

Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Biotecnologia e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

LUANA CHIQUETTO PARACATU

**ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA QUÍMICA
E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE INIBIDORES DE NADPH
OXIDASE EM LEUCÓCITOS: RELEVÂNCIA DA
OXIDABILIDADE E HIDROFOBICIDADE**

ARARAQUARA

2016

LUANA CHIQUETTO PARACATU

**ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA QUÍMICA
E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE INIBIDORES DE NADPH
OXIDASE EM LEUCÓCITOS: RELEVÂNCIA DA
OXIDABILIDADE E HIDROFOBICIDADE**

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

Orientador: Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca

ARARAQUARA

2016

Ficha Catalográfica

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

Paracatu, Luana Chiquetto
P221e Estudo da relação entre estrutura química e atividade biológica de inibidores de NADPH oxidase em leucócitos: relevância da oxidabilidade e hidrofobicidade / Luana Chiquetto Paracatu. – Araraquara, 2016.
140 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, área de pesquisa em Bioquímica.

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

1. NADPH Oxidase. 2. Ânion superóxido. 3. Éster fenetílico do ácido cafeico. 4. Leucócitos.
I. Ximenes, Valdecir Farias, orient. II. Fonseca, Luiz Marcos da, coorient. III. Título.

CAPES: 40500005

LUANA CHIQUETTO PARACATÚ

Estudo da relação entre estrutura química e atividade biológica de inibidores de nadph oxidase em leucócitos: relevância da oxidabilidade e hidrofobicidade


Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Doutor(a) em Biotecnologia e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Araraquara, 17 de junho de 2016.

BANCA EXAMINADORA



VALDECIR FARIAS XIMENES



MARIA LUIZA ZERAÍK



IÊDA MARIA MARINEZ PAINO



DANIEL RIVALDO



IRACILDA ZEPPONE CARLOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que, diretamente ou indiretamente, colaboraram com a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes, pela competência e respeito, suporte e confiança depositados em mim, permitindo e colaborando com meu avanço pessoal e profissional, pela disponibilidade, ajuda e interesse para que este trabalho se concretizasse.

Ao meu Coorientador Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca, por todo o apoio dado a mim e ao meu projeto desde o mestrado até a finalização desta tese.

Ao orientador estrangeiro, Dr. Jonathan Dordick, por aceitar colaborar com este trabalho, recebendo-me em seu grupo de pesquisa na Rensselaer Polytechnic Institute e todo o suporte técnico para a realização de parte deste trabalho.

À Dra. Patricia Palmeira por oferecer as dependências do LIM-36 para a realização de parte deste trabalho.

Às professoras, Dra. Cristiane Soares Penha e Dra. Maria Luiza Zeraik, pelas valiosas contribuições no Exame Geral de Qualificação deste trabalho.

Aos professores, membros da banca de defesa, pelas valiosas contribuições para a finalização deste trabalho

A todos os colegas de laboratório da Rensselaer Polytechnic Institute, em especial, Dr. Seok-Joon Won, Gregory Nierode, Xia Wu

por toda ajuda e paciência, ensinamentos e amizade durante o período em que fui parte do grupo de pesquisa. Thank you!

Às funcionárias da Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, por toda ajuda, atenção e disponibilidade.

Aos queridos amigos de vida e bancada, Carolina Quinello, Bruna Pastrello, Renata Pires, Grace Dourado, Maicon Petrônio, por todo o tempo que disponibilizaram para me ensinar, ajudar e especialmente me ouvir quando mais precisei...vocês são parte essencial deste trabalho. Obrigada pela amizade!

Aos queridos amigos de Troy, Bruna Diirr, Alan Boss, Henrique Oliveira, Carolina Motter, pela amizade e apoio constantes, por dividirem comigo a incrível jornada deste doutorado sanduíche, pelas risadas e lágrimas, almoços e viagens...obrigada, este período na RPI foi o melhor da minha vida e vocês são parte disto!

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo, bolsa de doutorado do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior e apoio financeiro para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

E especialmente, agradeço àqueles que jamais me deixam desanimar. Os que estão sempre dispostos a ouvir e ajudar, à minha querida família, que de longe ou de perto estão sempre ali. Em especial, a minha mãe, Célia e minha irmã, Naiara, que estão sempre ao meu lado, torcendo pelo meu sucesso, aceitando a distância e ausência e a saudade.

E ao meu querido gato Jack, especialmente, fez-me companhia nas infinitas horas de escrivadinha, enquanto tirava seus cochilos no meu colo.

“Não tenha medo de trabalho árduo. Nada que vale a pena vem fácil. Não deixe os outros desanimá-lo ou dizer-lhe que você não pode fazê-lo. Na minha época foi-me dito que as mulheres não poderiam se dedicar à química. Eu não vi nenhuma razão para que não pudéssemos”.

Gertrude B. Elion

RESUMO

Inúmeras patologias têm a sua gênese e/ou progressão relacionadas à produção desregulada de intermediários oxidantes. O complexo multienzimático NADPH oxidase é um dos componentes de maior relevância neste contexto, pois é uma das principais fontes de ânion superóxido no organismo animal. Sendo expresso em inúmeros tecidos, incluindo leucócitos e células do tecido endotelial, o desenvolvimento de inibidores eficientes deste complexo enzimático poderá significar uma nova terapêutica para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas. Com objetivo de explorar a relação entre a estrutura molecular, as propriedades químicas e atividades biológicas, utilizamos o éster fenetílico do ácido cafeico (CAPE) como inibidor do complexo enzimático NADPH oxidase e comparamos sua eficácia com o seu precursor ácido cafeico e os derivados, éster fenetílico do ácido cinâmico e o ácido clorogênico, correlacionando-os a respeito a sua hidrofobicidade, propriedades redox e inibição do complexo NADPH oxidase em leucócitos ativados. A hipótese seria de que um aumento da hidrofobicidade provocado pela esterificação do ácido cafeico poderia facilitar o seu acesso à membrana celular e assim alterar seu efeito como possível inibidor de NADPH Oxidase. Os resultados, em ensaios *in vitro*, mostraram que as alterações na hidrofobicidade não provocaram alterações significativas no potencial de oxidação e potencial antioxidantes dos compostos testados. Quando testados em leucócitos ativados (modelos *ex vivo*), a esterificação provocou uma melhora significativa na capacidade de inibição do complexo NADPH oxidase. Este potente efeito se propagou às EROs decorrentes de ânion superóxido e produzidas por leucócitos, como peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso, entretanto, sem alterar a capacidade fagocítica dos leucócitos. Os resultados deste estudo mostram que nos ensaios celulares o CAPE foi o composto mais potente em relação ao seu precursor ácido e ácido clorogênico, sendo significativamente mais efetivo na inibição da produção das EROs. Da mesma forma, CAPE foi o inibidor mais eficaz da expressão de TNF- α e IL-10 por *Staphylococcus aureus* células estimuladas. Em conclusão, a presença do grupo catecol e a maior hidrofobicidade, do CAPE, foram essenciais para os efeitos biológicos, confirmando nossa hipótese. Considerando-se o envolvimento da NADPH-oxidases na gênese e progressão de doenças inflamatórias, CAPE deve ser considerada como uma droga anti-inflamatória promissora.

Palavras-chave: NADPH Oxidase. Ânion superóxido. Éster fenetílico do ácido cafeico. Leucócitos.

ABSTRACT

Several diseases have their genesis and / or progression related to unregulated production of oxidants intermediates. The multienzymatic complex NADPH oxidase is one of the most important components in this context because it is a major source of superoxide anion in animal organisms. It is expressed in numerous tissues, including leukocytes and endothelial tissue cells. Developing effective inhibitors of this enzyme complex may indicate a new therapy for the treatment of chronic inflammatory diseases. Several studies have described numerous anti-inflammatory properties attributed to caffeic acid phenethyl ester (CAPE), an active component found in propolis. In order to explore the relationship between the molecular structure, chemical properties and biological activities, we used CAPE to inhibit the enzyme complex NADPH oxidase and compare its efficacy with the its precursor caffeic acid and derivatives, phenethyl ester of cinnamic acid and chlorogenic acid, correlating them with regard to hydrophobicity, redox properties and inhibition of NADPH oxidase complex on activated leukocytes. The hypothesis was that an increase of hydrophobicity caused by the esterification of caffeic acid could facilitate access to cell membranes and thereby alter its effect as a possible inhibitor of NADPH oxidase. The results (*in vitro*), showed that the changes in hydrophobicity did not provoke significant changes in the oxidation potential and antiradical potency of the tested compounds. But when tested in activated leukocytes (*ex vivo*), the esterification caused a significant improvement in the ability to inhibit the NADPH oxidase complex. This potent inhibition effect resulted also in the blockage of production of hypochlorous acid, however, without altering the phagocytic ability of leukocytes. The results of this study show that in cellular assays, CAPE was the most potent compound in comparison to caffeic acid and chlorogenic acid, significantly more effective in inhibiting the production of ROS. Likewise, CAPE was the most effective inhibitor of expression of TNF- α and IL-10 in *Staphylococcus aureus* stimulated cells. In conclusion, the presence of the catechol moiety and the higher hydrophobicity of CAPE were essential for the biological effects. Considering the involvement of NADPH oxidases in the genesis and progression of inflammatory diseases, CAPE should be considered as a promising anti-inflammatory drug.

Keywords: NADPH Oxidase. Superoxide anion. Caffeic acid phenethyl ester. Leucocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema da ativação da NADPH Oxidase (Nox2)	20
Figura 2 - Modelo do flavocitocromo b558	21
Figura 3 - Modelo dos domínios das subunidades p40phox, p47phox e p67phox	22
Figura 4 - Reação da formação das espécies reativas de oxigênio e a ação de antioxidantes	24
Figura 5 - Estrutura molecular do DPI	34
Figura 6 - Estrutura molecular da apocinina	36
Figura 7 - Estrutura molecular do ácido cafeico e éster fenetílico do ácido cafeico	39
Figura 8 - Estrutura dos ácidos fenólicos utilizados	45
Figura 9 - Demonstração ilustrativa da separação celular por Histopaque 1077 e 1119	50
Figura 10 - Estrutura molecular do ácido cafeico e seus derivados e seus índices de hidrofobicidade (log P, coeficiente de partição n-octanol/água)	68
Figura 11 - Medida de voltametria cíclica para obtenção do potencial de redução do ácido cafeico e derivados	70
Figura 12 - Capacidade antioxidante pelo método de redução do DPPH	71
Figura 13 - Capacidade antioxidante do ácido cafeico e seus derivados pelo método de redução do DPPH	71
Figura 14 - Inibição da peroxidação lipídica do ácido cafeico e seus derivados pelo modelo de óleo tungue	72
Figura 15 - Inibição da peroxidação lipídica do ácido cafeico e seus derivados pelo modelo de óleo tungue	73
Figura 16 - Ação redutora de radical peroxila do ácido cafeico e seus derivados. Letras diferentes denotam diferenças significativas	74

Figura 17 - Ação redutora de radical peroxila do ácido cafeico e seus derivados. Atividade antioxidante equivalente ao Trolox.....	75
Figura 18 - Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de Redução do Ferro pelo ácido cafeico e seus derivados.	76
Figura 19 - Inibição da produção EROs do “burst” oxidativo, do ácido cafeico e seus derivados, pelo ensaio quimiluminescente dependente de Lucigenina.....	78
Figura 20 - Cinética da emissão de luz (RLU) no tempo de 30 minutos	79
Figura 21 - Redução do WST-1 pelo ácido cafeico e seus derivados provocada pelo $O_2^{\cdot -}$ liberado por neutrófilos ativados com PMA.....	80
Figura 22 - Inibição da produção de ânion superóxido pelo ácido cafeico e seus derivados, pelo método de xantina – xantina oxidase.	81
Figura 23 - Inibição da produção de HOCl por neutrófilos ativados	83
Figura 24 - Inibição da atividade clorinante da enzima mieloperoxidase, pelo ácido cafeico e seus derivados	84
Figura 25 - Inibidores de H_2O_2 liberado no meio extracelular por PMN ativados por PMA.....	86
Figura 26 - Porcentagem de inibição de peróxido de hidrogênio sobre o MFI.....	88
Figura 27 - Capacidade de alteração da atividade efetora de neutrófilos (Fagocitose) pelo ácido e CAPE.	90
Figura 28 - Produção de citocinas pró e anti-inflamatórias no sobrenadante das culturas de monócitos por ELISA	91
Figura 29 - Purificação do vetor pEGFP-N1 e proteína His-P47	92
Figura 30 - Clones do vetor EGFP-p47.....	93
Figura 31 - Transferência de DNA para células HEK-293 visualizadas em microscopia de fluorescência.	95
Figura 32 - Transferência de DNA para células HEK-293 visualizadas em microscopia de fluorescência.	96

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- AAPH** *2,2-azobis amidinopropano dihidroclorido*
- ANG-II** Angiotensina II
- BPI** Proteína de Aumento da Permeabilidade/Bactericida
- CAPE** Éster fenetílico do ácido cafeico
- CA** Ácido Cafeico
- CIPE** Éster Fenetílico do ácido cinâmico
- ClorA** Ácido clorogênico
- cm²** Centímetro quadrado
- CO₂** Gás carbônico
- DAG** Diacilglicerol
- DGP** Doença Granulomatosa Crônica
- DHR** Dihidrorodamina-123
- DNA** Ácido desoxirribonucleico
- DPI** *Diphenyleneiodonium chloride*
- DPPH** *1-difenil-2-picrilhidrazil*
- Epa** Potencial do pico anódico
- EROs** Espécies Reativas de Oxigênio
- FAD** Flavina Adenina Dinucleotídeo
- FSC** *Forward scatter* (tamanho celular)
- fMLP** *Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine*
- GDP** Guanosina difosfato
- GTP** Guanosina trifosfato
- GM-CSF** *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos)
- HEK-293** *Human Embryonic Kidney 293 cells* (Célula Embrionária de rim humano 293)
- H₂O₂** Peróxido de hidrogênio
- HOCl** Ácido hipocloroso
- HRP** *Horseradish Peroxidase*
- HUVEC** *Humans Umbilical Vascular Endothelial Cell* (Célula do tecido vascular umbilical humano)

IgG Imunoglobulina de classe G

IL- Interleucina

IP3 Trifosfatoinositol

LB Meio de cultura para crescimento de *e.Coli*

LDL Lipoproteína de baixo peso molecular

LPS Lipopolissacarídeo

MAPK *Mitogen-activated protein kinase*

MFI *Mean fluorescence intensity* (Média de Intensidade de Fluorescência)

mg Miligrama

MHC *Major Histocompatibility Complex* (Complexo Principal de Histocompatibilidade)

mL Mililitro

mM Milimolar

MPO Mieloperoxidase

mV Milivolts

µg Micrograma

µM Micromolar

NADPH Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NF-κβ Fator de transcrição NF-kappa Beta

NO• Óxido nítrico

Nox NADPH Oxidase

nM Nanomolar

¹O₂ Oxigênio singlete

O₂^{•-} Ânion superóxido

OH[•] Radical hidroxila

OONO- Peróxinitrito

PBMC Células Mononucleares do Sangue Periférico

PBS Solução salina tamponada com fosfato

PCR Reação em cadeia da polimerase

pg Picograma

PKA *Protein kinase A*

PKC *Protein kinase C*

PMA *Phorbol 12-myristate 13-acetate*

PMN Neutrófilos polimorfonucleares

PR-39 *Proline-arginine-rich antimicrobial peptide*

PRR Região Rica em Prolina

ROO[•] Radical peroxila

-SH Grupos sulfidrilas

-SS Pontes dissulfeto

SFB Soro Fetal Bovino

SNC Sistema Nervoso Central

SOC Meio para crescimento de células competentes de *e.Coli*

SOD Superóxido dismutase

SSC *Side scatter* (granulosidade celular)

TEAC Atividade antioxidante equivalente ao Trolox

TLR *Toll-Like receptor*

TNF – α *Tumor necrosis fator-alfa* (Fator de Necrose Tumoral-alfa)

TPTZ Tripiridiltriazina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 NADPH OXIDASE	16
1.2 ATIVAÇÃO DA ENZIMA NADPH OXIDASE – NOX2	20
1.3 NOX2: PRODUÇÃO DE EROs	22
1.4 FAGÓCITOS: NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS	26
1.5 CÉLULAS ENDOTELIAIS	29
1.6 NADPH OXIDASE: SEUS EFEITOS FISIOLÓGICOS E PATOLÓGICOS	31
1.7 INIBIDORES DA NADPH OXIDASE	33
1.8 ÁCIDOS FENÓLICOS E ÉSTER FENÉTILICO DO ÁCIDO CAFEICO	37
2. OBJETIVOS	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1 ÉTICA	44
3.2 CASUÍSTICA	44
3.3 SUBSTÂNCIAS DE ESTUDO: ÁCIDO CAFEICO E DERIVADOS	44
3.4 ESTIMAÇÃO DO LOGARITMO DE COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (LOG P)	45
3.5 MEDIDAS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA PARA DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE REDUÇÃO	45
3.6 ESTUDO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE (REDUÇÃO DO RADICAL ESTÁVEL DPPH)	46
3.7 INIBIÇÃO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA PELO MÉTODO ÓLEO TUNGUE	47
3.8 AÇÃO REDUTORA SOBRE RADICAIS PEROXILA/AAPH	47
3.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO (FRAP)	48
3.10 SEPARAÇÃO DOS GRANULÓCITOS NEUTRÓFILOS (PMN) E MONÓCITOS (PBMC) POR GRADIENTE DUPLO DE DENSIDADE EM FICOLL-HYPAQUE	49
3.11 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR POR EXCLUSÃO DO CORANTE AZUL DE TRYPAN	50
3.12 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DO RADICAL $O_2^{\cdot-}$ POR LEUCÓCITO ATIVADOS. (ENSAIO QUIMILUMINESCENTE DEPENDENTE DE LUCIGENINA)	51
3.13 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DO RADICAL $O_2^{\cdot-}$ POR NEUTRÓFILOS ATIVADOS (ENSAIO DO WST-1)	52

3.14 INIBIDORES DA PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO PELO SISTEMA ENZIMÁTICO XANTINA/XANTINA OXIDASE	52
3.17 PRODUÇÃO DE HOCl: MPO/H₂O₂ (SISTEMA LIVRE DE CÉLULAS). AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBIDOR SOBRE A AÇÃO CLORINANTE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO)	55
3.18 DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO INTRACELULAR ENSAIO DE DIHIDRORODAMINA 123 (DHR) POR CITOMETRIA DE FLUXO	56
3.19 ENSAIO DE FAGOCITOSE POR CITOMETRIA DE FLUXO	57
3.20 CULTURA DE CÉLULAS MONONUCLEARES	59
3.21 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS (ELISA).....	60
3.22 CONSTRUÇÃO DO VETOR: EGFP-P47	61
3.22.1 Purificação Do Vetor pEGFP-N1	61
3.22.2 Corte Do Vetor Para Encaixe Da Proteína P47	62
3.22.3 Preparação Da Proteína His-P47.....	62
3.22.4 Preparando Clones EGFP-P47.....	63
3.23 CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS	64
3.24 TRANSFERÊNCIA DO DNA (EGFP-p47) PARA CÉLULAS ENDOTELIAIS – TRANSFECTION	65
4. RESULTADOS	68
4.3 ESTUDO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE (REDUÇÃO DO RADICAL ESTÁVEL DPPH)	70
4.4 INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA PELO MÉTODO ÓLEO TUNGUE.....	72
4.5 AÇÃO REDUTORA SOBRE RADICAIS PEROXILA/AAPH	73
4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO (FRAP)	75
4.8 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO EROS DO “BURST” OXIDATIVO. ENSAIO QUIMILUMINESCENTE DEPENDENTE DE LUCIGENINA (QLDLUC)	77
4.9 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DO RADICAL O₂⁻ POR NEUTRÓFILOS ATIVADOS (ENSAIO DO WST-1).....	79
4.6 INIBIDORES DA PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO PELO SISTEMA ENZIMÁTICO XANTINA/XANTINA OXIDASE	81
4.10 AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBIDOR SOBRE A PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIPOCLOROSO (HOCl) POR NEUTRÓFILOS ATIVADOS.....	82
4.11 PRODUÇÃO DE HOCl: MPO/H₂O₂ (SISTEMA LIVRE DE CÉLULAS) AVALIAÇÃO O EFEITO INIBIDOR SOBRE A AÇÃO CLORINANTE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO)	83

4.12 DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EXTRACELULAR POR AMPLEX® RED.....	85
4.13 DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO INTRACELULAR. ENSAIO DE DIHIDRORODAMINA 123 (DHR) POR CITOMETRIA DE FLUXO	86
4.14 ENSAIO DE FAGOCITOSE POR CITOMETRIA DE FLUXO	89
4.15 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS (ELISA).....	90
4.16 CONSTRUÇÃO VETOR EGFP-P47.....	92
4.17 TRANSFERÊNCIA DO DNA (EGFP-p47) PARA CÉLULAS ENDOTELIAIS – TRANSFECTION	93
5. DISCUSSÃO	98
6. CONCLUSÃO	115
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
CAPÍTULO 2	130
APÊNDICE	133

CAPÍTULO 1

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 NADPH OXIDASE

Nicotinamida Adenina dinucleotídeo fosfato oxidase, ou NADPH oxidase, é um complexo multienzimático, NADPH dependente, responsável por catalisar a redução de oxigênio molecular em ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (JOHNSON et al., 2002).

