H_2O_2 utilizando o reagente Amplex[®] Red, e a produção de H_2O_2 a partir da oxidação da glicose catalisada pela enzima glicose oxidase.

A partir da geração de glicose/glicose oxidase para a produção de H_2O_2 , estudou-se o efeito da apocinina e da diapocinina como redutores deste oxidante. A Figura 6 mostra o perfil cinético da produção de H_2O_2 e o efeito da apocinina e diapocinina.

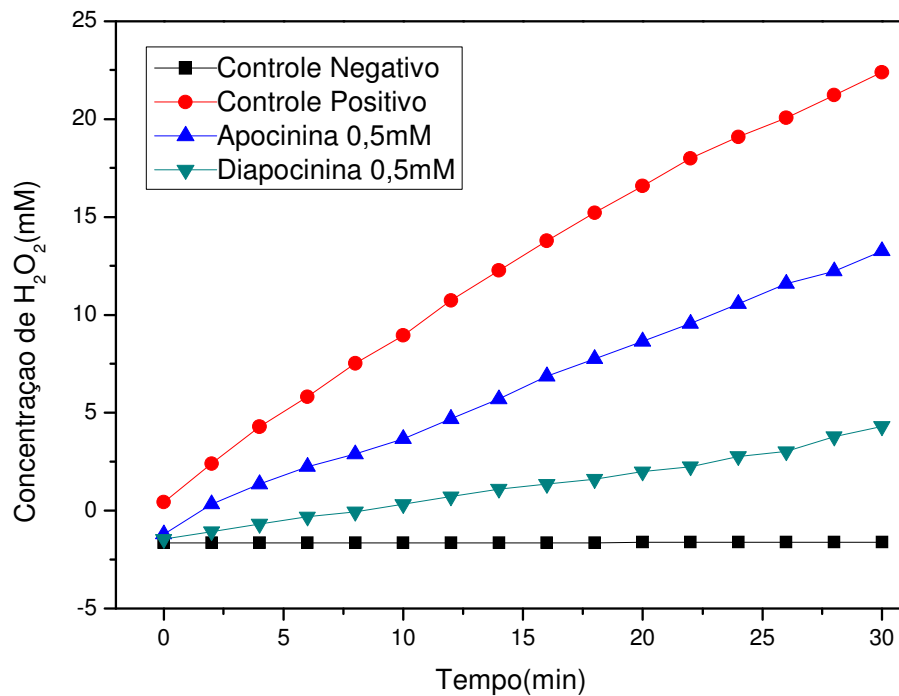


Figura 6. A produção de peróxido de hidrogênio e efeito de apocinina e diapocinina. Condições de reação: Glicose 5 mM, glicose oxidase 1U/ml, 0,05mM Amplex[®] Red, HRP 0,033 u/mL em PBS a 37°C, na presença ou ausência de inibidores.

Através do cálculo da área sob a curva nos estudos cinéticos e tomando como base a reação controle na ausência de inibidores, calculou-se a eficiência de inibição da apocinina e diapocinina como supressora da produção de H_2O_2 (Figura 7).