Esse complexo de proteínas associadas a membrana consiste em seis componentes:

Proteínas de membrana: gp91phox e p22phox. Essa fração também é conhecida como citocromo b558 e são caracterizadas como a porção catalítica da enzima. Essas ficam em estado dormente na ausência de outras subunidades (JOHNSON et al., 2002; GROEMPING; RITTINGER, 2005; MORA-PALE et al., 2012).

Subunidades de citosol consistem em: p47phox, p67phox e p40phox. Assim como a GTPase Rac, membro da família Rho, a menor das GTPases (JOHNSON et al., 2002; GROEMPING, RITTINGER, 2005; MORA-PALE et al., 2012).

- 1. GP91phox:** A unidade GP91phox é a responsável pelo transporte de elétrons pela membrana, que ocorre em duas etapas: a primeira os elétrons são transferidos de NADPH para FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo) e então para o grupo heme para reduzir oxigênio molecular à ânion superóxido (GROEMPING; RITTINGER, 2005).
- 2. P22phox:** Em associação com a gp91phox, contribui para a maturação de estabilidade do complexo de membrana. Essa fração é a responsável pela ligação com as unidades de citosol, onde porção C-terminal apresenta uma região de motivo chamada PRR (*proline rich region*) que contém o

motivo PxxP que conhecidamente se liga a porção SH3 (Src homóloga 3) das subunidades p47phox. (JOHNSON et al., 2002; MORA-PALE et al., 2012)

3. **P47phox:** É uma proteína que se transloca e se liga a subunidade de membrana depois de ativação. Os dois domínios SH3 dessa subunidade sofre uma ligação proteína – proteína e alguns são alvos de fosforilação, sendo essa a porção mais fosforilada das subunidades de NADPH oxidase, onde ao todo já foram estudados 11 sítios de fosforilação, todos na região C-terminal do domínio SH3. Alguns estudos sugerem que a actina do citoesqueleto pode desempenhar um papel importante na regulação desta enzima ou interação dessa subunidade com as outras subunidades do complexo (GROEMPING; RITTINGER, 2005; MORA-PALE et al., 2012).
4. **P67 Phox:** A proteína se liga à Rac em uma forma dependente de GTP pelo domínio TPR, o qual é conhecido por promover ligações proteínas-proteínas (GROEMPING; RITTINGER, 2005).
5. **P40 phox:** Foi a última proteína do complexo de NADPH oxidase a ser identificada. Ela interage com a p67phox através do seu domínio PB1, e com a p47phox através do domínio SH3 (GROEMPING; RITTINGER, 2005).
6. **Rac:** Rac pertence à família das pequenas GTPases, uma molécula que regula uma variedade de sinalizações, incluindo a remodelação do citoesqueleto e quimiotaxias. Sua atividade é determinada pela interação com o tipo de nucleotídeo que está ligado: GDP mantém a proteína em seu estado inativo enquanto a GTP mantém em estado ativado, permitindo assim, no caso da NADPH Oxidase a ligação das subunidades de membrana e citosol (GROEMPING; RITTINGER, 2005).

Atualmente, existem sete diferentes isoformas de NADPH Oxidase descritas na literatura que consistem em: Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 e Duox2.

Esse complexo multienzimático, dependendo da membrana biológica na qual as diferentes isoformas são expressas, pode ser encontrado em células epiteliais (Nox1), células fagocíticas (Nox2), células fetais e do tecido auricular (Nox3), células renais, vasculares, osteoclastos, fibroblastos, queratinócitos, hepatócitos e neurônios (Nox4). Já a Nox5 é expressa em células do tecido linfóide, testículos, próstata, ovários e pâncreas. As Duox 1 e 2 estão presentes principalmente na tireóide, células endoteliais do sistema respiratório (BARBIOR, 2004; BROWN; GRIENDLING, 2009, WANG et al., 2013).

Os domínios catalíticos de todas as sete isoformas são homólogos e compartilham uma função biológica em comum, a catalise da formação de espécies reativas de oxigênio (HIRANO et al., 2015)

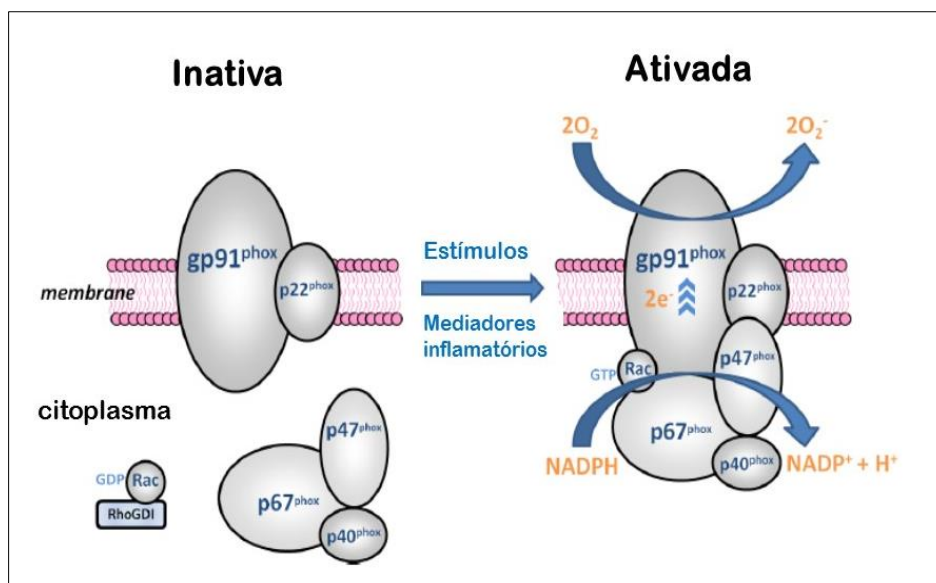
- **Nox 1:** Encontrada em células endoteliais, útero, placenta, próstata (LEE et al., 2005; BROWN; GRIENDLING, 2009)
- **Nox2:** Também conhecida como Nox dos fagócitos por ser altamente expressa nas células fagocíticas. Mas também é expressa em células vasculares, fibroblastos, musculatura esquelética e células tronco hematopoeiticas (BEDARD, KRAUSE, 2007; BROWN; GRIENDLING, 2009; PANDEY; FULTON, 2011).
- **Nox3:** Aparentemente inativa no tecido adulto, é encontrada em células do tecido fetal do baço, rim, pulmão e crânio (CHENG et al., 2001; BANFI et al., 2004; BROWN; GRIENDLING, 2009).

- **Nox 4:** é altamente expressa em células renais, nas células da musculatura lisa, células endoteliais, fibroblastos, neurônios e hepatócitos. A distribuição tecidual da Nox4 é bastante onipresente e altamente expressa em relação a seus outros homólogos NOX (BEDARD; KRAUSE, 2007; BROWN; GRIENDLING, 2009).
- **Nox5:** Encontrada em células do tecido linfático, células endoteliais, células da musculatura lisa vascular, pâncreas e útero, próstata e linhagens de células cancerígenas. Pesquisas indicam que a Nox5 desempenha um importante papel na proliferação celular, um indicativo da qual estar altamente expressa em diversas linhagens de células cancerígenas. Também 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, desencadeando uma mudança conformacional intramolecular, facilitando o fluxo de elétrons e a produção de $O_2^{\cdot -}$ por esta Nox (KAMIGUTI et al., 2005; BEDARD; KRAUSE, 2007; JAY et al., 2008; BROWN; GRIENDLING, 2009; PANDEY; FULTON, 2011).
- **Duox1 e Duox2:** Apresentam um domínio peroxidase extracelular e um domínio homólogo da gp91phox. 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. Também são largamente encontradas no epitélio das vias aéreas (DE DEKEN et al., 2000; PFARR et al., 2006; RIS-STALPERS et al., 2006; BROWN; GRIENDLING, 2009).

1.2 ATIVAÇÃO DA ENZIMA NADPH OXIDASE – NOX2

Duas subunidades dessa enzima, como dito anteriormente, são localizadas na membrana: a gp91phox e a p22phox, juntas formam o flavocitocromo b558 (Figura 1), que constitui a parte catalítica da enzima. As outras subunidades, presentes no citoplasma, são a p47phox, p67phox, p40phox e a pequena proteína Rac, como ilustra a figura 1 (GROEMPING; RITTINGER, 2005; DRUMOND et al., 2011).

Figura 1 - Esquema da ativação da NADPH Oxidase (Nox2)



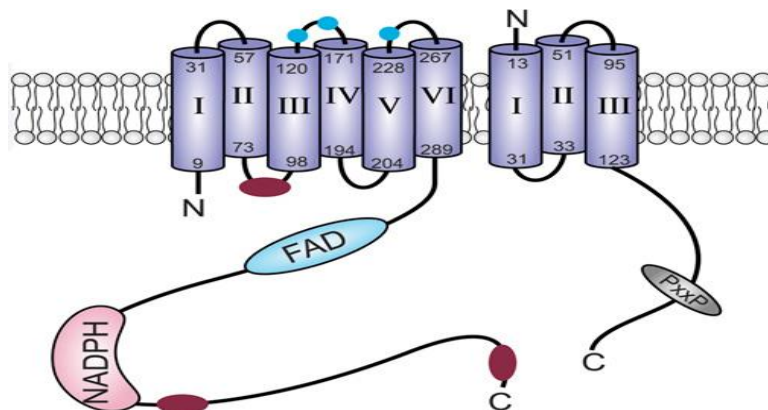
(Adaptado de MCCANN; ROULSTON, Brain Sci., 2013)

A gp91phox, na sua porção terminal N tem seis membranas α -hélices, enquanto em sua porção C-terminal tem sítios de ligação FAD e NADPH. Os elétrons são transferidos de FAD para NADPH e então para o grupo heme, como pode ser observado na figura 2 (GROEMPING, RITTINGER, 2005; DRUMMOND et al, 2011).

A p22phox, em associação com a gp91phox contribui para a sua maturação e estabilização. Na sua porção N-terminal, tem três membranas α -hélice e em sua porção C-terminal, um sítio de ligação

PRR (região rica em prolina), ilustrado na Figura 2. Este sítio é o responsável por se ligar ao domínio SH3 (Src homólogo 3) da p47phox (GROEMPING, RITTINGER, 2005; DRUMMOND et al., 2011).

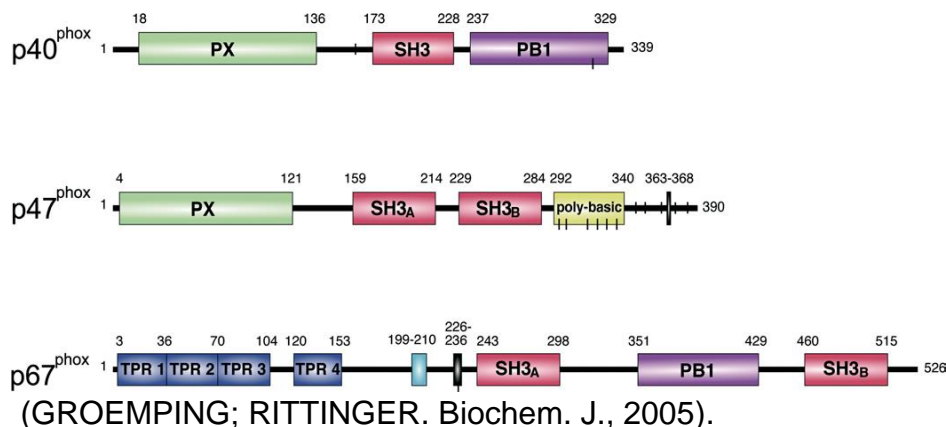
Figura 2 - Modelo do flavocitocromo b558



(GROEMPING; RITTINGER. *Biochem. J.*, 2005).

Primeiramente, a p40phox se liga fortemente à p67phox através de seus respectivos domínios PB1. Consecutivamente, a p47phox liga-se ao domínio SH3 da p67phox através de seu domínio PRR, na região C-terminal. Esta ligação é importante para a associação das proteínas no citoplasma em seu estado inativo, tanto para o recrutamento da p67phox para a membrana (flavocitocromo b558). A interação da p47phox com a p40phox ocorre através da ligação do seu domínio SH3 ao PRR da p47phox, porém esta ligação é muito fraca em relação ao conjunto p47phox-p67phox, ilustrados na figura 3 (GROEMPING; RITTINGER, 2005).

Figura 3 - Modelo dos domínios das subunidades p40phox, p47phox e p67phox



A p47phox controla e facilita a translocação do complexo p40phox-p67phox para a membrana. Essa translocação só ocorre devido a fosforilação da p47phox, a proteína mais fosforilada do complexo. Diversas quinases estão envolvidas neste processo, como PKA (*Protein kinase A*), PKC (*Protein kinase C*), MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinase*), embora a PKC tem um papel dominante sobre a ativação por FMLP (*Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine*) ou PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*) em neutrófilos humanos (DRUMMOND et al., 2011).

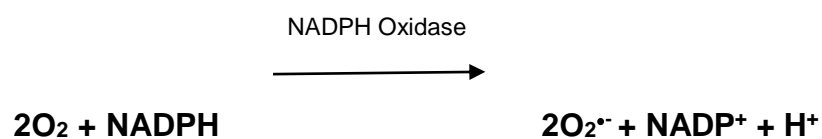
Um ponto crucial na formação do complexo NADPH Oxidase é a interação da p67phox com a Rac, que ocorre quando ambas, de forma independente, translocam-se para a membrana. A p67phox é capaz de regular a atividade catalítica da enzima através de uma sequência chamada domínio de ativação. Acredita-se que este sítio presente em p67phox seja capaz de iniciar a transferência de elétrons de NADPH para FAD (GROEMPING; RITTINGER, 2005).

1.3 NOX2: PRODUÇÃO DE EROs

Como descrito acima, uma das principais fontes de produção de EROs endógena se dá pela ativação do complexo NADPH-Oxidase, catalisando a transferência de elétrons do citosol através

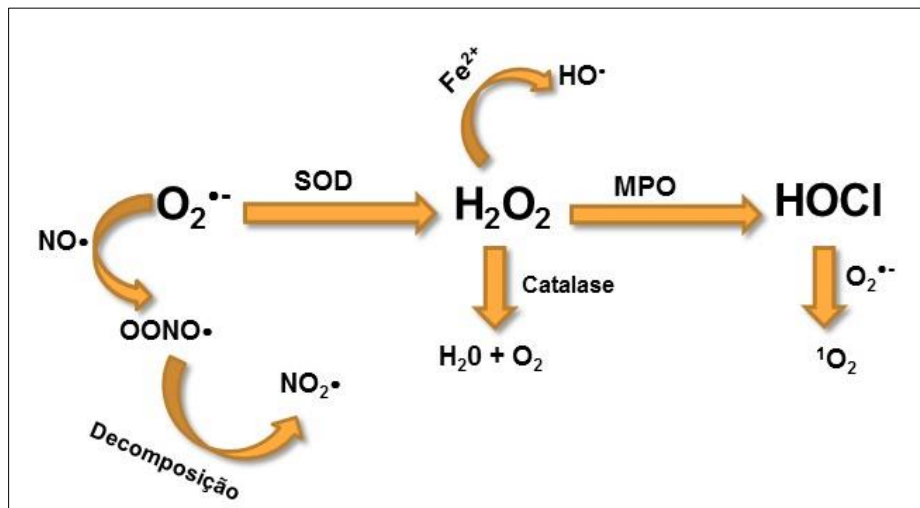
das membranas biológicas, tanto intracelular quanto extracelular. Quando ativada, os elétrons retirados da NADPH são transferidos através da cadeia de transporte de elétrons dentro da subunidade catalítica (gp91phox), constituída por uma molécula denominada Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD) ligada a uma cauda carboxi-terminal 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 $O_2^{\cdot-}$ tanto extracelular quanto fagolisosomal. (DRUMMOND et al., 2011; PANDEY; FULTON, 2011; HIRANO et al., 2015).

Em termos bioquímicos, as Nox catalisam a produção do radical ânion superóxido usando como doador de elétrons a coenzima NADPH (BARBIOR, 1999; BARBIOR, 2004), através da seguinte reação:



Uma vez gerado, $O_2^{\cdot-}$ sofre conversões para outras espécies reativas de oxigênio (HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998), como ilustra a figura 4.

Figura 4 - Reação da formação das espécies reativas de oxigênio e a ação de antioxidantes



Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2): O $O_2^{\bullet-}$ sendo inicialmente convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por dismutação espontânea, ou catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 tem atividade bactericida somente em altas concentrações, e o $O_2^{\bullet-}$ gerado exogeneamente, provavelmente não tem atividade bactericida direta. Mesmo não sendo considerado um radical livre, visto que não possui elétrons desemparelhados em sua última camada, o H_2O_2 é um metabólito altamente tóxico e deletério para as células, tem vida longa e é capaz de atravessar camadas lipídicas, podendo reagir com membranas biológicas. No entanto, pode ser neutralizado por peroxidases, como a glutathiona peroxidase ou catalase intracelulares, resultando na produção de água (H_2O) e oxigênio (O_2) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998; SILVA, 2001; BROWN; GRIENGLING, 2009).

Ácido Hipocloroso ($HOCl$): O H_2O_2 formado pode ser utilizado pela mieloperoxidase (MPO), enzima localizada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, para oxidar uma variedade de compostos aromáticos, além de oxidar o íon cloreto gerando o potente ácido hipocloroso

(HOCl). O HOCl é o principal e o mais potente microbicida produzido por essas células (SILVA, 2001). Por outro lado, é capaz de atacar biomoléculas de importância fisiológica, como tióis, aminas, aminoácidos, nucleotídeos e tecidos, visto que células de mamíferos não são capazes de inibir a ação deste radical por via catalítica não possuindo defesas enzimáticas contra oxidantes clorados (LAPENNA; CUCCURULLO, 1996; EL-BENNA et al., 2005; BROWN; GRIENDLING, 2009).

Oxigênio Singlete (1O_2): É o oxigênio molecular eletronicamente excitado, não possui elétrons desemparelhados. Pode ser produzido de duas formas: através da reação do H_2O_2 com HOCl, ou pela dismutação espontânea do $O_2^{\cdot-}$ (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SILVA, 2001; RADA et al., 2008).

Radical Hidroxila ($^{\cdot}OH$): Para a produção do radical hidroxila ($^{\cdot}OH$) existem dois mecanismos possíveis: 1. A reação de Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \leftrightarrow Fe^{3+} + ^{\cdot}OH + ^{\cdot}OH$), onde a redução do H_2O_2 é catalisada por metais de transição apropriados (íons ferrosos, por exemplo); ou 2. Pela reação de Haber-Weiss ($O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \leftrightarrow ^{\cdot}OH + ^{\cdot}OH + O_2$) (HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998; SILVA, 2001). Sua alta reatividade é confirmada por sua ligação extremamente rápida com metais, podendo causar danos ao as bases purínicas ou pirimídicas do DNA, caso este esteja fixado a um metal. Tem capacidade de inativar várias proteínas, como membranas celulares e enzimas, ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS) e iniciar a peroxidação lipídica, oxidando ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; LIMA; ABDALLA, 2001).

Óxido Nítrico (NO^{\cdot}): O Óxido Nítrico (NO^{\cdot}) é formado por via independente, pela ação da enzima óxido nítrico sintase e os neutrófilos não possuem grande produção deste radical, mas em

células endoteliais, como mencionado acima, o óxido nítrico é um importante vasodilatador e atua como molécula de sinalização em células endoteliais (SILVA, 2001; HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998).

Peroxinitrito (OONO[•]): Também pode ser produzido a partir do O₂^{•-} por meio de sua reação com o óxido nítrico (NO[•]), e pode se decompor dando origem a [•]OH e ao radical dióxido de nitrogênio (NO₂[•]), quando há uma desregulação na Nox2, a formação de peroxinitrito pode levar a uma disfunção endotelial e, portanto, aumento da pressão arterial (SILVA, 2001; HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998).

1.4 FAGÓCITOS: NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS

Os leucócitos, polimorfonucleares neutrófilos (PMN) e monócitos (PBMC), constituem a primeira barreira interna de imunidade inata e participam da primeira linha de defesa do organismo, desempenhando um papel essencial na defesa do hospedeiro contra patógenos microbianos e nas reações inflamatórias. (VASSELON; DETMERS, 2002).

Os neutrófilos compreendem mais de 50% dos leucócitos circulantes no organismo. São células polimorfonucleares, e constituem um dos meios mais poderosos de defesa do hospedeiro contra fungos e bactérias. São células originárias da medula óssea contendo em seu citoplasma grânulos que contém diversas enzimas proteolíticas (EL-BENNA et al., 2005; EL-BENNA; DANG; GOUGEROT-POCIDALO, 2008).

Esses grânulos citoplasmáticos incluem peroxidase-positivos primários, também conhecidos como grânulos azurófilos, composto pela enzima 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 contendo lactoferrina e catelicidina; e peroxidase-negativos terciários composto por gelatinases e glicoproteínas (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003; FLANNAGAN; COSÍO; GRINSTEIN, 2009; CHEN et al., 2011).

Estes fagócitos são capazes de hidrolisar polissacarídeos simples e complexos, como também proteínas e lipídios. Englobam e digerem os microrganismos através da ação de proteínas e enzimas microbidas digestivas contidas nos seus grânulos citoplasmáticos, descritos acima (FREIRE; QUELUZ, 1995; RINALDI et al., 2007). 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, como $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 . Essas EROs, associados aos peptídeos microbianos e proteases celulares formam um potente arsenal microbiano (HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998; BABIOR; COHEN, 2000; FLANNAGAN; COSÍO; GRINSTEIN, 2009).

Os neutrófilos circulantes fluem livremente num estado dormente, com baixa eficiência de captura e prisão de patógenos no endotélio quiescente/repouso. Quando há uma situação de infecção e inflamação, mediadores pró-inflamatórios induzem alterações no endotélio vascular. A expressão de moléculas de adesão, como selectinas (e-selectinas) integrinas (CAMP-1 e VCAMP-1), promovem a atração da célula pelo endotélio e garantem a migração dos leucócitos através do endotélio vascular (EL-BENNA et al., 2005; EL-BENNA; DANG; GOUGEROT-POCIDALO, 2008; MOON et al., 2009).

A internalização do patógeno é caracterizada por uma extensão da membrana plasmática ao redor da partícula, formando o chamado fagossoma. A partir deste fagossoma, que se funde com as vesículas secretórias e os grânulos, forma-se 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; ELBENNA; DANG; GOUGEROT-POCIDALO, 2008; FLANNAGAN; COSÍO; GRINSTEIN, 2009).

Os monócitos constituem cerca de 5% dos leucócitos totais do sangue e assim como os neutrófilos, monócitos/macrófagos são fagócitos essenciais na imunidade inata.

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. Os monócitos contêm cerca de um terço apenas da quantidade de grânulos azurófilos em relação ao neutrófilo. 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 nos mononucleares (KLEBANOFF, 2005; HANSSON; OLSSON; NAUSEEF, 2006).

Os macrófagos são potentes células efetoras antimicrobianas que participa da resposta inflamatória clássica. A fase de resposta aguda é atribuída pelos altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como a TNF- α (Fator de necrose tumoral – alfa) (METSIOS et al., 2010).

A liberação de TNF- α através da ativação de fatores de transcrição redox sensíveis, como o fator NF- κ B, pode iniciar a ativação do complexo NADPH-oxidase. Descobertas recentes mostram a influência de TNF- α no mecanismo de disfunção endotelial, induzindo a ativação de NADPH oxidase e aumentando a produção de ânion superóxido prejudicando a vasodilatação do endotélio. TNF- α induz o estresse oxidativo em células neuronais,

pela ativação da NADPH-oxidase através um mecanismo mediado por ceramida. Além disso, TNF- α ajuda a preparar o estresse oxidativo de neutrófilos através da fosforilação parcial de p47phox, o componente citosólico mais fosforilado do complexo NADPH-oxidase (HUANG et al., 2012; BARTH et al., 2012). Muitas substâncias capazes de inibir a NADPH-oxidase são também substâncias capazes de reduzir a produção de citocinas.

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória potente, que suprime a produção TNF- α por macrófagos. IL-10 é produzida por macrófagos, células dendríticas (DC), células B e vários subconjuntos de CD4⁺ e CD8⁺ (COUPER; BLOUNT; RILEY, 2008).

A IL-10 tem emergido como uma citocina imunorreguladora chave durante a infecções com vírus, bactérias, fungos, protozoários, melhorando a excessiva resposta de Th1 e CD8⁺ das células T (Caracterizado pelo excesso de produção de IFN- γ e TNF- α), que são responsáveis por grande parte da imunopatologia associado com infecções (COUPER; BLOUNT; RILEY, 2008).

Em um estudo conduzido por Kassin e colaboradores (2011), observou-se um aumento significativo na atividade da NADPH-oxidase, quando comparada com o controle e após a incubação com IL 10. O efeito sobre a atividade da NADPH-oxidase foi significativamente reduzido quando as células foram pré - estimuladas com IL-10 (KASSAN et al., 2011).

1.5 CÉLULAS ENDOTELIAIS

Células endoteliais geram espécies reativas de oxigênio como O₂^{•-} e H₂O₂, e os componentes de NADPH Oxidase em células endoteliais são análogos à NADPH Oxidase presente nos fagócitos, apresentando os mesmos componentes fundamentais, incluindo a gp91phox e p47phox, sendo suas sequencias 90% homólogas aos

neutrófilos (LI; SHAH, 2002; LASSÈGUE; CLEMPUS, 2003; MORA-PALE et al., 2012; COMINACINI et al., 2003).

Estudos sugerem que a produção de EROs pelas células endoteliais ocorre de forma contínua, diferente do que ocorre em fagócitos, inclusive num nível baixo ou ausente de estímulos, sugerindo que parte da oxidase é previamente montada, no entanto, a translocação após estímulo foi observada em células endoteliais e vasculares (LI; SHAH, 2002; LASSÈGUE; CLEMPUS, 2003).

Outra diferença entre a produção de EROs por células endoteliais e por fagócitos é que a maior produção de EROs produzidas por células endoteliais ocorrem de forma intracelular (LI; SHAH, 2002; MCCANN; ROULSTON, 2013; KOMIYA et al., 2015).

Um estudo conduzido por Li e Shah (2002), confirma que a enzima está associada ao citoesqueleto intracelular, especialmente distribuído de forma perinuclear. O estudo nos confirma por microscopia confocal a associação da gp91phox com microtubos do citoesqueleto, na região perinuclear, sugerindo, portanto, que os elementos do citoesqueleto pode ser um suporte para que os componentes da enzima oxidase se liguem rapidamente e que a estabilidade desta ligação seja mantida. (LI; SHAH, 2002)

Estudo feito em 2003, confirma que ocorre a translocação de p47phox e Rac1 em ensaios com cultura celular de tecido umbilical humano (HUVEC) e que a NADPH Oxidase endotelial pode ser a fonte de espécies reativas geradas pela ativação do receptor endotelial LOX-1. (COMINACINI et al., 2003)

Devido sua localização, entre o tecido e o sangue, as células endoteliais são as primeiras a sofrerem dano, como disse anteriormente a migração das células sanguíneas (Neutrófilos e monócitos) para o local da infecção, através da liberação de mediadores pró-inflamatórios. Células do endotélio vascular são

fonte de geração de espécies reativas de oxigênio ao mesmo tempo que é o alvo destas (ARNOULD; MICHIELS; REMACLE, 1994).

Endotélio tem um importante papel na regulação dos tônus vasculares, sendo o óxido nítrico o principal fator de relaxamento endotelial. No entanto, esse relaxamento está ligado à diminuição da produção de NO• ou de sua atividade biológica no endotélio. Quando a geração de O₂^{•-} está aumentada em artérias com aterosclerose, o ânion superóxido pode inativar o NO•, formando peroxinitrito. A inativação desse NO• tem sido uma importante causa de disfunção endotelial. (COMINACINI et al., 2003)

1.6 NADPH OXIDASE: SEUS EFEITOS FISIOLÓGICOS E PATOLÓGICOS

A NADPH Oxidase tem papel fundamental na regulação de processos fisiológicos, incluindo crescimento celular, diferenciação celular, apoptose e remodelação do citoesqueleto. Também apresentam funções especializadas como a defesa do organismo (Nox2), formação do ouvido interno (Nox3), iodação do hormônio da tireoide (Duox2) e controle dos tônus vasculares (Nox2) (BROWN; GRIENGLING, 2009).

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. É o responsável pela gênese e progressão de doenças como aterosclerose, doenças vasculares associadas ao diabetes, artrite reumatoide, 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).

Aterosclerose é uma inflamação crônica causada por altos níveis de colesterol, levando a formação de placas e o endurecimento das artérias. Estes efeitos aumentam o risco de infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e outras complicações sistêmicas. A progressão desta doença é induzida por diversos mecanismos, incluindo o estresse oxidativo. (WEN et al., 2013). Estresse oxidativo está associado a todos os fatores de risco de doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão, hipercolesterolemia, fumo, obesidade, diabetes e está envolvido em diversos processos da formação de placas de ateroma. Um dos mecanismos mais caracterizado para a comprovação que EROs promove doenças vasculares é a desregulação das vias de sinalização do óxido nítrico (vasodilatador). $O_2^{\cdot-}$ reagindo com NO^{\cdot} promove a formação de peroxinitrito (BROWN; GRIENGLING, 2009).

Inúmeros estudos clínicos mostram que microinflamação tem sido associada com diversos processos que pode diretamente ou indiretamente levar a formação da aterosclerose. Um grande número de mediadores inflamatórios é liberado, como $TNF-\alpha$ que induz a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e facilitam a infiltração de leucócitos nestas células, um importante passo no desenvolvimento da aterosclerose (CHAI et al., 2008).

Uma desregulação ou ausência de certas isoformas de Nox tem sido reportada como causa de uma variedade de doenças, como a Doença Granulomatosa Crônica (DGC), causada pela ausência da Nox2 ativa ou suas subunidades. (BROWN; GRIENGLING, 2009). Pacientes com DGC não são capazes de gerar ânion superóxido e a doença é caracterizada, portanto, com desenvolvimento de severas infecções que são de difícil tratamento

e frequentemente fatais (YU et al., 1998; BARBIOR, 2004; CROTZER et al., 2012).

Doenças neurodegenerativas são caracterizadas por uma perda longa e gradual da população de neurônios no sistema nervoso central (SNC). Mais de 36 milhões de pessoas sofrem com a Doença de Alzheimer ou Doença de Parkinson. Alto consumo de oxigênio, alta produção de EROs, grande oxidação de lipídeos, baixa defesa de antioxidantes e uma renovação e regeneração restrita dos neurônios torna as células neurais suscetíveis a ataques oxidativos (GAO; ZHOU; HONG, 2012; ZHANG et al., 2016).

Muitos estímulos inflamatórios podem aumentar a atividade da Nox na microglia e causar uma morte neural, e estes efeitos ocorrem predominantemente via Nox2. Estudos recentes mostram que EROs produzidas pela Nox2 são gerados por neurônios em resposta à angiotensina II circulante, levando a um aumento do fluxo simpático, causando hipertensão, ativação das células T circulantes e aumento da inflamação do sistema vascular. Por outro lado, as EROs produzidas por NADPH Oxidase ajudam a manter o fluxo sanguíneo cerebral e a função neural (DRUMMOND et al., 2011).

1.7 INIBIDORES DA NADPH OXIDASE

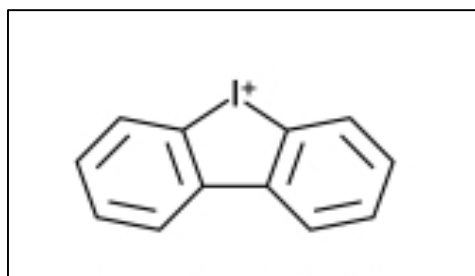
Para ser considerado um potente inibidor de NADPH Oxidase, sua atividade inibitória não pode ser por seu potencial *scavenger* de radicais livres, ou com nenhuma interferência com reagentes de detecção de EROs ou inibição de vias anteriores, mas sim inibindo a atividade específica da enzima NADPH Oxidase (HIRANO et al., 2015).

Inibidores de NADPH oxidase podem agir de diferentes formas tais como, bloquear sua transferência de elétrons, prevenir e/ou inibir o acesso à oxidase pela interação com suas subunidades

a nível molecular, 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). Atualmente, não existe um inibidor de NOX específico e potente que seja capaz de inibir a produção de EROs em células que expressam NADPH oxidase sem que a produção de EROs por outras fontes, enzimáticas ou não enzimáticas, seja bloqueada (JAQUET et al., 2009; DRUMMOND et al., 2011)

Um dos inibidores mais utilizados em pesquisas, *diphenyleneiodonium* (DPI) (Figura 5), bloqueia a produção de EROs em neutrófilos, bloqueando a transferência de elétrons pelo flavocitocromo b558, geradora de $O_2^{\cdot-}$. Isto o torna um inibidor de outras enzimas dependentes de flavinas, como a oxido nítrico sintetase, xantina oxidase, complexo mitocondrial I, citocromo p450 redutase, além de inibir todas as outras isoformas da família Nox. In vivo, pode estimular a captação de glicose nas células musculares esqueléticas, e reduzir o consumo de oxigênio, 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; HUTCHINSON et al., 2007; HIRANO et al., 2015; ZHANG et al., 2016.)

Figura 5 - Estrutura molecular do DPI



Outro inibidor comumente estudado, é o PR-39. PR-39 é um peptídeo rico em prolina e arginina, que se liga ao domínio SH3, que

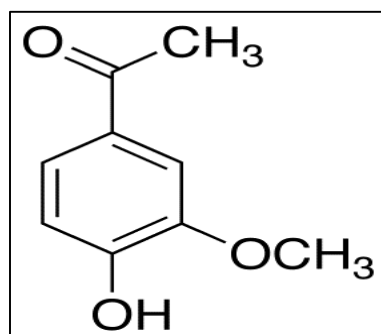
em neutrófilos é conhecido por inibir a translocação da proteína p47phox para a membrana, inibindo, portanto, a ativação da NADPH Oxidase (JOHNSON et al., 2002). *In vivo*, estimula a angiogênese e tem efeito protetor contra isquemia. Porém, seu uso é severamente restrito devido sua susceptibilidade de ligação com outras proteínas que contenham domínios SH3 (KAWAHARA et al., 2005; DRUMMOND et al., 2011; KLENIEWSKA et al., 2012).

As estatinas, além do seu potencial efeito redutor de colesterol, boa parte do seu efeito antioxidante pode ser atribuída a sua inibição da acetilação de Rac, prevenindo então sua ligação às frações de membrana. Podem também diminuir a expressão de p22phox e NOX1. As estatinas também inibem a produção de EROs induzida por angiotensina-II (ANG-II) e fatores de crescimento epidermais (EGF), inibindo a atividade da Rac. *In vivo*, elas aumentam a expressão de eNOS e são efetivas no tratamento de doença cardiovascular, especialmente em pacientes com níveis elevados de colesterol, devido a sua conhecida atividade redutora de colesterol (WASSMANN et al., 2002; LASSEGUE; CLEMPUS, 2003; KLENIEWSKA et al., 2012).

Interessantemente, estudos mostram que a região PRR tem receptores para polifenóis, por consequência, ácido fenólicos têm sido muito utilizados como inibidores de NADPH Oxidase (MORA-PALE et al., 2009).

A apocinina, um composto pertencente à classe dos metóxi-catecóis, (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona) (Figura 6), tem sido um dos compostos fenólicos mais utilizados como um eficiente e não tóxico inibidor do complexo NADPH oxidase em muitos modelos experimentais (MORA-PALE et al., 2012; ZHANG et al., 2016).

Figura 6 - Estrutura molecular da apocinina



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, este metabólito ativo, portanto, impede a agregação e translocação dos componentes citosólicos do complexo NADPH oxidase para a membrana. O mecanismo de inibição da enzima envolve o comprometimento da translocação do componente p47phox citosólico do complexo NADPH oxidase para a membrana, inibindo assim sua ligação ao p22phox. (JOHNSON et al., 2002; DODD-O et al., 2004; MORA-PALE et al., 2009). *In vitro* e *ex-vivo*, tem efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes como a redução do burst oxidativo dos fagócitos, a redução da ativação, da quimiotaxia de polimorfonucleares granulócitos, inibição de OONO⁻ e H₂O₂ e em células não-fagocíticas, age como um potente antioxidante e não como inibidor de NADPH Oxidase. (DRUMMOND et al., 2011; KLENIEWSKA et al., 2012).

Outro composto fenólico tem chamado a atenção por seu potencial antioxidante, um derivado do ácido cafeico, chamado éster fenetil do ácido cafeico (CAPE). É um componente ativo do própolis, derivado do mel de abelha e tem sido utilizado na medicina popular durante muitos anos. Além da sua propriedade antioxidante, CAPE é conhecido por seu potencial anti-inflamatório, antimicrobiano e imuno-modulatório.

1.8 ÁCIDOS FENÓLICOS E ÉSTER FENÉTILICO DO ÁCIDO CAFEICO

Ácidos fenólicos estão largamente distribuídos em vegetais e se destacam por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-carcinogênicas, entre outras. (MADDOX; LAUR, 2010; KUDUGUNTI et al., 2010; KUDUGUNTI et al., 2011).

Inúmeros relatos têm apontado para uma melhora significativa nas propriedades biológicas de ácidos fenólicos quando os mesmos são esterificados. Neste sentido, em um trabalho recente de nosso grupo de pesquisa, verificou-se que ésteres do ácido protocatecúico foram duas vezes mais eficientes que seu precursor ácido no sequestro de radicais e inibição do complexo NADPH-oxidase (DE FARIA et al., 2012).

A porção hidrofóbica do galato de dodecila está associada com atividade antioxidante na prevenção de peroxidação lipídica mitocondrial (KUBO et al., 2002); Chalas e colaboradores (2001) verificaram que a esterificação de ácidos fenólicos foi capaz de aumentar suas eficiências na inibição da peroxidação de LDL e no ataque radicalar em membranas eritrocitárias por AAPH (CHALAS et al., 2001); galato de metila e galato de propila foram mais eficazes na inibição da peroxidação de fosfolípidos cerebrais que seu precursor ácido gálico, quando em presença de HOCl (ARUOMA et al., 1993).

Em estudos realizados por Lu e colaboradores (2006), verificou-se que o efeito neuroprotetor de derivados de ácido gálico varia de acordo com a cadeia na ordem galato de metila > galato de propila > galato de octila > galato dodecil. Estes resultados sugerem que esterificação do ácido desempenha um importante papel no efeito antioxidante. Este estudo mostrou que o pré-tratamento com os derivados de ácido gálico suprimiu o estresse oxidativo induzido

pela 6-hidroxi-dopamina (uma conhecida neurotoxina que induz estresse oxidativo em células neurais levando-as à apoptose pela produção de EROs) (LU et al., 2006).

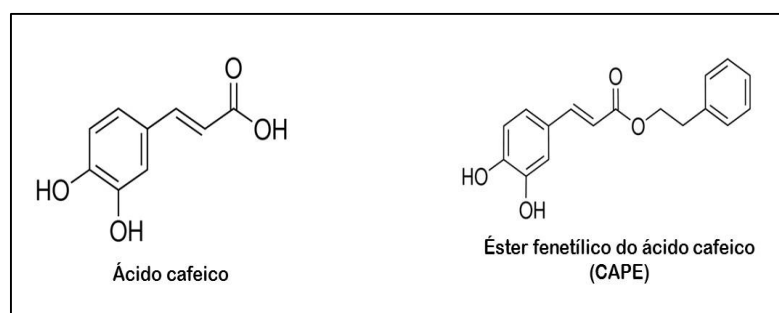
Fiuzza e colaboradores (2004), em estudo com derivados de ácido cafeico e ácido gálico com efeitos anticarcinogênicos sugerem que a atividade citotóxica de compostos fenólicos depende da taxa de incorporação nas células diretamente relacionada, tanto com sua lipofilicidade, quanto sua capacidade antioxidante (FIUZA et al., 2004). Este estudo nos mostra que ésteres propílicos (cafelato e galato) mostraram um efeito antitumoral considerável, contra as linhagens HeLa e L-132, ao comparar com seus análogos octil e metil. Reis e colaboradores (2010) ao testar o ácido protocatecúico e alguns ésteres alquílicos na inibição da oxidação de ácido linoleico, mostraram que a incapacidade do ácido protocatecúico em bloquear inicialmente a oxidação de ácido linoleico pode estar ligada à dificuldade da sua difusão através da matriz lipídica (REIS et al., 2010).