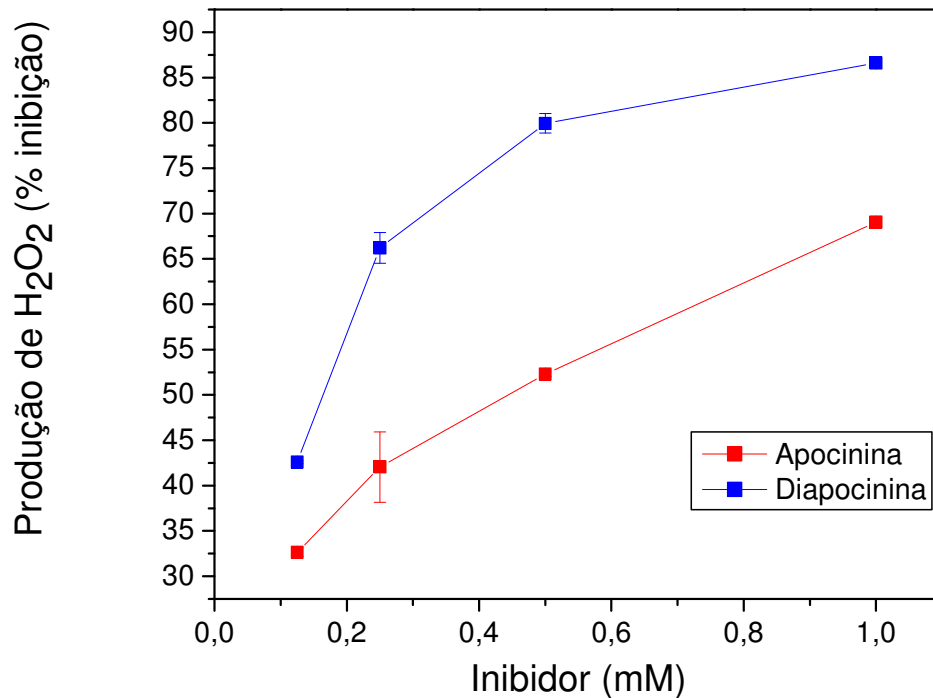


Figura 7. Curva dose/resposta para o efeito de apocinina e diapocinina na supressão de H₂O₂. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão de reações realizadas em triplicatas.

Pode-se verificar através dos dados demonstrados que a diapocinina obteve melhores resultados em relação à apocinina, como supressor da produção de H₂O₂ *in vitro*. Uma das hipóteses para este efeito é a de que a diapocinina tem maior facilidade de se oxidar, provavelmente por apresentar um potencial de redução menor que a apocinina. Pelo fato do dímero apresentar dois anéis aromáticos em sua estrutura, e a apocinina apenas um, gera uma maior quantidade de formas de ressonância, tendo então maior facilidade de ser oxidado.

5.3 Determinação da Produção de Peróxido de Hidrogênio por Neutrófilos Ativados

Para a produção de H_2O_2 *in vivo*, os neutrófilos foram induzidos a sofrer o processo de *burst* oxidativo. O complexo NADPH oxidase é então ativado, sendo este responsável pela redução uni eletrônica de oxigênio molecular ao radical livre ânion superóxido (O_2^-) (BABIOR, 2008), e posteriormente, o superóxido é convertido espontaneamente ou por ação catalítica da superóxido dismutase à H_2O_2 . Como o Amplex[®] Red reage prontamente com H_2O_2 formando o composto fluorescente resorufina, a reação é interrompida nesta etapa, não chegando a formação de HOCl pela mieloperoxidase.

A Figura 8 mostra a produção de peróxido de hidrogênio e o efeito da apocinina ou diapocinina quando neutrófilos foram estimulados através do estímulo sintético, acetato de forbol miristato (PMA). O PMA imita a ação do diacilglicerol, o segundo mensageiro envolvido no *burst* oxidativo dos neutrófilos.

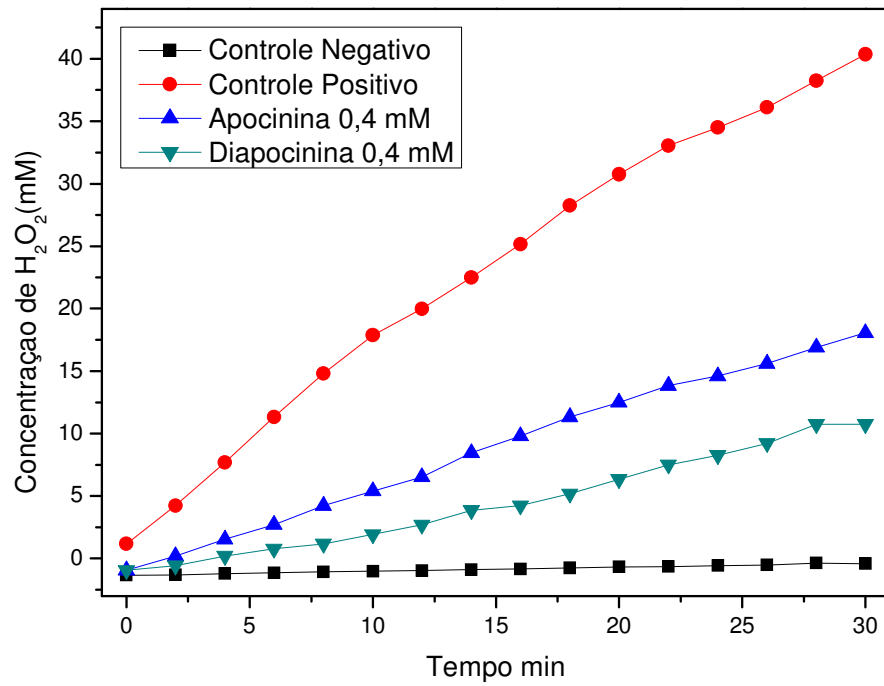


Figura 8. Produção de H_2O_2 e efeito da apocinina e diapocinina em neutrófilos ativados por PMA.

A Figura 9 mostra a curva dose-resposta para o efeito da apocinina e diapocinina como supressor de peróxido de hidrogênio por neutrófilos estimulados com PMA.

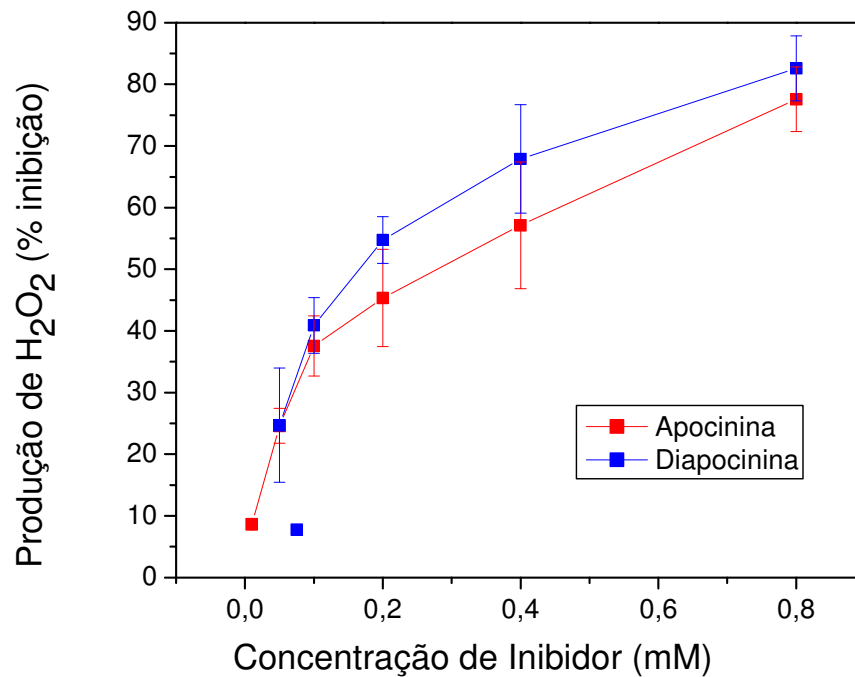


Figura 9. Curva dose/resposta para o efeito de apocinina e diapocinina na supressão de H_2O_2 produzido por neutrófilos estimulados por PMA. Os resultados apresentados e desvio padrão foram feitos em triplicatas.

Após a realização do experimento com os neutrófilos estimulados com PMA utilizou-se o zimosan. Trata-se de um lipopolissacarídeo de membrana de células de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) que, em contato com o soro sangüíneo, ativa o sistema complemento, produzindo partículas revestidas (opsonizadas) com componentes do mesmo (PAYA, 1994). Estes, por sua vez, são reconhecidos por receptores de membrana dos neutrófilos, levando ao processo de fagocitose, e ativação do complexo NADPH oxidase, gerando as EROs. A Figura 10 mostra a produção de peróxido de hidrogênio e o efeito da apocinina ou diapocinina quando neutrófilos foram estimulados por zimosan opsonizado.