Ácido hidroxicinâmicos constituem uma grande classe de polifenóis largamente distribuída em frutas, vegetais e bebidas, como o café. O Ácido cafeico (Figura 7) é um dos mais abundantes hidroxicinâmicos encontrados na dieta humana. Pode ser encontrado em sua forma livre ou conjugado com outros compostos. Entre os mais comuns está o conjugado do ácido cafeico com ácido quínico, também conhecido como ácido clorogênico. Muito encontrado em café, mirtilo e maçãs (GONTHIER et al., 2006).

Derivados do ácido cafeico são naturalmente encontrados e reportados não somente por suas propriedades antioxidantes, mas também como por suas características anti-inflamatórias, antibacterianas e anticarcinogênicas. Entre os derivados do ácido cafeico mais amplamente estudado, encontra-se o éster fenílico de ácido cafeico (CAPE) (Figura 7) (KUDUGUNTI et al., 2010; GASPAR

et al., 2010; KUDUGUNTI et al., 2011). Isolado de própolis, suas atividades antibióticas, anti-inflamatórias, antioxidantes, antivirais e a especialmente sua capacidade antitumorigênica tem sido amplamente estudada. (KUDUGUNTI et al., 2010; WATANABE et al., 2011; ZHAO et al., 2012; HA et al., 2012).

Figura 7 - Estrutura molecular do ácido cafeico e éster fenetílico do ácido cafeico



Neste sentido, Kudugunti e colaboradores (2010) mostraram em um trabalho recente diversos análogos do ácido cinâmico, entre eles ácido cafeico, ácido clorogênico e CAPE, seus resultados mostraram o CAPE é 40 mil vezes mais solúvel que o ácido cafeico em meio lipídico, portanto, CAPE pode particionar mais facilmente que seu precursor em membranas lipídicas (KUDUGUNTI et al., 2010).

No entanto, a substituição 3,4 di-hidroxil no anel aromático fornece ao CAPE a sua principal capacidade de *scavenger* de radicais livres. (MOTAWI; DARWISH; EL TAWAB, 2010). Uma das principais propriedades das EROs é reagir com a membrana lipídica das células, causando peroxidação lipídica, o que causa uma desorganização na estrutura e conseqüentemente na função celular. O CAPE, por sua capacidade antioxidante, é capaz de neutralizar a ação do ânion superóxido, radical hidroxila, oxigênio singlete e radical peroxila, além de proteger a membrana lipídica celular (MOTAWI; DARWISH; EL TAWAB, 2010; ZHAO et al., 2012).

Estudos relatam a capacidade do CAPE em inibir a transcrição do fator NF- κ B, um dos principais fatores de transcrição envolvido na regulação da expressão dos genes responsáveis por proliferação celular e resposta inflamatória. Isso mostra que, inibindo este fator, há uma consequente diminuição na produção de enzimas pró-inflamatórias, citocinas e supressão da enzima MPO através da redução de TNF- α , que estimula a adesão dos neutrófilos no endotélio (MOTAWI; DARWISH; EL TAWAB, 2010; WATANABE et al., 2011; ZHAO et al., 2012).

A lipofilicidade e hidrofobicidade destas substâncias pode ser um fator decisivo em seus efeitos biológicos, mesmo quando o grupo oxidável dos mesmos não é alterado em sua esterificação. Sendo assim, estudar os efeitos biológicos em leucócitos causados pelo aumento da lipofilicidade de derivados do ácido cafeico nos permite avaliar se essas substâncias são candidatas a possíveis inibidores da enzima NADPH Oxidase e agentes terapêuticos promissores no tratamento de doenças inflamatórias.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

Este projeto visa ampliar e elucidar os conhecimentos sobre a dependência da hidrofobicidade no que diz respeito às características antioxidantes e inibidoras sobre a produção de oxidantes em leucócitos ativados.

2.1 Objetivos específicos

- I. Explorar a relação entre a estrutura molecular, as propriedades químicas e atividades biológicas do composto éster fenílico do ácido cafeico (CAPE) como inibidor do complexo enzimático NADPH oxidase;
- II. Comparar sua eficácia com o seu precursor, ácido cafeico (CA) e os derivados éster fenílico do ácido cinâmico (CIPE) (C4) e o ácido clorogênico (ClorA).
- 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 antiinflamatórias.
- V. Avaliar o mecanismo de ação das substâncias frente a translocação da proteína p47phox.

3. Materiais e Métodos

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. (Protocolo de aprovação: CEP/FCF/Car nº 540.142 - conforme documento apresentado no Apêndice 1).

3.2 CASUÍSTICA

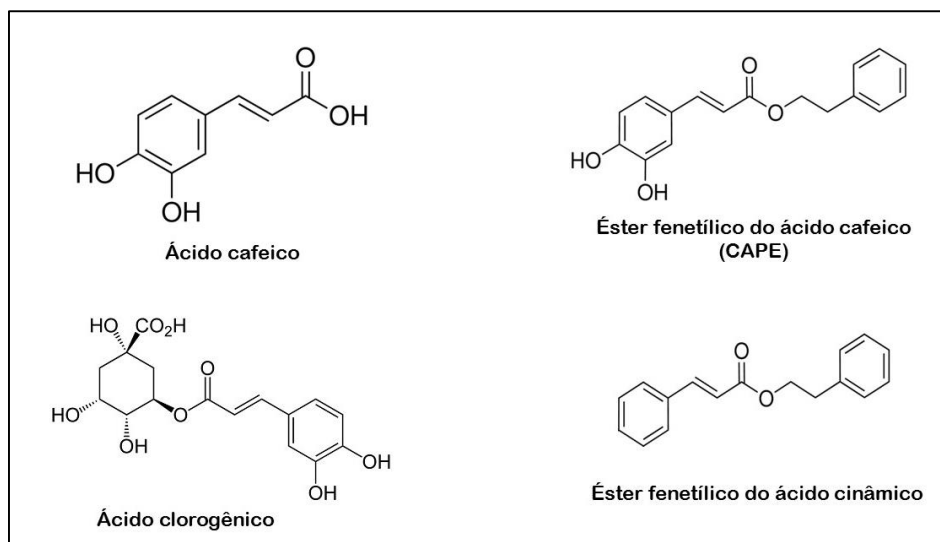
Após esclarecimento do projeto de pesquisa, voluntários saudáveis com idade entre 25 e 45 anos foram submetidos à coleta do material biológico, sangue periférico. As amostras de sangue foram colhidas por punção venosa, utilizando-se sistema de coleta a vácuo ou seringas descartáveis, em tubos estéreis 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 cafeico e derivados do ácido cafeico 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).

3.3 SUBSTÂNCIAS DE ESTUDO: ÁCIDO CAFEICO E DERIVADOS

Todos os ácidos fenólicos utilizados neste estudo foram adquiridos de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). São eles: Ácido cafeico, Éster fenetílico do ácido cafeico, ácido

clorogênico e éster fenílico do ácido cinâmico, ilustrados na figura 8.

Figura 8 - Estrutura dos ácidos fenólicos utilizados



3.4 ESTIMAÇÃO DO LOGARITMO DE COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (LOG P)

A hidrofobicidade molecular dos compostos em estudo foram calculados com base em seus valores de log P (coeficiente de partição n-octanol/água) com base no método de Crippen e realizados utilizando software ChemDraw (ChemDraw Ultra 7.0.1, CambridgeSoft) (GHOSE; 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 mol L⁻¹, uma folha de platina de 0,5 cm² como contra eletrodos e um eletrodo de trabalho de carbono vítreo com 0,07 cm² 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 de 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 taxa de varredura de 5 mV s⁻¹.

3.6 ESTUDO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE (REDUÇÃO DO RADICAL ESTÁVEL DPPH)

A capacidade sequestradora de radicais livres do CAPE e derivados do ácido cafeico 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 em diferentes concentrações foram incubadas durante 30 minutos, no escuro, em solução etanólica de DPPH a 100 µM (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA). O Trolox foi utilizado como padrão deste ensaio. 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 sequestro do radical DPPH foi calculado tendo como referência o controle, na ausência de tratamento:

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

A partir dos valores das porcentagens de inibição foi calculado o EC50 das amostras, ou seja, a capacidade da substância analisada de reduzir 50% do radical DPPH presente.

3.7 INIBIÇÃO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA PELO MÉTODO ÓLEO TUNGUE

Primeiramente, preparou-se uma solução de Brij 35 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) dissolvendo 4mg do mesmo em 100 mL de água milli-Q (Millipore, Belford, MA, USA). Posteriormente, diluiu-se 5 mg de óleo Tung em 25 mL de solução de Brij previamente preparada em frasco âmbar. Preparou-se também uma solução 4 mM de AAPH (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA). Para uso nas reações foi preparado uma solução 1:1 de tag (Tag: solução de brij + óleo tung e PBS). Em placa foram adicionados solução de APPH, Tag, na ausência (controle) ou na presença dos compostos de estudo em poços de uma microplaca, com volume final de 300 µL. Como padrão deste ensaio, utilizou-se o composto Trolox. O progresso das reações foi imediatamente monitorado pela diminuição da absorbância a 273 nm. As medições foram realizadas a cada minuto durante 4 horas, a 37°C, com 5 segundos de agitação antes de cada medida, utilizando um leitor de microplacas (Spectramax M2 Microplate, Molecular Devices, EUA) (LAGUERRE et al., 2008).

3.8 AÇÃO REDUTORA SOBRE RADICAIS PEROXILA/AAPH

Este ensaio se baseia no decaimento da fluorescência da piranina quando submetido à oxidação por radicais peroxila. Utilizou-se uma solução de 5 mM do composto fluorescente piranina (Sigma-

Aldrich®, St. Louis, MO, USA) e 40 mM de AAPH em PBS (pH 7,4) a 37°C na ausência (controle) ou na presença dos compostos de estudo em poços de uma microplaca preta durante 3 horas. Como padrão utilizo-se o composto Trolox. O volume final da reação foi de 300 µL. O decaimento de fluorescência da piranina foi monitorado utilizando os comprimentos de onda de excitação de 456nm e comprimento de onda de emissão de 512nm em um leitor Spectramax M2 Microplate (Molecular Devices, EUA). A capacidade antioxidante foi avaliada em função do tempo de indução, ou seja, o atraso no decaimento de fluorescência da piranina provocado pela presença dos compostos em estudo.

3.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO (FRAP)

O ensaio do FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), Poder Antioxidante de Redução de Ferro, estima a capacidade dos antioxidantes em reduzir o complexo de Ferro Férrico Tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) ao complexo de Ferro Ferroso Tripiridiltriazina (Fe^{2+} -TPTZ) em pH3.6, formando uma solução de coloração azul intensa com absorção máxima de 593 nm, sendo possível medir o efeito antioxidante monitorando a formação do complexo Fe^{2+} -TPTZ com um espectrofotômetro. O reagente TPTZ foi preparado usando uma solução de TPTZ em solução $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, a solução trabalho foi preparada misturando tampão acetato pH3,6, a solução TPTZ e a solução $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e esta mistura foi chamada solução FRAP. Pipetou-se em microplaca 96 poços, 290 µL da solução de FRAP e 10µL das substâncias de estudo e o padrão trolox, em diferentes concentrações. Em seguida, a placa foi incubada em uma estufa a 37°C por 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 593 nm (LUQMAN et al., 2012).

3.10 SEPARAÇÃO DOS GRANULÓCITOS NEUTRÓFILOS (PMN) E MONÓCITOS (PBMC) POR GRADIENTE DUPLO DE DENSIDADE EM FICOLL-HYPAQUE

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.

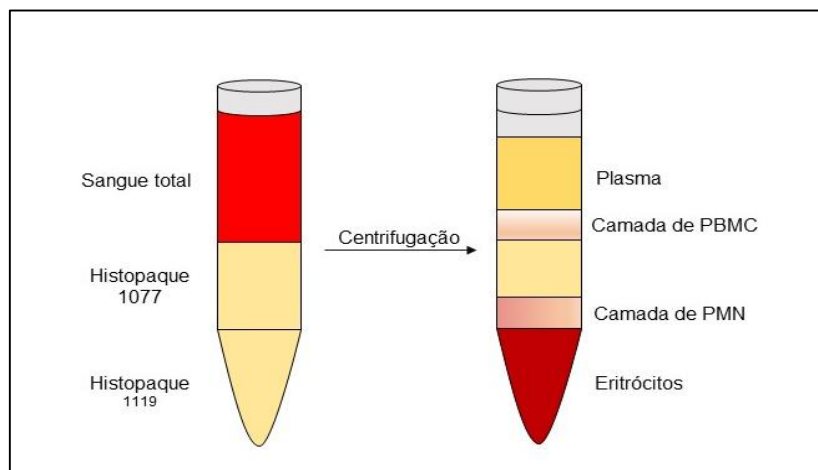
Método que utiliza HISTOPAQUE®-1119 e HISTOPAQUE®-1077 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) para separar as células mononucleares e os polimorfonucleares.

Em tubo cônico e estéril foram adicionados 3 mL de HISTOPAQUE®-1119, cuidadosamente acrescentou-se 3 mL de HISTOPAQUE®-1077 e 6 mL de sangue total. Centrifugou-se a 700 x g por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, formaram-se duas camadas distintas de células separadas pela sua densidade, como está ilustrado na figura 6. O plasma e o Histopaque foram aspirados utilizando-se uma pipeta de Pasteur e desprezados.

As camadas compostas de PMN e PBMC foram transferidas para outro tubo cônico estéril e adicionados 10 mL de tampão PBS (pH7,4) para 1ª lavagem, centrifugando-se por 10 minutos. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e adicionado novamente 10 mL de PBS para a segunda lavagem. Novamente, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 1,0 mL de PBS suplementado (10 mL de PBS mais glicose (1 mg/mL), cloreto de magnésio (0,5 mM) e cloreto de cálcio (1 mM)).

A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer, onde as células foram diluídas a 1/20 (10 µL de suspensão de polimorfonucleares em 190 µL de Líquido de Lázarus). Após a contagem a suspensão celular foi ajustada para a concentração de 5×10^6 células/mL e empregadas nos ensaios na concentração final de 1×10^6 células/mL.

Figura 9 - Demonstração ilustrativa da separação celular por Histopaque 1077 e 1119



3.11 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 cafeico e seus derivados 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 (1×10^6 células/mL) foram incubadas em PBS (pH7,4) na presença ou na ausência (controle da reação) das substâncias de estudo nas concentrações de 100 μ M, 10 μ M e 1 μ 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 μ L. Decorridos os tempos de incubação, 50 μ L da solução da reação foram adicionados a 20 μ 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).

3.12 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DO RADICAL $O_2^{\cdot-}$ POR LEUCÓCITO ATIVADOS. (ENSAIO QUIMILUMINESCENTE DEPENDENTE DE LUCIGENINA)

A quimiluminescência dependente de lucigenina é uma técnica para detecção de ânion superóxido extracelular, sensível, reproduzível e confiável. Nessa reação, o $O_2^{\cdot-}$ reduz a lucigenina para seu radical cátion, que reage com um segundo ânion superóxido para formar a molécula rica em energia dioxetano, que emite um fóton (KITAGAWA et al., 2003).

Foi preparada uma solução estoque de lucigenina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) 250 μ M dissolvendo 25 μ L desta em 975mL de tampão PBS, estando uma concentração final a 10 μ M. O estímulo do “*burst*” oxidativo foi PMA (100 nM). Para realização dos ensaios adicionou-se a placa de leitura: tampão PBS suplementado, suspensão celular de neutrófilos (1×10^6 células/mL), lucigenina (1×10^{-5} M), as substâncias em diferentes concentrações (10 μ M e 1 μ M) e o estímulo do “*burst*” oxidativo, em um volume final de 250 μ L. Como padrão utilizamos um conhecido inibidor de NADPH Oxidase, o composto Apocinina. Após posicionamento da placa na câmara de leitura no luminômetro (Centro Microplate Luminometer LB960, Berthold Technologies, Oak Ridge, TN, USA), o monitoramento da reação foi iniciado. O tempo de reação foi padronizado em 30 minutos. (KANEGAE et al., 2007; KITAGAWA et al., 2003).

A emissão de luz integrada foi utilizada como um parâmetro analítico para o $O_2^{\cdot-}$ extracelular 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 foram incubadas na ausência das substâncias testadas.

3.13 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 à 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 (1×10^6 células/mL) foram pré-incubadas a 37°C durante 15 minutos em PBS suplementado na presença do ácido cafeico, ácido clorogênico e ester fenetílico do ácido cafeico e o padrão do ensaio, a apocinina (concentrações finais de 10 μ M e 1 μ M). Em seguida, WST-1 (500 μ M) foi adicionado à placa. PMA (100nM) foi utilizado para estimular a produção do radical ânion superóxido pelas células e a redução do WST-1 foi medida espectrofotometricamente por 30 minutos a 450 nm, a uma temperatura de 37°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.

3.14 INIBIDORES DA PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO PELO SISTEMA ENZIMÁTICO XANTINA/XANTINA OXIDASE

Através da reação de redução do WST-1 (sal tetrazólio sulfonado) à sais de formazana solúvel pelo ânion superóxido, o qual

é produzido via xantina/xantina oxidase, é possível avaliar a inibição deste radical após o tratamento com a substância de interesse. Em microplaca, foram adicionados em cada poço: PBS (pH7,4), xantina (0,1 mM), a substância a ser testada em diferentes concentrações, WST-1 (0,5 mM) ((Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e por último, xantina oxidase (0,05 μ M/mL). A redução do WST-1 pelo $O_2^{\cdot-}$ foi medida por espectrofotômetro utilizando um leitor de placa (SpectraMax M2, MolecularDevices). Para o branco, além das substâncias, a xantina oxidase também não foi adicionada. Incubou-se por 30 minutos a 37°C e a leitura foi realizada a 450 nM em ponto final.

O resultado foi obtido a partir da determinação da produção de $O_2^{\cdot-}$ no controle negativo, na ausência de tratamentos com as substâncias de estudo, em relação à inibição do radical nas amostras, onde as substâncias foram adicionadas a reação.

3.15 DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EXTRACELULAR POR AMPLEX® 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) ativadas utilizando o Amplex® 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 preta, foram adicionados PBS suplementado e 1×10^5 células/mL, as quais foram incubadas na presença das substâncias testadas neste estudo; ou 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 (100 nM)

(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.

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 (pH7,4) contendo taurina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) (10 mM), as células PMN (1×10^6 células/mL) e ácido cafeico, CAPE, ácido clorogênico (10 μ M e 1 μ M) e fluortryptamina, um conhecido inibidor de H_2O_2 , utilizado como padrão deste ensaio. Uma pré-incubação foi realizada 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 μ g/mL) e os tubos foram centrifugados a 300 x g. Duzentos microlitros do sobrenadante foram transferidos para uma placa de 96 poços e 50 μ L de uma de 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, onde as células foram incubadas na ausência das substâncias testadas.

3.17 PRODUÇÃO DE HOCl: MPO/H₂O₂ (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 (pH7,4) contendo taurina (5 mM), as substâncias testadas nas concentrações de 10 µM e MPO (Planta Natural Products, Vienna, Austria) (50 nM). As reações foram desencadeadas pela adição de H₂O₂ (50 µM). Como padrão utilizou-se a fluortryptamina. 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 µL. Decorrido o tempo de incubação, as reações foram interrompidas pela adição de catalase (20 µg/mL) e o acúmulo de taurina cloramina foi medido após a adição de 50 µL 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, no 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 DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO INTRACELULAR ENSAIO DE DIHIDRODAMINA 123 (DHR) POR CITOMETRIA DE FLUXO

Este ensaio foi realizado sob a supervisão e colaboração da Dra. Patricia Palmeira do Laboratório de Investigação Médica (LIM-36) do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas – FMUSP.

A avaliação da inibição de H₂O₂ intracelular produzido por neutrófilos e monócitos ativados com PMA ou *Staphylococcus aureus* foi realizada utilizando o DHR (Sigma-Aldrich®, 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 3x10⁵ leucócitos/mL. Em seguida, o ácido cafeico e seu éster, éster fenílico do ácido cafeico 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 (pH7,4). 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 FACSTM *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 ressuspendidas 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 neutrófilos 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 H₂O₂. 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 H₂O₂ pelas células. Os valores obtidos nesta produção espontânea foram descontados durante as análises no *software FlowJo*.