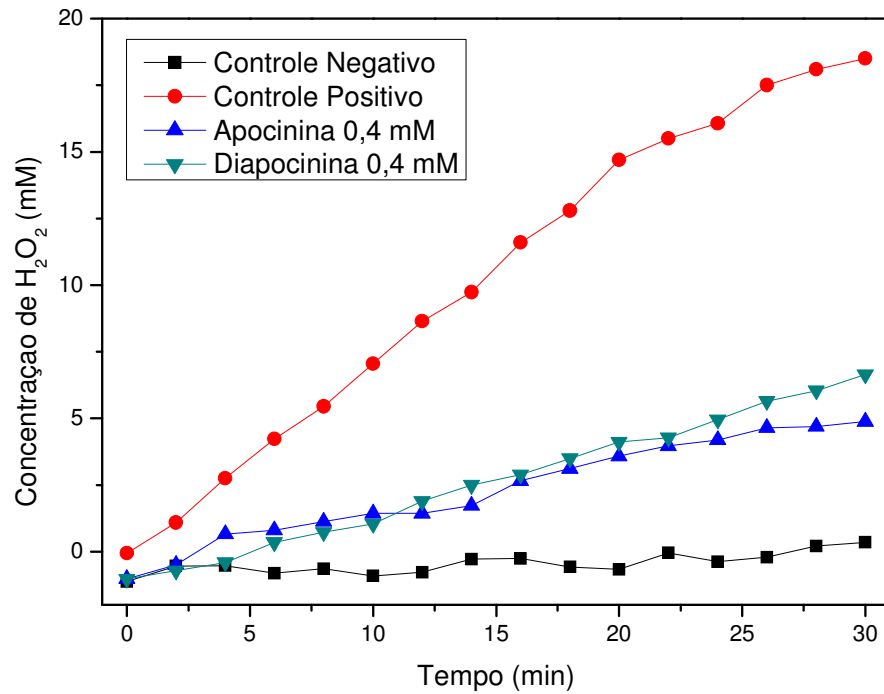


Figura 10. Produção de H_2O_2 e efeito da apocinina em neutrófilos ativados por zimosan.

A figura 11 mostra a curva-dose para o efeito da apocinina e da diapocinina como supressor de peróxido de hidrogênio por neutrófilos estimulados com zimosan opsonizado.

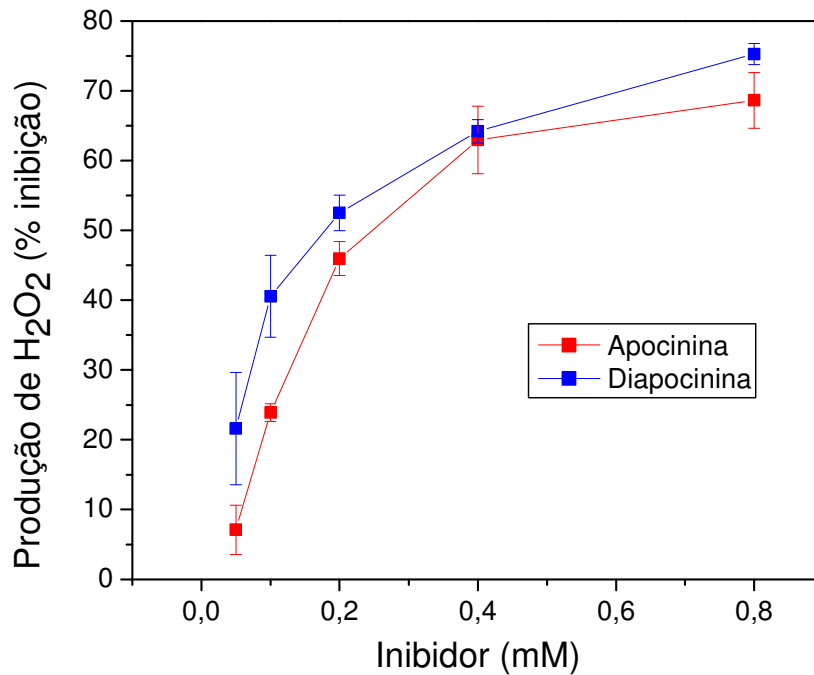


Figura 11. Curva dose/resposta para o efeito de apocinina e diapocinina na supressão de H₂O₂ produzido por neutrófilos estimulados por zimosan opsonizado. Os resultados apresentados e desvio padrão foram feitos em triplicatas.

A apocinina é considerada um inibidor do complexo NADPH oxidase e, por conseguinte um supressor de EROs. Esta inibição se deve a translocação do componente citossólico p47-phox e por consequência da ativação do complexo NADPH oxidase. Em células com deficiência de MPO, a apocinina perde seu poder de inibição. Pressupõe-se então que a apocinina seja ativada por peróxido de hidrogênio e por MPO, formando radicais, que em seguida oxidam tióis essenciais das proteínas do complexo NADPH oxidase (STEFANSKA, PAWLIEZAK, 2008). Outra hipótese pressupõe que seu alto poder de inibição estaria ligado à formação da diapocinina, que seria a espécie ativa na inibição (XIMENES et al., 2007). Através dos dados obtidos

experimentalmente neste trabalho, pode-se verificar que a diapocinina não foi melhor que a apocinina em ambos os estudos com células, ou seja, utilizando PMA ou zimosan como estímulos. Por outro lado, nos ensaios sem células, ou seja, utilizando o sistema glicose/glicose oxidase, a diapocinina foi significativamente mais eficiente do que a apocinina. Isto parece sugerir que a formação da diapocinina não seja fundamental no mecanismo de ação da apocinina, como relatado na literatura científica (XIMENES et al., 2007). No entanto, a sua ação supressora (*scavenger*) sobre o peróxido de hidrogênio é melhor, o que pode estar ligado a oxidabilidade desta molécula, já que a mesma apresenta dois anéis aromáticos, o que possibilitaria uma maior deslocalização do elétron desemparelhado, gerado na oxidação.

5.4 Determinação da produção de ácido hipocloroso por neutrófilos ativados

Uma das espécies reativas de oxigênio mais importante no contexto biológico é o ácido hipocloroso (HOCl), pois é o responsável pela morte de organismos patogênicos que entram em contato com nossa corrente sangüínea. Sua formação se deve a ação catalítica da MPO que é a única enzima capaz de catalisar a oxidação de cloreto a ácido hipocloroso (DYPBUKT et al., 2005).

A atividade da mieloperoxidase pode ser medida através da reação do ácido hipocloroso com a taurina gerando taurina-cloramina. Na presença de iodeto, a taurina-cloramina oxida o corante tetrametilbenzidina (TMB) a um corante azulado. O iodeto atua como catalisador da reação, pois na sua ausência a oxidação do TMB pode levar várias horas. Como a absorvância do TMB oxidado é diretamente proporcional à concentração de taurina-cloramina, e esta, por sua vez, reflete a concentração de HOCl

do meio, a técnica se adéqua a medida de HOCl gerado seja por células, seja pela enzima purificada.

A Apocinina e diapocinina também foram testados como inibidores da produção de HOCl por neutrófilos ativados. A Figura 12 mostra a curva de inibição dose-resposta para apocinina e diapocinina. Como se pode verificar, novamente a diapocinina não foi superior à apocinina em estudos com células, o que novamente coloca em dúvida as evidências da literatura que demonstram ser a diapocinina o real inibidor de NADPH oxidase quando a apocinina é utilizada.

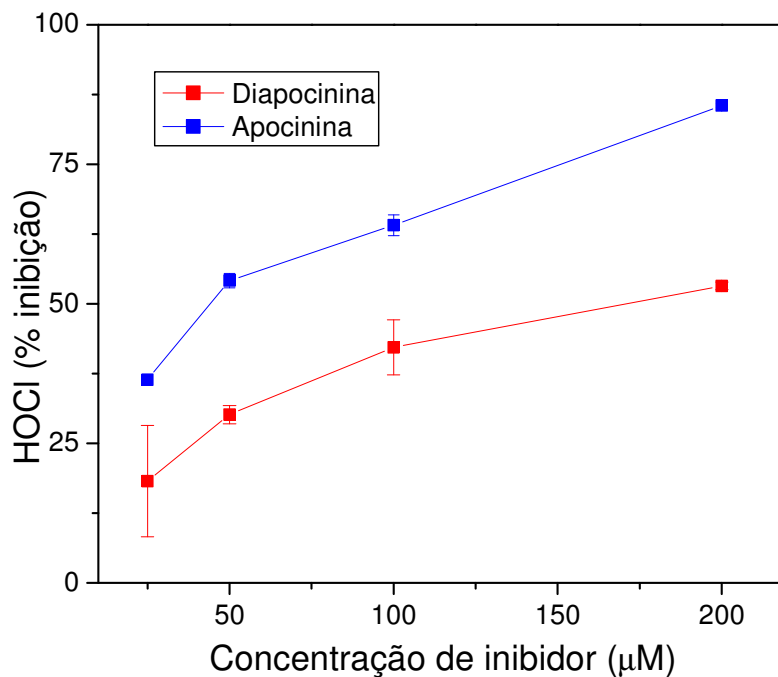


Figura 12. Curva dose/resposta para o efeito de apocinina e diapocinina como inibidores da produção de HOCl por neutrófilos estimulados por zimozan opsonizado. Os resultados apresentados e desvio padrão foram feitos em triplicatas