3.19 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 cafeico e CAPE poderia resultar numa possível inibição ou interferência desta função efetora.

Para tanto, vale ressaltar que no ensaio descrito no item 3.15 foram utilizadas bactérias *Staphylococcus aureus* marcadas com iodeto de propídio. A bactéria marcada com iodeto de propídio foi cedida do grupo de pesquisa da Dra. Patrícia 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*.

3.20 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 (1×10^6 células/mL por poço) foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco®, 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 CO₂ 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 foram testadas nas concentrações de 20 µM e 70 µM, e adicionados a seus respectivos poços (com exceção dos controles positivo e negativo) e as placas foram mantidas novamente em estufa de 5% de CO₂ 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 CO₂ a 37°C e após 18 horas os sobrenadantes foram transferidos para microtubos estéreis e estocados a -80°C, para posterior dosagem de citocinas.

3.21 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 antiinflamatórias, TNF- α e IL-10 respectivamente, foram quantificadas por Ensaio Imunoenzimático (ELISA) utilizando o kit BD OptEIATM Human TNF ELISA Set (Cat. N^o 555212) e BD OptEIATM Human IL-10 ELISA Set (Cat. N^o 555157), respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante.

Resumidamente, anticorpos monoclonais específicos para TNF- α ou IL-10 (anticorpos de captura) foram adsorvidos em placas de microtitulação contendo 96 poços (3590, Corning, NY, USA) e deixada 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- α 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.

3.22 CONSTRUÇÃO DO VETOR: EGFP-P47

Os ensaios a seguir foram realizados sob supervisão e colaboração do Dr. Jonathan S. Dordick, do Departamento de Química e Engenharia biológica, do Centro de Biotecnologia e Estudos interdisciplinares da Rensselaer Polytechnic Institute, em Troy – NY, como parte do “doutorado - sanduíche”.

3.22.1 Purificação Do Vetor pEGFP-N1

Foi utilizado o plasmídeo pEGFP-N1 como vetor, previamente armazenado em -80°C, foi reativado em meio LB com canamicina, em estufa a 37°C. Após 24 horas de crescimento, foi realizado o protocolo de Miniprep, nada mais do que a purificação do plasmídeo inserido na bactéria *Escherichia coli* (*E.coli*). O Miniprep foi realizado de acordo com os protocolos do miniprep kit (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Adicionou-se (2 mL) a microtubos o meio que estava em cultivo. Centrifugou-se a 13500 rpm por quatro minutos e desprezou-se o sobrenadante (meio de cultura). As células foram ressuspensas com 200 µL da solução de ressuspensão, e então adicionou-se 200 µL da solução de lise e 350 µL da solução de neutralização. Centrifugou-se por dez minutos a 13500 rpm.

Pipetou-se o lisado e transferiu-o para um tubo de miniprep (com micro coluna de filtro) e centrifugou-se por mais um minuto. Adicionou-se então, a solução de lavagem e levou-se à centrifugação por mais um minuto e desprezando o líquido. Recomenda-se centrifugar por mais um minuto, pois a solução de

lavagem contém álcool. A coluna do microtubo foi retirada e adicionada em novo microtubo, eluindo com água estéril (50 µl). Centrifugou-se novamente por um minuto e desprezou-se então a coluna. O restante foi armazenado a -20°C.

3.22.2 Corte Do Vetor Para Encaixe Da Proteína P47

Após a purificação do vetor pEGFP-N1, seguiu-se o corte deste para encaixe da proteína p-47. O corte foi realizado pela enzima SAL-1 (Thermofisher, Massachusetts, USA). Utilizou-se a enzima (5 µl), água livre de nuclease (25 µl) e o plasmídeo recém purificado (20 µl). Incubou-se por 2 horas a 37°C. Após incubação, realizou-se a técnica de PCR Clean-up System (Promega, Wisconsin, USA), que consiste em adicionar mesmo volume de Solução de ligação de membrana (*Membrane binding solution*), incubar por um minuto em temperatura ambiente e centrifugar por um minuto a 13500 rpm. Desprezou-se o lisado e adicionou-se a solução de lavagem (700 µl), centrifugando-se por um minuto, desprezando-se o sobrenadante e novamente mais uma centrifugação de um minuto. Transferiu-se a micro coluna para um novo microtubo e eluiu-se adicionando água estéril, incubando-se novamente por um minuto a temperatura ambiente e centrifugando por um minuto a 13500 rpm. Então foi realizado PCR e correu-se o gel de agarose para confirmação correta do corte.

3.22.3 Preparação Da Proteína His-P47

Preservado em -80°C, o *template* da proteína p47phox foi utilizado para a formação do plasmídeo egfp-p47. Para isso foi realizado uma corrida de PCR com *primers* adquiridos pela IDT (Integrated DNA Technologies, California, USA) com os seguintes *primers*:

IF-egfp-p47-F :5'- GAA TTC TGC AGT CGA CAT GGG GGA CAC
CTT CAT C – 3'

IF – EGFP-p47-R: 5'- CCG CGG TAC CGT CGA CTC AGA CGG
CAG ACG CCA G – 3'

Primeiramente, foi realizado um mix de *primers* F e R com água estéril. Em um micro tubo de PCR foi adicionado 4 µl deste *primer* mix, 1 µl do template His-47 e água estéril para completar o volume final de 25 µl. Após a corrida de PCR, correu-se o gel de agarose para confirmar a banda correta de proteína.

3.22.4 Preparando Clones EGFP-P47

Esta técnica consiste em três etapas: Infusão, ligação e transformação.

Na etapa de infusão adicionou-se em microtubos o vetor EGFP-N1-SAL-1 (previamente cortado pela enzima SAL-1), o produto de PCR da His-P47, e a enzima 5x Infusion (Infusion HD Cloning Kit – Clontech, Califórnia, USA) num volume final de 10 µL.

Para a etapa de Ligação, levou-se o microtubo em banho-maria a 50°C por 15 minutos. Reservou o tubo em gelo. Seguiu-se com a etapa de transformação, pipetando 3 µL da solução de DNA a um microtubo contendo bactérias competentes de *E.coli*. Novamente levou-se a um banho-maria a 42°C por 35 segundos. Acrescentou-se ao microtubo 200 µl de meio de cultivo SOC e incubou-se por 30 minutos a 37°C.

Após a etapa de transformação, plaqueou-se a solução em cultivo com ágar LB-Canamicina a 37°C *overnight*. Para o controle negativo, plaqueou-se o meio somente com o vetor vazio (egfp-n1).

Obteve-se uma placa com diversas colônias de bactérias. Para o controle, observou-se uma placa com cerca de duas colônias. Analisou-se as colônias formadas, escolhendo diferentes colônias para o *screening* com a técnica de PCR, utilizando com *template* as colônias desejadas. Após, correu-se o gel de agarose para confirmação da banda correta. As bandas que apresentaram o tamanho correto foram enviadas para confirmação de sequência de DNA (Genewiz, New Jersey, USA).

3.23 CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS

Todas as etapas da técnica foram realizadas em laboratório estéril para cultivo de células endoteliais e células-tronco, em câmara esterilizadas com luz violeta e álcool previamente antes de cada experimento, evitando-se assim a contaminação celular.

As células HUVEC (*Humans Umbilical Vascular Endothelial Cell*) (ATCC) preservadas em -80°C, foram cultivadas em frascos de cultura em meio de cultura EGM-2 (Lonza, Walkersville, MD, USA) suplementados com Hidrocortisona, hFGF-B, 2 ml; VEGF 0,5 ml; R3-IGF-1 0,5 ml; ácido ascórbico 0,5 ml; heparina 0,5 ml; FBS 10 ml; hEGF 0,5ml; GA-1000 0,5 ml., de acordo com o protocolo recomendado de Lonza. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias até as células adquirirem a confluência desejada (<80%). Células de passagem número 6-10 foram crescidas em monocamadas, incubadas em atmosfera umidificada 5% CO₂ and 95% de ar, a 37°C.

As células foram propagadas destacando-as com 0,25% de Trypsina (0,53 mM), adicionando o meio de cultura e centrifugando. As células então foram cultivadas novamente em novos frascos até a confluência desejada para os ensaios (MORA-PALE et al., 2009).

O mesmo protocolo foi seguido para o cultivo de células HEK-293 (NF) (ATCC) utilizando o meio de cultura D-MEM suplementado com 10% Soro fetal bovino (FBS) e antibióticos (Gibco®, Life Technologies, Foster City, CA, USA).

3.24 TRANSFERÊNCIA DO DNA (EGFP-p47) PARA CÉLULAS ENDOTELIAIS – TRANSFECTION

Todas as etapas da técnica foram realizadas em laboratório estéril para cultivo de células endoteliais e células-tronco, em câmara esterilizadas com luz violeta e álcool previamente antes de cada experimento, evitando-se assim a contaminação celular.

As células endoteliais em cultivo foram destacadas do frasco de cultivo (T-75) utilizando tripsina 0,1x até que elas se descolassem do fundo do frasco. Lavou-se com meio de cultura, centrifugando por três minutos a 1000 rpm. Em novo frasco estéril colocou-se o meio de cultura (30 ml) e ressuspendeu-se as células.

Em uma placa de 12 poços pipetou-se 2 mL, das células ressuspendidas em meio de cultura, em cada poço. Incubou-se em atmosfera umidificada 5% CO₂ em 95% de ar, a 37°C até que as células atingissem seu ponto ideal de confluência. Quando as células atingiram a confluência desejada (<80%), estavam prontas para a transferência do DNA.

Para a transferência, utilizou-se o kit Lipofectamine 2000 (Invitrogen, California, USA) seguindo o protocolo exigido pelo kit.

Para os poços de reações foram utilizadas como DNA o vetor preparado EGFP-p47 e como controle positivo, o vetor vazio, EGFP-N1. Para os poços de reação, em um microtubo, adicionou-se 600 µl do meio de cultivo OPTI-MEM (Thermofisher, California, USA) e 45 µl Lipofectamine. Em um segundo microtubo, adicionou-se 600 µl do meio OPTI-MEM e 45 µl de EGFP-P47. Misturou-se o conteúdo

destes. Para o poço de controle positivo, um terceiro tubo foi utilizado adicionando-se 100 μ l do meio OPTI-MEM e 5 μ l de lipofectamine. Em um quarto microtubo, adicionou-se 100 μ L do meio OPTI-MEM e 5 μ L do vetor EGFP-N1. Misturou-se o conteúdo destes. Após a mistura dos tubos 1 + 2 e 3 + 4, incubou-se em temperatura ambiente por 5 minutos.

Retirou-se a placa de cultivo da estufa e aspirou-se 1 mL do meio de cultura de cada poço. Adicionou-se 200 μ L de solução de lipofectamine em cada poço e 200 μ L do tubo de controle positivo em seu respectivo poço. Incuba-se a 37°C por 24 horas. Após incubação, o meio de cultura é trocado e 1 mL de novo meio é adicionado a cada poço. Estimulou-se as células com PMA (50 nM) e após trinta minutos, foi adicionado em seus respectivos poços as substâncias de estudo. A placa foi revelada utilizando-se microscópio de fluorescência.

3.25 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.

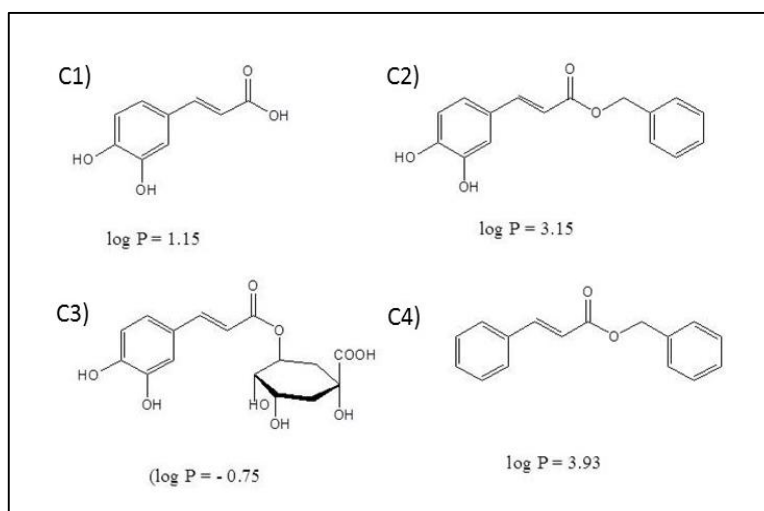
4.Resultados

4. RESULTADOS

4.1 ESTIMAÇÃO DO LOGARÍTIMO DE COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (LOG P)

Na procura de uma relação entre a atividade estrutural do ácido cafeico, ácido clorogênico, éster fenetílico do ácido cafeico e éster fenetílico do ácido cinâmico, e suas capacidades de inibição do burst oxidativo em leucócitos, consideramos que suas hidrofobicidade poderiam ser relevantes quando aos resultados, visto que a NADPH-oxidase é uma enzima ligada à membrana celular.

Figura 10 - Estrutura molecular do ácido cafeico e seus derivados e seus índices de hidrofobicidade (log P, coeficiente de partição n-octanol/água).



Ácido cafeico (C1), éster fenetílico do ácido cafeico (C2), Ácido clorogênico (C3), éster fenetílico do ácido cinâmico (C4).

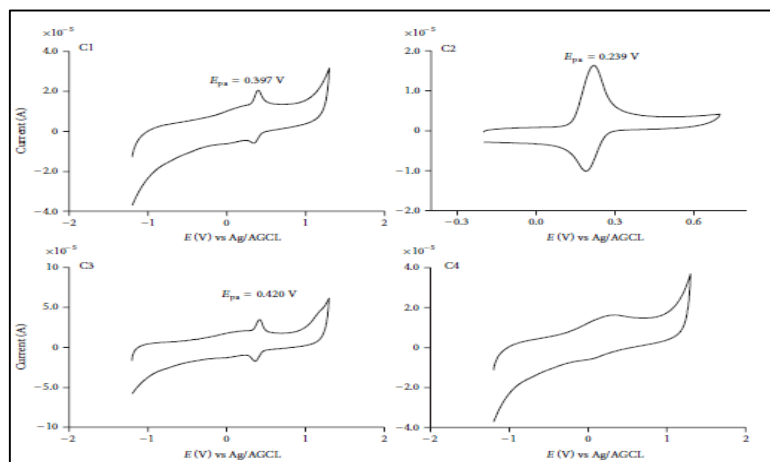
Esses compostos foram selecionados a fim de obter uma comparação entre aumento ou diminuição de suas hidrofobicidades tendo como referência o composto C1 (Log P = 1,15). Ao observarmos a Figura 10, verificamos que sua esterificação provocou um aumento significativo na sua hidrofobicidade calculada pelo Log P (C2: Log P = 3,15). Resultado oposto foi verificado para o composto C3 (Log P = -0,75), o que pode ser explicado pela

presença do grupo hidrofílico ácido quínico. O composto C4 (Log P = 3,93), por sua vez, apresenta hidrofobicidade ainda maior que o C2, mas não apresenta grupos oxidáveis, o que afetará totalmente a sua capacidade antioxidante como mostraremos.

4.2 MEDIDAS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA PARA DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE REDUÇÃO

As substâncias em estudo foram investigadas 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 antirradicalar. Para isso, 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 11) das substâncias obtidos em pH 7,0 mostram um pico anódico bem definido, no intervalo entre 0,24 a 0,42 V. A esterificação provocou somente uma pequena diferença no pico de potencial de oxidação, o que já era esperado pois a esterificação da porção carboxílica não traz grandes alterações na oxidabilidade nestes componentes.

Figura 11 - Medida de voltametria cíclica para obtenção do potencial de redução do ácido cafeico e derivados.



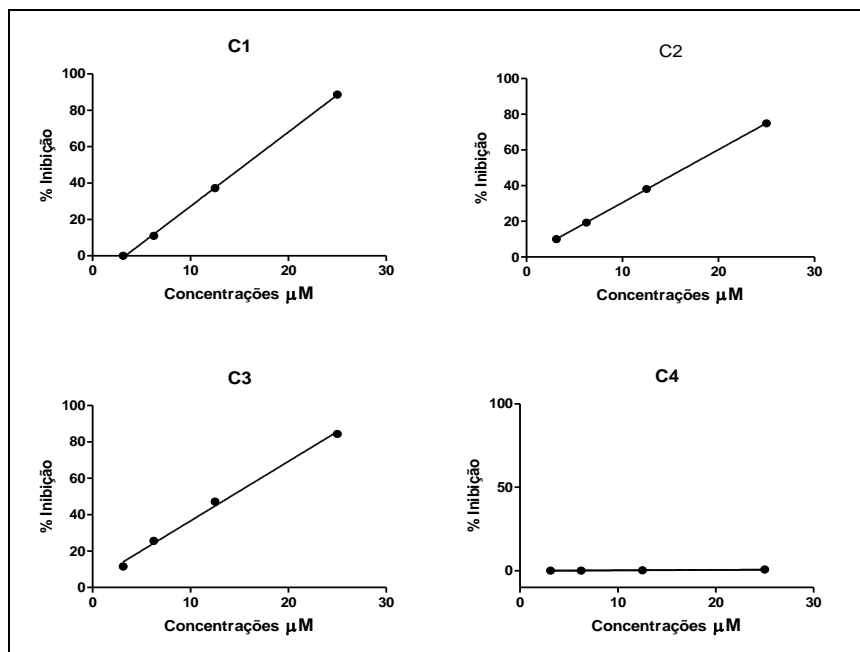
Voltametria Cíclica para o ácido cafeico (C1), CAPE (C2), ácido clorogênico (C3) e CIPE (C4) obtida em PBS (pH 7,0). Varredura de potenciais à 5 mV s⁻¹, potencial inicial de -0,2 V e potencial final de 1,5 V. O pico de potencial anódico (E_{pa}) está indicado.

Dentre os compostos estudados, a diferença foi o composto C4, o qual não mostrou um pico anódico definido na taxa de voltagem aplicada. Isto é obviamente uma consequência da falta da parte fenólica em sua estrutura, tornando-o um composto redox inativo.

4.3 ESTUDO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE (REDUÇÃO DO RADICAL ESTÁVEL DPPH)

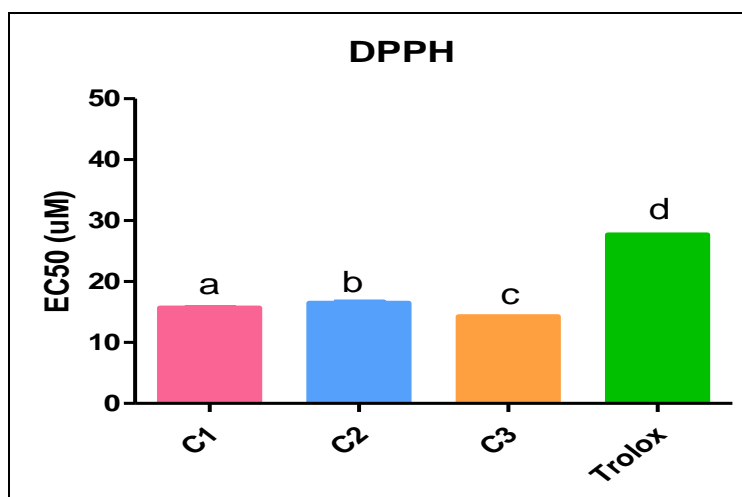
A capacidade sequestradora de radicais livres das substâncias testadas foi determinada pelo seu potencial de redução sobre o 1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Os experimentos foram efetuados em triplicata e o percentual de sequestro do radical DPPH foi calculado tendo como referência o controle, o qual não teve a adição dos antioxidantes do estudo, ou do padrão do ensaio, Trolox. A partir dos valores das porcentagens de inibição foi calculado o EC_{50} das amostras.

Figura 12 - Capacidade antioxidante pelo método de redução do DPPH.



Ácido cafeico (C1), éster fenílico do ácido cafeico (C2), ácido clorogênico (C3) e éster fenílico do ácido cinâmico (C4).

Figura 13 - Capacidade antioxidante do ácido cafeico e seus derivados pelo método de redução do DPPH.



Letras diferentes denotam diferenças significativas. One-way ANOVA e teste de comparação de Tukey, $p < 0,05$.