6 CONCLUSÃO

Diapocinina tem sido proposta como substância ativa responsável pela inibição da ativação do complexo NADPH oxidase fagocítica e não em células fagocíticas. Supõe-se que sua formação se dá pela oxidação do apocinina por EROs geradas em células ativadas. Aqui, utilizando diapocinina pura, encontramos que a mesma não foi mais eficiente que a apocinina quanto à sua atividade supressora na inibição da produção de H_2O_2 e HOCl por neutrófilos ativados, o que está diretamente ligado à ativação do complexo NADPH-oxidase (Figura 1). Novos estudos deverão ser realizados, mas acreditamos que estas evidências possam nos encaminhar para a proposição de um novo mecanismo de ação da apocinina.

7 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. A.; LICHMAN, A. H. **Imunologia básica: Funções e distúrbios do sistema imunológico**, Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

BABIOR, B. M.; NADPH Oxidase: An Update, From www.bloodjournal.org by on September 18, 2008.

CONLEY M. E., Diagnostic guidelines, **An International Consensus document. Clin Immunol.**;v.93:189, 1999.

DYPBUKT, J. M., BISHOP, C., BROOKS, W. M., et al., A sensitive and selective assay for chloramine production by myeloperoxidase, **Free Radic Biol Med**, v.39(11):1468-77, 2005.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.43, p. 61-68, 1997.

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORN, B.A. Cells and organs of the immune system. **Immunology**. Fourth edition, New Your, Kubi, 2000.

GUZIK, T. J., HARRISON, D. G., Vascular NADPH oxidases as drug targets for novel antioxidant strategies, **Drug Discovery Today**, V. 11, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**. v. 186, p.1-85, 1990.

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

KLEBANOFF, S. J.; Myeloperoxidase: friend and foe, **Uncorrected Version**. Published on February 2, 2005.

KUSS, F., Agentes Oxidantes e Antioxidantes, **Seminário de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2005.

LEUSEN, J. H.; VERHOEVEN, A. J.; ROOS, D., Interactions between the components of the human NADPH oxidase: intrigues in the phox family. **J Lab Clin Med**,v.128:461-76, 1996.

Morales, O. H. G.; Roche, N. P.; Sánchez, R. M.; Enzimas Generadoras de Especies Reactivas Del Oxigeno: Mieloperoxidasa, **Rev Cubana Invest Biomed** v.17(3):190-7, 1998.

PAYÁ, M. **Biochemical Pharmacology**. v.48 (3), 445-51, 1994.

Rosen F. S.; Eibl M.; Roifman C.; et al. **Primary immunodeficiency diseases. Clinical and Experimental Immunology**,v.118:1-28,1999.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Ann Rev Immunol** 23: 197-223, 2005.

STEFANSKA, J.; PAWLICZAK, R., Apocynin: Molecular Aptitudes, **Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation**,Article ID 106507, 2008.

VELLOSA, J. C. R.; BARBOSA, V. F.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Pesquisa De Produtos Naturais: Plantas E Radicais Livres. **Revista Eletrônica de Farmácia**. V. IV (2), 119-130, 2007.

WANG, Q., SMITHC, R. E.,LUCHEFELDC, et al., Bioavailability of apocynin through its conversion to lycoconjugate but not to diapocynin, **Phytomedicine** **15**, v.496–503, 2008.

WIND, S.; Pharmacological And Biochemical Studies On The Contribution Of Nadph Oxidase To Oxidative Stress In The Aorta Of Spontaneously Hypertensive Rats, **Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften**, 2006.

WINKELSTEIN, J. A.; MARINO, M. C.; JOHNSTON R. B. JR.; et al, Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. **Medicine (Baltimore)**,v.79(3):155-69, 2000.

Ximenes, V.F., Kanegae, M.P., Rissato, S.R., et al., The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: proposal for NADPH oxidase inhibition. **Arch. Biochem. Biophys**. V.457, 134–141,2007.

ZHOU, M., DIWU, Z., A stable nonfluorescent 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.15;253(2):162-8, 1997.