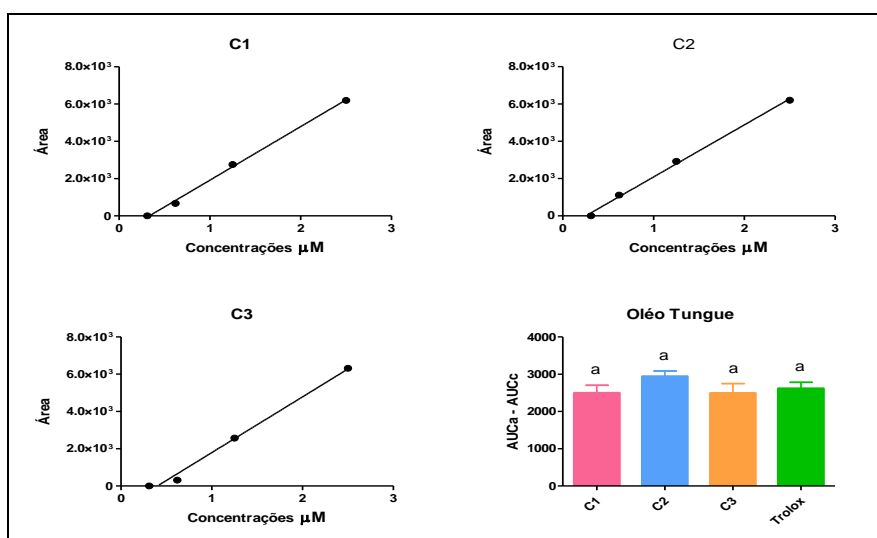
Os resultados de EC50 mostram que a alteração na hidrofobicidade das moléculas não causou uma alteração significativa em sua capacidade de redução do DPPH (Figura 13), no

entanto, C4 sem sua porção catecol, não foi capaz de reduzir o radical DPPH (Figura 12).

4.4 INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA PELO MÉTODO ÓLEO TUNGUE

Utilizando o óleo tungue como modelo de peroxidação lipídica, observamos o decaimento da curva ao decorrer de 4 horas. O azo-composto AAPH se decompõe a 37°C, em solução aquosa, para gerar radicais livres alquila ($R\cdot$), que na presença de oxigênio molecular é convertido à $ROO\cdot$ (NIKI, 1990). O decaimento foi monitorado utilizando um leitor de microplacas Spectramax M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) no comprimento de onda de 234 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 (Figura 14).

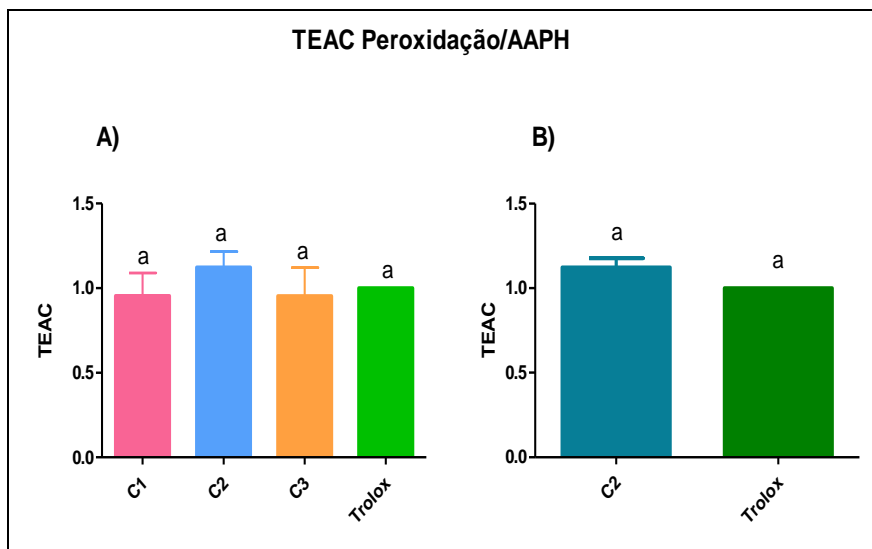
Figura 14 - Inibição da peroxidação lipídica do ácido cafeico e seus derivados pelo modelo de óleo tungue



Relação linear entre AUC e as concentrações das substâncias. Os slopes foram calculados pela regressão linear das curvas. Letras iguais denotam não houve

uma diferença significativa. One-Way ANOVA e Teste de comparação de Tukey, $p < 0,05$.

Figura 15 - Inibição da peroxidação lipídica do ácido cafeico e seus derivados pelo modelo de óleo tungue



A) Letras diferentes denotam diferenças significativas. One-way Anova e Teste de comparação de Tukey, $p < 0,05$. B) Teste T-Student. Letras diferentes denotam diferença significativa. Teste T-student.

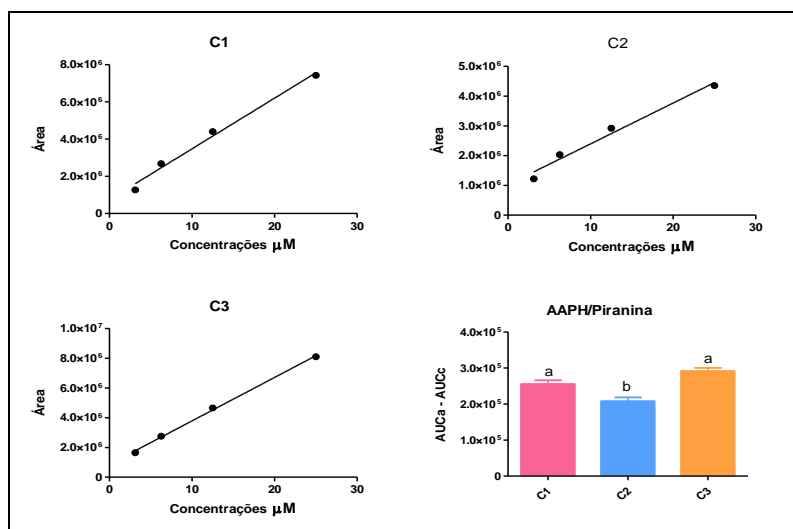
Na Figura 15, podemos observar que não houve diferenças estatísticas significativas entre as substâncias analisadas entre si e o mesmo ocorreu entre estas em relação ao padrão trolox, também não houve diferença significativa entre o CAPE (C2) e o padrão Trolox. Vale ressaltar que o composto C4 foi excluído dos ensaios subsequentes por não apresentar atividade antioxidante significativa.

4.5 AÇÃO REDUTORA SOBRE RADICAIS PEROXILA/AAPH

O azo-composto AAPH se decompõe a uma temperatura de 37°C , em solução aquosa, para gerar um radical alquila ($\text{R}\cdot$), que na presença de oxigênio molecular é convertido a $\text{ROO}\cdot$ (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 ($\text{ROO}\cdot$) 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; BERSSET, 1995).

Figura 16 - Ação redutora de radical peroxila do ácido cafeico e seus derivados. Letras diferentes denotam diferenças significativas

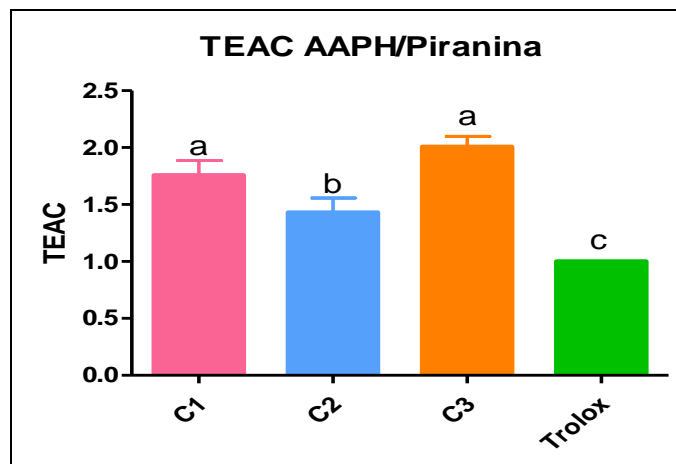


Ácido cafeico (C1), CAPE (C2), ácido clorogênico (C3), CIPE (C4). Letras diferentes denotam diferenças estatísticas significativas. One-Way Anova e teste de comparação de Tukey, $p < 0,05$.

A Figura 16 mostra o decaimento da fluorescência da piranina provocada pela sua oxidação por ROO• na presença das substâncias. A relação linear entre a fase *lag* e a concentração das substâncias testadas foi usada para medir sua reatividade com ROO•. Ainda, o *slope* (inclinação) da curva é proporcional à eficiência do antioxidante como sequestrador de ROO•.

Na Figura 17 observamos que somente o C2 apresentou diferenças estatísticas significativas em relação ao C1 e C3 e ao padrão trolox. Isso significa que todas as substâncias foram melhores que o trolox neste ensaio, no entanto o composto C3 (ácido clorogênico) foi capaz de manter o decaimento da piranina por mais tempo, obtendo assim resultados melhores nesse ensaio, quando comparado ao seu precursor, ácido cafeico.

Figura 17 - Ação redutora de radical peroxila do ácido cafeico e seus derivados. Atividade antioxidante equivalente ao Trolox



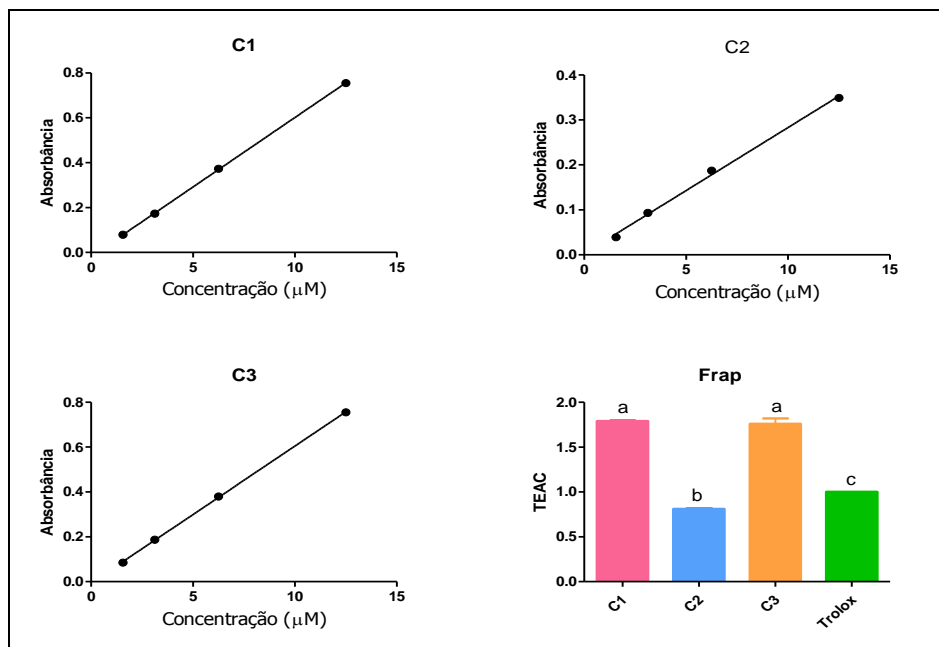
TEAC= slope da amostra/slope do trolox). Letras diferentes denotam diferenças significativas. One-way Anova e Teste de comparação de Tuckey, $p < 0,05$.

4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO (FRAP)

O ensaio de FRAP é baseado na medição da habilidade da substância em estudo reduzir o Fe^{3+} para Fe^{2+} e foi proposto para medir a capacidade antioxidante dos compostos. Neste ensaio, valores altos de absorbância indicam alta habilidade redutora do complexo Fe^{3+} -TPTZ.

Os resultados foram expressos como capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC – $\text{mMol/LTrolox/mg/mL}$ de amostra). O Trolox foi usado como padrão antioxidante.

Figura 18 - Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de Redução do Ferro pelo ácido cafeico e seus derivados.



Ácido cafeico (C1), CAPE (C2), Ácido clorogênico (C3). Regressão linear e TEAC (TEAC= slope da amostra/slope do trolox). Letras diferentes denotam diferença significativas. One-way Anova e Teste de comparação de Tukey, $p < 0,05$.

Observa-se no gráfico TEAC (Figura 18) que o composto C2 (Cape) foi o único que apresentou resultados menores que o trolox, padrão do ensaio. Obtendo assim uma redução do Ferro inferior aos demais compostos.

4.7 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 9 em “Materiais e Metodos”, realizou-se o ensaio de viabilidade celular, o qual nos garantiu definir as concentrações adequadas do ácido cafeico e seus derivados para sua utilização nos ensaios celulares. Para ambas as populações celulares, as substâncias foram testadas nas concentrações de 100 μM, 10 μM e 1 μM para um total de 1×10^6 células/mL, e revelaram não serem citotóxicas, garantindo

resultados de 97% e 98% de viabilidade celular na maior concentração testada (100 μM). Portanto, decidiu-se utilizar inicialmente, nos ensaios que se seguiram, as concentrações de 10 μM e 1 μM 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).

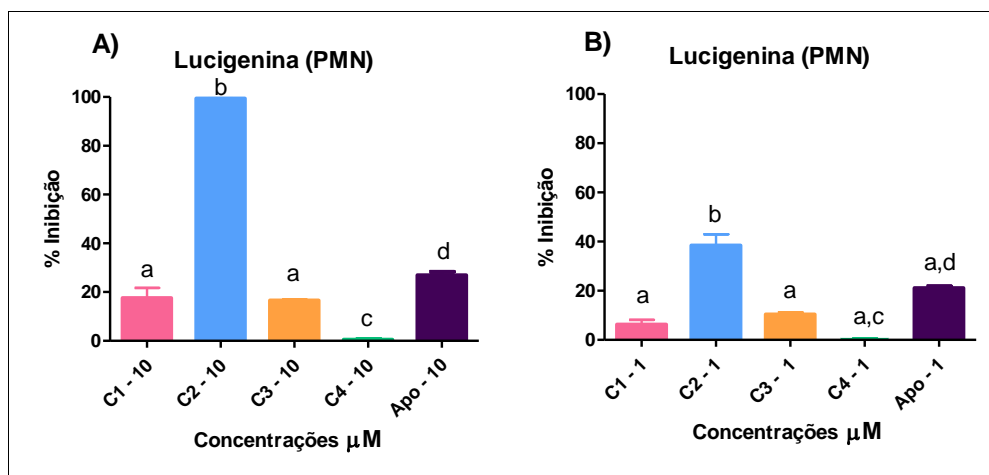
4.8 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO EROS DO “BURST” OXIDATIVO. ENSAIO QUIMILUMINESCENTE DEPENDENTE DE LUCIGENINA (QLDLUC)

O ensaio consiste em verificar a emissão de luz gerada pelo composto lucigenina na presença de ânion superóxido. Podemos observar pelos gráficos a inibição da produção dessa ERO's. Observa-se que o composto éster fenílico do ácido cafeico (C2) possui a melhor inibição de $\text{O}_2^{\bullet-}$ em relação aos compostos estudados ácido cafeico (C1), ácido clorogênico (C3) e éster fenílico do ácido cinâmico (C4), e o padrão do ensaio, Apocinina (Apo).

Os resultados apresentados na Figura 19 mostram a porcentagem de inibição dos compostos nas concentrações de 10 μM (Figura 19A) e 1 μM (Figura 19B), sobre a produção do radical ânion superóxido por PMN ativados com PMA (resultado obtido pela leitura da emissão de luz gerada pela decomposição da lucigenina, proporcional a quantidade de $\text{O}_2^{\bullet-}$ gerado no meio extracelular) (Figura 20).

O ácido cafeico mostrou uma capacidade de inibição inferior quando comparado com seu éster CAPE, para as duas concentrações testadas e ao padrão Apocinina em 10 μM . CAPE foi potencialmente eficaz na inibição da produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ em ambas concentrações.

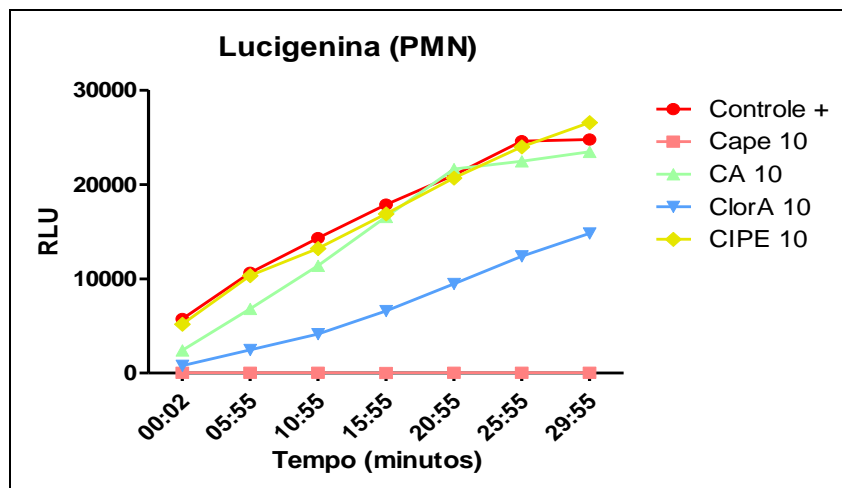
Figura 19 - Inibição da produção EROs do “burst” oxidativo, do ácido cafeico e seus derivados, pelo ensaio quimiluminescente dependente de Lucigenina



A) ácido cafeico (C1), éster fenetílico do ácido cafeico (C2), Ácido Clorogênico (C3) e CIPE (C4) nas concentrações de 10 µM. B) concentrações de 1 µM. Letras diferentes denotam diferença significativa. One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey, $p < 0,05$.

Ao comparar com os resultados previamente descritos, o CAPE é um inibidor significativamente potente nestes ensaios celulares, mostrando que sua hidrofobicidade foi essencial para os efeitos inibidores significativos (Figura 19). O composto C4, embora ainda mais hidrofóbico do que o C2 (Figura 10), não apresentou nenhuma inibição neste ou nos demais ensaios celulares. Isso mostra que, embora o caráter hidrofóbico da molécula seja importante, não é suficiente para explicar o efeito inibitório, a presença do grupo catecol é igualmente relevante.

Figura 20 - Cinética da emissão de luz (RLU) no tempo de 30 minutos



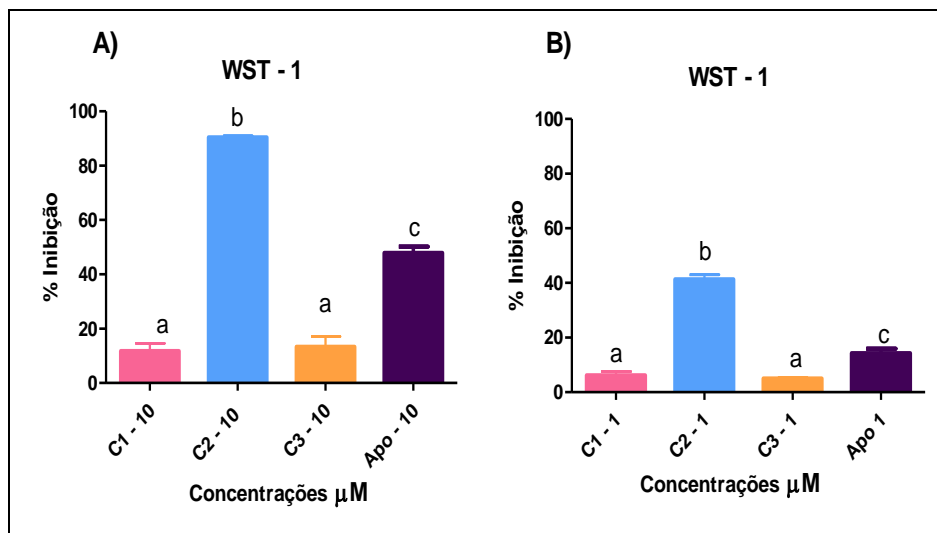
Ácido cafeico (CA), CAPE, Ácido clorogênico (ClorA) e CIPE na concentração de 10 μ M. Células polimorfonucleares (PMN).

4.9 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DO RADICAL $O_2^{\cdot -}$ POR NEUTRÓFILOS ATIVADOS (ENSAIO DO WST-1)

Para confirmação dos resultados obtidos no ensaio de produção de ânion superóxido via quimiluminescência depende de lucigenina, foi utilizado um procedimento baseado na redução do sal tetrazólio sulfonado (WST-1), solúvel em água e impermeável a membrana. Trata-se de uma sonda cromogênica para determinação do radical ânion superóxido liberado no meio extracelular. Esse ensaio se baseia na redução do WST-1 pelo radical ânion superóxido, produzindo uma formazana solúvel, que pode ser medida por absorção a 450 nm (TAN; BERRIDGE, 2000).

Observando a Figura 21, os resultados mostrados confirmam a eficácia do efeito inibitório de CAPE e ainda mostram a diferença significativa da capacidade de inibição do CAPE em relação ao seu precursor ácido cafeico (C1).

Figura 21 - Redução do WST-1 pelo ácido cafeico e seus derivados provocada pelo $O_2^{\cdot -}$ liberado por neutrófilos ativados com PMA



A) ácido cafeico (C1), CAPE (2), ácido clorogênico (C3) e apocinina (Apo) testados nas concentrações de 10 μM e **B)** ácido cafeico (C1), CAPE (2), ácido clorogênico (C3) e apocinina (Apo) testados nas concentrações de 1 μM . Letras diferentes denotam diferenças significativas. One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey, $p < 0,05$.

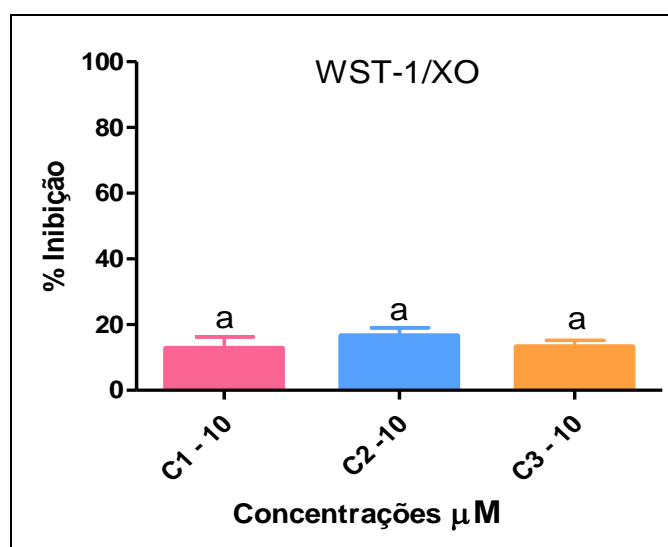
De acordo com os resultados obtidos em ensaios anteriores para a avaliação do efeito inibidor do ácido cafeico, éster fenetílico do ácido cafeico e ácido clorogênico sobre a produção de $O_2^{\cdot -}$ pelo complexo NADPH oxidase, determinou-se que o CAPE (C2) mostrou resultados significativamente melhores quando comparados ao seu precursor ácido. Para tanto, foram realizados os ensaios de determinação da produção do radical $O_2^{\cdot -}$ por leucócitos ativados através de quimiluminescência dependente de Lucigenina e WST-1. No entanto, para provar que estes resultados são da inibição da produção do radical ânion superóxido e não somente consequência direta do sequestro do radical ânion superóxido, as substâncias foram submetidas 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.

4.6 INIBIDORES DA PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO PELO SISTEMA ENZIMÁTICO XANTINA/XANTINA OXIDASE

Neste ensaio, utilizou-se o WST-1, como sonda cromogênica. A redução do WST-1 pelo $O_2^{\cdot -}$ produzido permitiu avaliar o potencial de inibição das substâncias na produção do radical a partir do sistema enzimático xantina/xantina oxidase. As substâncias (10 μ M) foram incubados a 37°C com a sonda (500 μ M) e xantina (100 μ M). A reação foi iniciada pela adição de xantina oxidase (0,05 μ mL).

A Figura 22 mostra a porcentagem de inibição do ânion superóxido produzido pelo sistema xantina/xantina oxidase e o efeito do ácido cafeico, CAPE e ácido clorogênico como inibidores deste radical.

Figura 22 - Inibição da produção de ânion superóxido pelo ácido cafeico e seus derivados, pelo método de xantina – xantina oxidase.



Ácido cafeico (C1), CAPE (C2), Ácido clorogênico (C3). Letras diferentes denotam diferenças significativas. One-Way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey, $p < 0,05$.

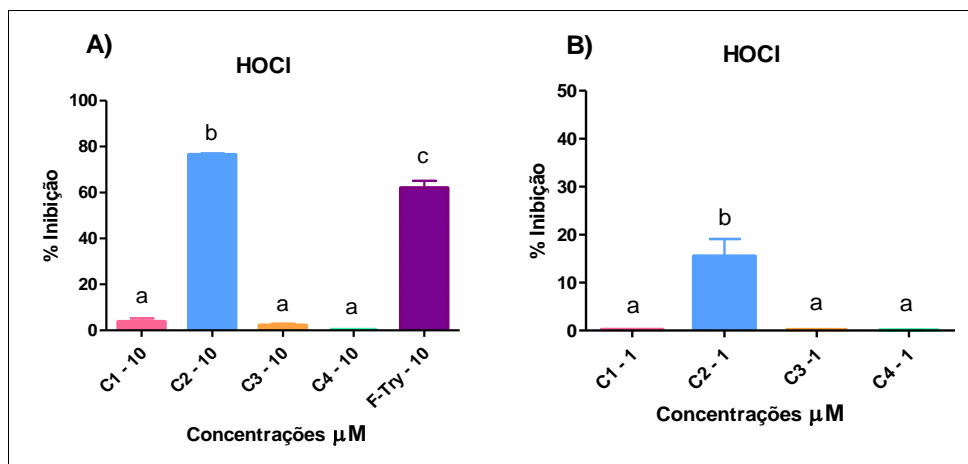
Observa-se que não houve diferença estatística significativa entre os compostos. Quando comparamos com os ensaios com neutrófilos ativados apresentados acima, elimina-se a possibilidade de uma ação sequestradora de ânion superóxido e confirmando o

potencial de inibição da produção do radical induzido provavelmente pela inibição da ativação da enzima NADPH oxidase, pelas substâncias em estudo.

4.10 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 produzidos e liberados pelos neutrófilos, 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. Por isso, foi realizado um ensaio para determinar a concentração de HOCl liberado no meio após estimulação celular.

Neste ensaio mediu-se a produção de HOCl, baseado na quantidade de taurina-cloramina presente no meio, a qual foi produzida proveniente da reação do HOCl com a taurina adicionada na reação experimental gerando cloramina, que oxida o TMB. A diminuição dos valores de absorbância em relação ao controle da reação (isento das substâncias testadas) significa que houve uma diminuição na produção do HOCl pelas células ativadas, diminuindo assim a produção de taurina cloramina e 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 μ M e 10 μ M) em relação ao controle da reação (Figura 23).

Figura 23 - Inibição da produção de HOCl por neutrófilos ativados

A) Substâncias testadas nas concentrações de 10 µM e **B)** 1 µM. Letras diferentes denotam diferença significativa. (One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey, $p < 0,05$).

Neste ensaio utilizou-se a fluorotriptamina (F-Try) como padrão, um conhecido composto inibidor da produção de H_2O_2 , para fins de comparação com os compostos de estudo. Verificou-se que em 10 µM, a eficiência da F-Try foi significativamente menor que C2, que continuou, em concordância com os demais ensaios, sendo a mais eficaz substância de estudo.

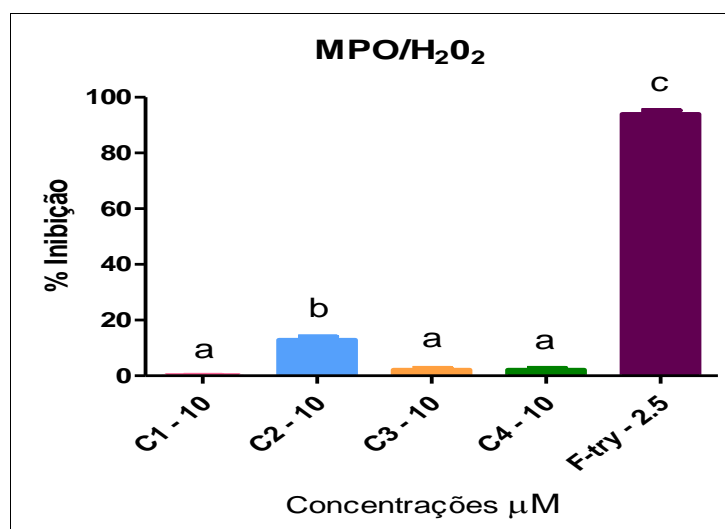
Dentro deste contexto, o ensaio a seguir foi realizado, para descartar a possibilidade de uma possível ação das substâncias sobre outra enzima, a MPO.

4.11 PRODUÇÃO DE HOCL: MPO/ H_2O_2 (SISTEMA LIVRE DE CÉLULAS) AVALIAÇÃO O EFEITO INIBIDOR SOBRE A AÇÃO CLORINANTE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO)

A mieloperoxidase é uma enzima derivada dos grânulos azurofilos dos neutrófilos que catalisa a formação de numerosas espécies reativas oxidantes (ROMAN; WENDLAND; POLANCZYK, 2007). Em um sistema livre de células, poderíamos confirmar se o efeito inibidor das substâncias estaria agindo sobre a MPO, excluindo qualquer dúvida quanto ao ensaio com células, e saber se as substâncias inibem a enzima MPO.

Inicialmente, 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 ao meio e a taurina cloramina quimicamente produzida. A reação foi realizada em meio contendo PBS (pH7,4) contendo taurina (10 mM), onde foi adicionado o HOCl (40 μ M), para a produção de taurina cloramina e as substâncias numa concentração 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.

Figura 24 - Inibição da atividade clorinante da enzima mieloperoxidase, pelo ácido cafeico e seus derivados



Ácido cafeico (C1), CAPE (C2), ácido clorogênico (C3), CIPE (C4) e Fluortriptamina (F-try). Letras diferentes denotam diferenças significativas. One-Way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey, $p < 0,05$.

Na Figura 24, podemos observar que as substâncias não foram capazes de inibir a produção de HOCl pela atividade clorinante da enzima mieloperoxidase, em comparação com o

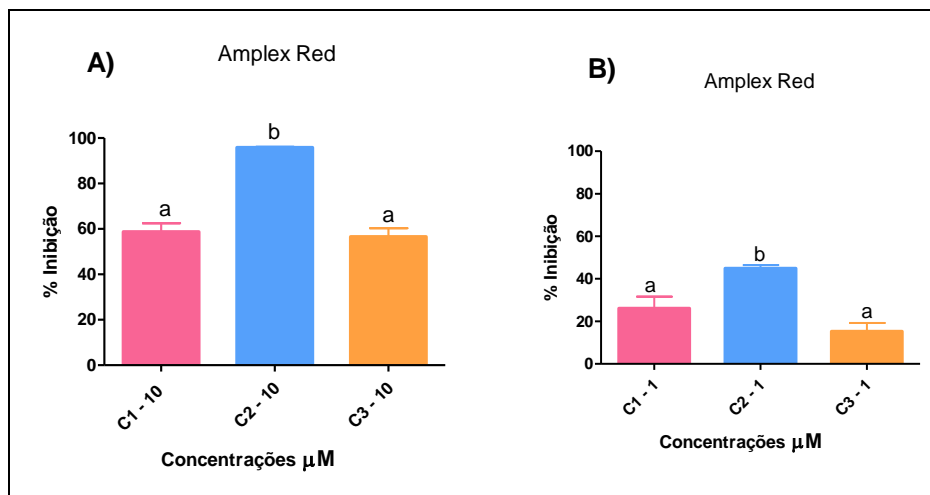
padrão do ensaio, flortriptamina. O CAPE, na maior concentração testada 10 mM, apenas inibiu cerca de 20%, enquanto o padrão do ensaio inibiu cerca de 100%. No ensaio anterior (Figura 23), o HOCl produzido por PMN estimulados com PMA, onde o CAPE obteve cerca de 80% de inibição da produção de HOCl na concentração de 10 μ M, pode-se indicar que a inibição foi feita na enzima NADPH-Oxidas e que as substâncias não inibem a ação da enzima mieloperoxidase.

4.12 DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EXTRACELULAR POR AMPLEX® RED

Este ensaio avaliou o potencial de inibição das substâncias em estudo, sobre o H₂O₂ extracelular liberado por polimorfonucleares do sangue periférico ativados com PMA.

Uma molécula altamente fluorescente (resorfurina), resultante da oxidação do Amplex® Red, catalisada por peroxidase, 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).

Figura 25 - Inibidores de H₂O₂ liberado no meio extracelular por PMN ativados por PMA



A) ácido cafeico (C1), Cape (C2) e ácido clorogênico (C3) testados nas concentrações de 10 μM e **B)** 1 μM. Letras diferentes denotam diferenças significativas. One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey, $p < 0,05$.

Na Figura 25, observa-se que o composto CAPE apresentou melhores resultados na inibição de H₂O₂ quando comparados com o composto ácido cafeico e ácido clorogênico. Na concentração de 10 μM (Figura 25A), o CAPE conseguiu inibir a liberação de peróxido de hidrogênio em praticamente 100%, enquanto que ácido cafeico e ácido clorogênico inibiram cerca de 50% do mesmo. Quando analisamos a concentração de 1 μM (Figura 25B), o CAPE ainda consegue inibir cerca de 40% de H₂O₂, enquanto que os outros compostos inibem cerca de 20%.

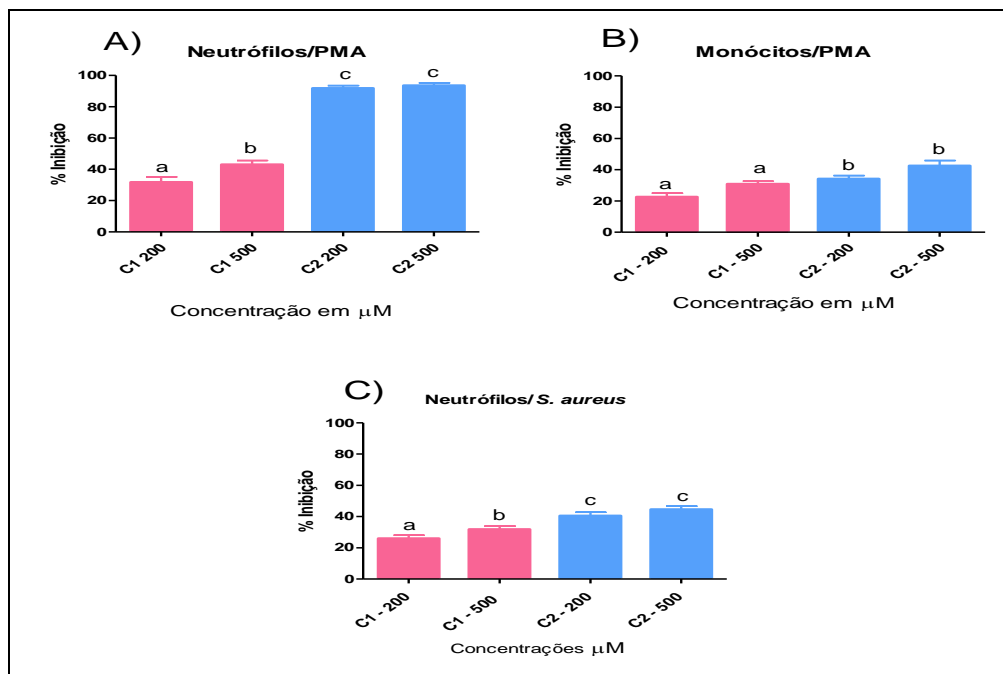
4.13 DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO INTRACELULAR. ENSAIO DE DIHIDRODAMINA 123 (DHR) POR CITOMETRIA DE FLUXO

Decidiu-se avaliar se ácido cafeico e seu éster etílico, CAPE, possuíam a capacidade de inibir a produção de H₂O₂ intracelular. Utilizou-se 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 utilização de sangue total neste ensaio permitiu avaliar o ácido cafeico e o CAPE em concentrações maiores do que aquelas usadas nos ensaios anteriores. Iniciamos os ensaios com uma concentração baixa, de 50 μM e depois aumentamos para 100 μM , 200 μM e posteriormente 500 μM , para que pudéssemos encontrar uma concentração que 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*.

Figura 26 - Porcentagem de inibição de peróxido de hidrogênio sobre o MFI



MFI: Média da intensidade de Fluorescência. Neutrófilos e monócitos (3×10^5 células/mL) foram pré-incubados com C1 (ácido cafeico) e C2 (CAPE) em 200μM ou 500μM. 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. **A)** Neutrófilos ativados com PMA. **B)** Monócitos ativados com PMA. **C)** Neutrófilos ativados com *Staphylococcus aureus*. Letras diferentes denotam diferenças significativa. One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey, $p < 0,05$.

Os dados representados pelo MFI equivalem a média da quantidade total de H_2O_2 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.

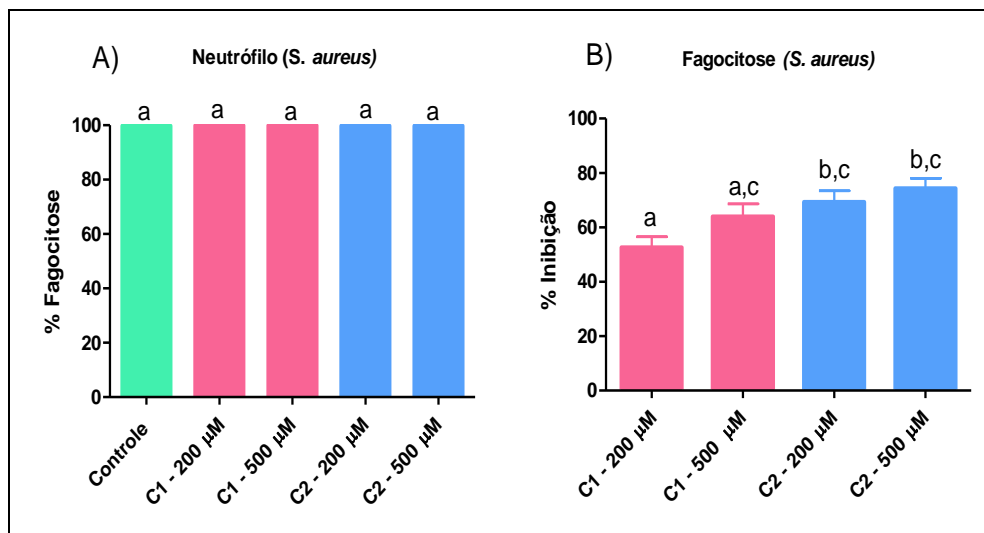
Analisando a Figura 26A, podemos observar que o CAPE apresentou os melhores resultados para inibição da produção de H_2O_2 intracelular em neutrófilos, estimulados com PMA, não

havendo diferença estatística significativa entre as concentrações de 200 μM e 500 μM . Na Figura 26B, quando analisados em monócitos, o CAPE ainda continua com os melhores resultados quando comparado com seu precursor, ácido cafeico, porém o único que obteve menor inibição foi o ácido cafeico na concentração de 200 μM . Quando analisamos a figura 26C, neutrófilos estimulados por *S. aureus* vemos que somente o CAPE 500 μM apresentou inibição de 50% do H_2O_2 produzido intracelularmente.

4.14 ENSAIO DE FAGOCITOSE POR CITOMETRIA DE FLUXO

Através do ensaio do DHR foi possível avaliar, conjuntamente, se as substâncias eram capazes de interferir na atividade fagocítica de neutrófilos ativados com *Staphylococcus aureus*. Os resultados foram expressos pela Média de Intensidade de Fluorescência (MFI, *mean fluorescence intensity*), que corresponde à média da quantidade total de bactérias que cada célula internalizou e, pela porcentagem, que corresponde à 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.

Figura 27 - Capacidade de alteração da atividade efetora de neutrófilos (Fagocitose) pelo ácido e CAPE.



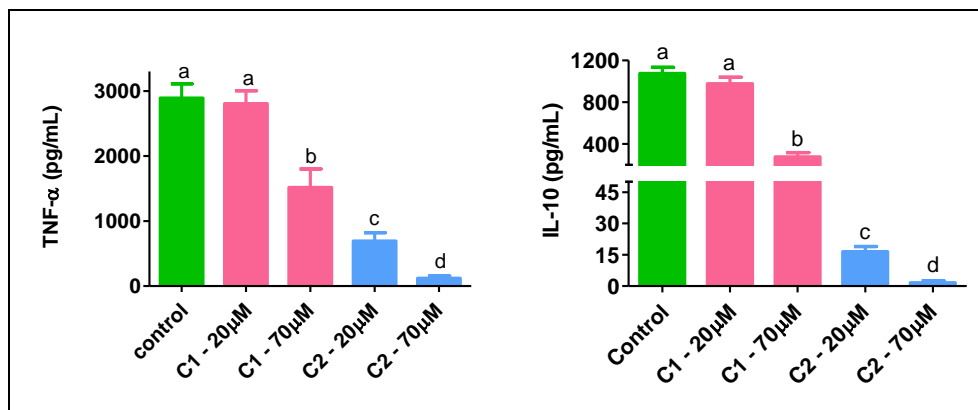
A) Porcentagem de neutrófilos com capacidade fagocítica. Controle positivo: estimulado com *Staphylococcus aureus*, porém isento de qualquer substância de estudo. B) Inibição da porcentagem de bactérias internalizadas pelos neutrófilos. Letras diferentes denotam diferenças significativas. One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey, $p < 0,05$.

Observa-se na figura 27A, que as células não sofreram nenhuma alteração na sua atividade efetora, 100% delas foram capazes de fagocitar bactérias mesmo na presença de CAPE e ácido cafeico em suas maiores concentrações (500 μ M). Na figura 27B com relação à quantidade de bactérias fagocitadas, observamos que o CAPE na concentração de 500 μ M apresentou uma maior inibição com cerca de 70% de inibição da fagocitose, porém não houve diferença significativa entre as substâncias nessa concentração para $p < 0,05$.

4.15 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS (ELISA)

Este ensaio de quantificação da produção de TNF- α e IL-10 foi realizado por ensaio imunoenzimático (ELISA) a partir dos sobrenadantes das culturas de monócitos, os quais foram ativados com *Staphylococcus aureus*.

Figura 28 - Produção de citocinas pró e anti-inflamatórias no sobrenadante das culturas de monócitos por ELISA



Cultura de células: 1×10^6 monócitos/mL cultivados em meio RPMI-1640 + SFB. **A)** Produção de TNF- α por monócitos estimulados com *Staphylococcus aureus*, na presença do ácido cafeico e CAPE, na concentração de 20 μ M e 70 μ M. **B)** Produção de IL-10 por monócitos estimulados com *Staphylococcus aureus*, na presença do ácido cafeico e CAPE, na concentração de 20 μ M e 70 μ M. Letras diferentes denotam diferenças significativa. One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey, $p < 0,05$.

A figura 28 mostra a produção das citocinas em pg/mL, onde **A** apresenta os resultados de TNF- α e **B** apresentam os resultados de IL-10, onde as substâncias foram testadas nas concentrações de 20 μ M e 70 μ M.

Quando observamos a produção de TNF- α (Figura 28A), o CAPE continua apresentando os melhores resultados, diminuindo a produção de TNF- α , tanto em 20 μ M quanto em 70 μ M, comparado ao seu ácido precursor, o ácido cafeico em sua maior concentração.

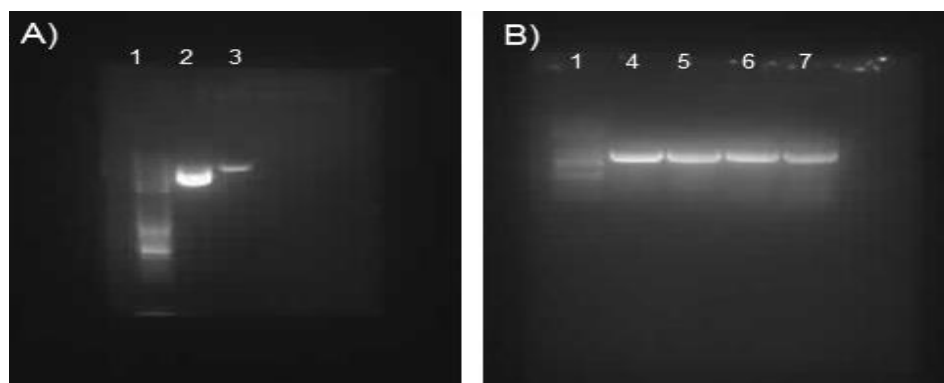
Na figura 28B, o CAPE diminuiu a produção de IL-10 quase em sua totalidade, tanto em 20 μ M quanto em 70 μ M. O mesmo resultado não foi observado em seu ácido precursor, mesmo em sua maior concentração testada.

Portanto, podemos afirmar que a hidrofobicidade das substâncias, mais uma vez, teve importante efeito no que diz respeito à capacidade de produção de citocinas, tanto de TNF- α quanto de IL-10.

4.16 CONSTRUÇÃO VETOR EGFP-P47

A construção do vetor contendo a proteína p47 foi realizado em diversas etapas. Primeiramente purificou-se o vetor pEGFP-N1, um vetor que retém a fluorescência da proteína nativa, permitindo a localização da fusão da proteína, como mostra a figura 29A. O gene desejado deve ser clonado dentro do vetor, seguindo-se a etapa de corte com a enzima específica para o códon desejado. Utilizou-se a enzima SAL-1 (Figura 29A), obtendo um corte simples e limpo. Após, houve a preparação da proteína utilizando a técnica de PCR e os *primers* construídos especificamente para esta proteína (Figura 29B). O resultado foi revelado pelo gel de agarose.

Figura 29 - Purificação do vetor pEGFP-N1 e proteína His-P47



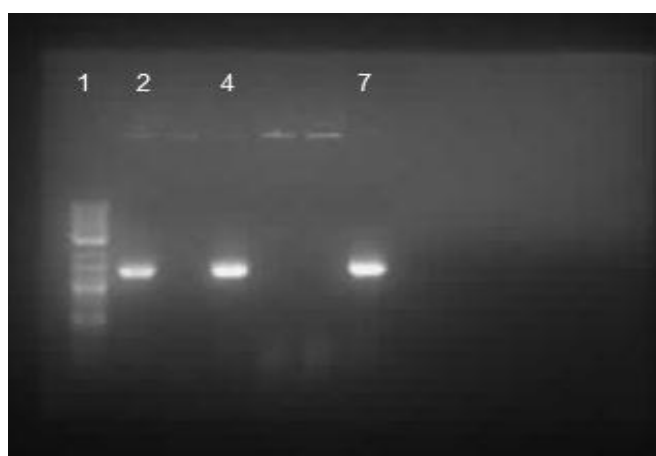
A) Purificação do vetor pEGFP-N1 e o corte com a enzima SAL-1. B) PCR da proteína His-p47 (1 – Ladder; 2 – pEGFP-N1; 3 – pEGFP-SAL1; 4, 5, 6, 7 – His-p47.) Bandas corridas em gel de agarose com brometo de etídio após PCR.

Observa-se na figura 29A, a banda do vetor antes do corte (2) com a enzima SAL-1 e após o corte da enzima (3), uma banda única e limpa, sinalizando que o corte ocorreu no local certo de inserção da proteína. Na figura 29B, nota-se as bandas claras e únicas da proteína His-P47, sinalizando que o PCR com os *primers* ocorreu de forma como esperado. Vetor cortado e proteína pronta, passou-se para a seguinte etapa de preparação dos clones EGFP-p47.

Esta etapa utilizou-se o vetor cortado (EGFP-N1-SAL-1), a His-P47 após PCR e a enzima 5xInfusion, realizando a ligação

levando o microtubo em banho-maria (50°C) por quinze minutos, após adicionado as *E.coli* competentes, levou-se ao banho-maria (42°C) por 35 segundos para transformação. Incubou-se em ágar LB – Canamicina por overnight. Observou-se a formação de colônias, escolhendo as colônias desejadas e realizando o PCR. A leitura foi realizada em gel de agarose e após, enviada para análise de DNA.

Figura 30 - Clones do vetor EGFP-p47



Gel de agarose com brometo de etídio. 1 – Ladder. 2, 4, 7 – his-p47.

Observa-se na figura 30, as bandas em gel de agarose após PCR das colônias dos clones do vetor EGFP-p47. As bandas de número 2, 4 e 7 foram limpas e únicas, sinalizando um clone positivo para o vetor desejado. Foram levadas a confirmação de DNA pela empresa Genewiz e sua sequência de DNA foi confirmada com perfeita inserção da proteína no vetor.

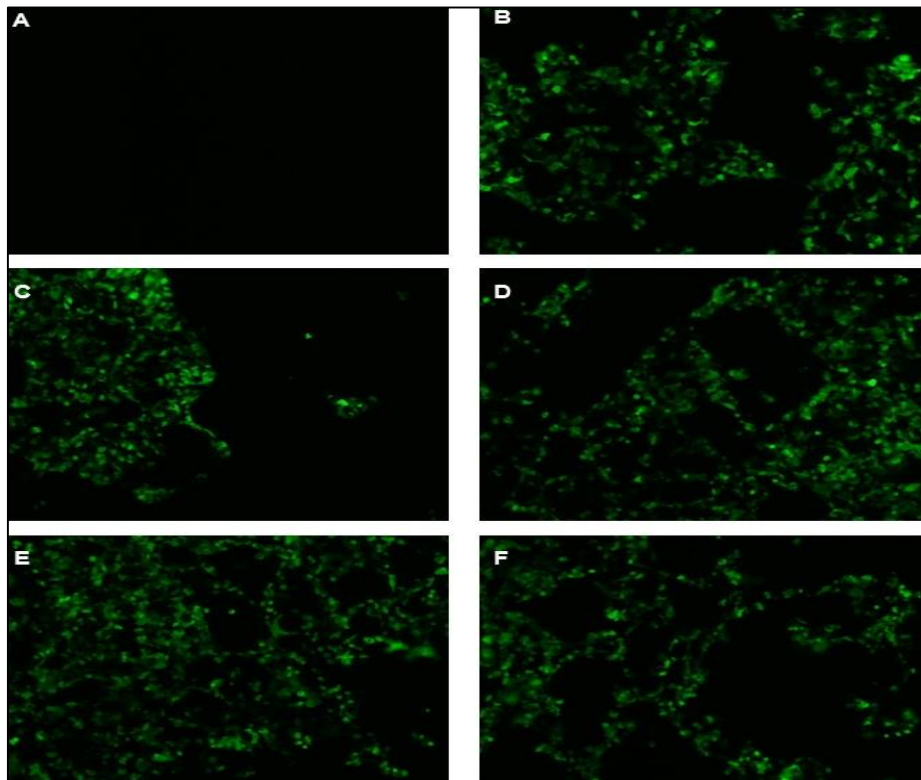
4.17 TRANSFERÊNCIA DO DNA (EGFP-p47) PARA CÉLULAS ENDOTELIAIS – TRANSFECTION

O DNA, contido no vetor EGFP-p47, foi transferido para as células endoteliais HUVEC e HEK-293 utilizando-se o protocolo do kit de transferência Lipofectamine 2000. A transferência para células HUVEC não foi bem sucedida, portanto, foi utilizado somente as células HEK-293, de crescimento mais rápido e transferência de

DNA mais eficaz. A transferência seguiu-se misturando-se o DNA com lipofectamine 2000 em microtubo. Após 5 minutos de incubação em temperatura ambiente, pipetou-se 200 μ L dessa solução em cada poço de placa para 12 poços. Após 24 horas de incubação, a leitura da placa foi realizada em microscopia de fluorescência.

Observa-se na figura 31 as imagens obtidas do microscopia de fluorescência. Na Figura 31B, nota-se que a transferência do DNA foi realizada com sucesso pela técnica de Lipofectamine, onde encontra-se o controle positivo, utilizando o vetor vazio pEGFP-p47. Na figura 31C, observa-se fluorescência com o DNA, EGFP-p47, sinalizando que a transferência do DNA da proteína p47 foi realizada, porém, não observa-se diferença entre este com a imagem do controle positivo (B). Ao estimularmos as células com PMA, esperava-se que houvesse uma translocação da proteína, o que não foi observado nestas imagens. Tratou-se as células com as substâncias ácido cafeico e CAPE em 20 μ M, porém não houve diferença na fluorescência das imagens (Figura 31E e 31F).

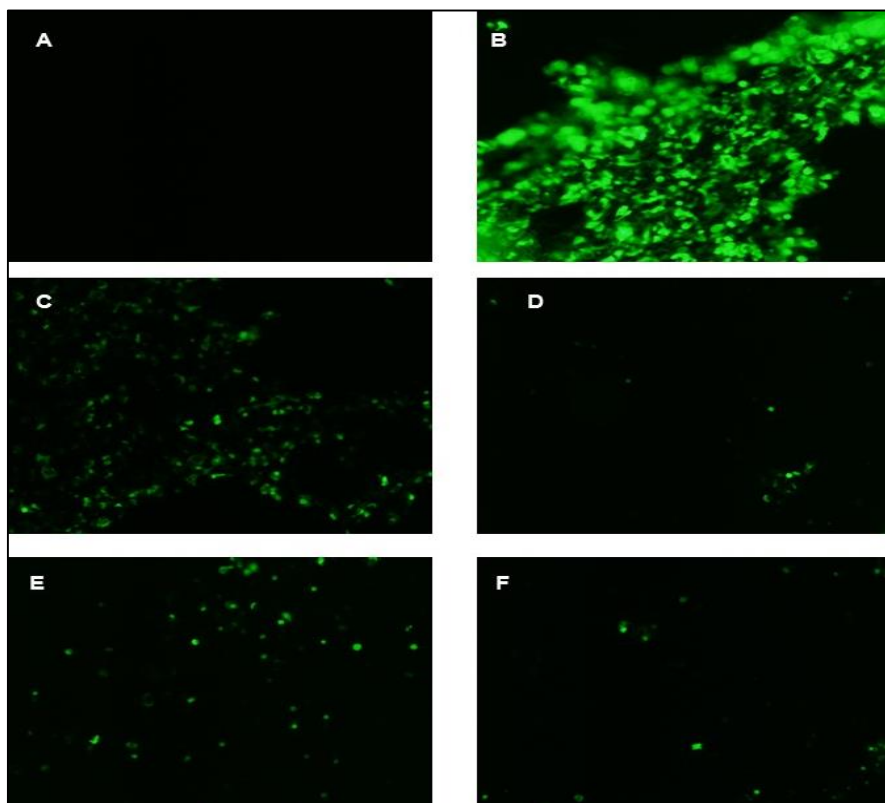
Figura 31 - Transferência de DNA para células HEK-293 visualizadas em microscopia de fluorescência.



A - Controle negativo, sem presença de DNA. B) Controle positivo, vetor vazio de DNA – pEGFP-N1. C) EGFP-p47. D) EGFP-p47 estimulado com PMA (50 nM). E) EGFP-p47 + PMA + ácido cafeico a 20 μM e F) EGFP-p47 + PMA + CAPE a 20 μM .

Resolveu-se então estimular as células com ácido araquidônico (AA) (UEYAMA et al.,2007), (200 μM) poderia não estar estimulando as células adequadamente. Aumentou-se a concentração de ácido cafeico e CAPE para 100 μM e novas imagens foram capturadas no microscopio de fluorescência, visualizados na figura 32.

Figura 32 - Transferência de DNA para células HEK-293 visualizadas em microscopia de fluorescência.



A - Controle negativo, sem presença de DNA. B) Controle positivo, vetor vazio – pEGFP-N1. C) EGFP-p47. D) EGFP-p47 estimulado com AA (200 μ M). E) EGFP-p47 + AA + ácido cafeico a 100 μ M e F) EGFP-p47 + AA + CAPE a 100 μ M.

Na figura 32B, observa-se que a transferência de DNA ocorreu como previsto. Na figura 32C, observa-se certa fluorescência, mostrando que a transferência da proteína ocorreu, no entanto, as células estavam praticamente inviáveis. Na figura 32D, quando estimuladas com AA, as células apresentaram-se mortas. Pouca ou nenhuma fluorescência foi notada também quando as células foram adicionadas ácido cafeico (32E) e CAPE (32 F), apresentando-se inviáveis. Em ambos os resultados, não vimos a translocação da proteína para a membrana, necessitando talvez de um marcador específico para esta proteína, a fim de visualizar a marcação intracelular.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Como já discutido anteriormente, a desregulação da NADPH oxidase está envolvida na gênese e/ou progressão de doenças vasculares, degenerativas e inflamatórias, que incluem aterosclerose, doença granulomatosa crônica, hipertensão, diabetes, doença de Alzheimer, Parkinson, entre outras (PONGNIMITPRASERT, 2009; FISCHER et al., 2012; ZHOU et al., 2012; WANG et al., 2013). Consequentemente, envolve a produção de diversas espécies reativas de oxigênio (EROs), que além 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; AMBRUSO; CUSACK, THURMAN, 2004; SHI et al., 2006).

Dentro deste contexto, compostos fenólicos vêm sendo pesquisados e utilizados na medicina tradicional 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). 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 esterificação de ácidos fenólicos tem sido usada como uma ferramenta para melhoramento dos efeitos biológicos de moléculas antioxidantes tradicionais. Os efeitos atribuídos pela esterificação incluem o aumento do seu potencial anti-inflamatório, antimutagênico e antitumoral, como agentes antifúngicos e antibacterianos (DE FARIA et al., 2012). 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 alquílicos do ácido gálico (KUBO et al., 2004; ROSSO et al., 2006; MORAIS et al., 2010; XIMENES et al., 2010; YOU; PARK, 2011; CHEN et al., 2011), ácido protocatecúico em relação à seus ésteres alquílicos (DE FARIA et al., 2012) e ácido cafeico e alguns de seus ésteres (PARACATU et al., 2013).

Vários estudos têm reportado que a hidrofobicidade, por trás das propriedades redox dos ácidos fenólicos, é crucial para sua ação farmacológica e seus efeitos toxicológicos. A hidrofobicidade afeta a absorção, a biodisponibilidade e as interações com receptores celulares. (CHALAS et al., 2001; XIMENES et al., 2010; YOU; PARK, 2011; CHEN et al., 2011; PARACATU et al., 2015).

Dentro deste contexto, esta foi a motivação deste estudo, ou seja, a comparação do ácido cafeico e seus derivados como inibidores da produção de oxidantes por neutrófilos ativados. Os compostos CAPE (C2), ácido clorogênico (C3) foram selecionados com o objetivo de aumentar ou diminuir a hidrofobicidade comparado com o ácido cafeico (C1), sem nenhuma alteração no seu grupamento oxidável catecol e CIPE (C4) mantendo sua hidrofobicidade mas alterando a oxidabilidade. A Figura 10 mostra a estrutura molecular do ácido cafeico e seus derivados e seus índices de hidrofobicidade ($\log P$, coeficiente de partição n-octanol/água) e pelos valores mostrado, podemos concluir que este objetivo foi atingido. Estes resultados estão em concordância com EID e colaboradores (EID et al., 2010).

Embora os resultados da voltametria cíclica (Figura 11) demonstrem que a esterificação do ácido cafeico provocou uma pequena alteração nos picos de oxidação, no decorrer da realização dos experimentos, os resultados parciais indicaram que o aumento

da hidrofobicidade derivada dessa esterificação, não induziu a um aumento da capacidade sequestradora de radicais livres. Podemos comparar os resultados com outros ácidos fenólicos, como o ácido protocatecúico (*Epa* 0.222V) e seu protocateculato de heptila (*Epa* 0.266V) e ácido sinápico (*Epa* 183mV) e seu éster butílico (*Epa* 190mV) (DE FARIA et al., 2012; GASPAR et al., 2010). Para os compostos estudados aqui, a exceção foi o C4, que não mostrou um pico anódico definido, como consequência da ausência da sua porção oxidável, tornando-o um composto redox inativo.

Considerando a importância da diferença entre inibição da enzima NADPH Oxidase e um simples e direto efeito *scavenger* das EROs produzidas pelas células, realizou-se um completo painel de testes livres de células com o objetivo de estudar os efeitos provocados pela hidrofobicidade na capacidade antioxidante destes compostos, a fim de descobrir esta diferença.

Os compostos foram então estudados quanto a sua eficácia como agente redutor de radicais livres, pelo ensaio do DPPH. Como mostra a Figura 13, os resultados de EC50 mostra que os valores obtidos, $15,7 \pm 0,1$, $16,4 \pm 0,3$, e $14,1 \pm 0,1$ μM , para C1, C2 e C3 respectivamente, não apresentaram uma diferença significativa entre os compostos, quanto sua capacidade antioxidante contra o DPPH. Le Blanc e colaboradores (2012) mostraram resultados semelhantes para o ácido cafeico (15,3) e CAPE (11,9) (LE BLANC et al., 2012). Outro estudo, desta vez com ácido gálico, o mesmo se repetiu, não havendo grande diferença significativa entre o galato de metila e seu ácido precursor (LU et al., 2006).

Na sequência, os compostos foram analisados como inibidores da peroxidação lipídica pelo modelo óleo tungue. Os resultados foram expressos como capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC), sendo o trolox usado como padrão deste ensaio, que está descrito na Figura 15, onde todas as substâncias foram tão eficazes quanto ao padrão este composto. Le

Blanc e colaboradores (2012), também mostraram que EC50 do ácido cafeico e CAPE não obteve uma diferença significativa (LE BLANC et al., 2012).

A mesma propriedade foi observada em relação a redução de radicais peroxila em meio aquoso (Figura 17). Esses resultados indicam que o aumento da capacidade antioxidante destes derivados do ácido cafeico também pode estar presente em soluções aquosas, que estão mais próximas das condições fisiológicas.

A capacidade de redução de um composto é um indicativo do seu potencial antioxidante. Compostos antioxidantes são capazes de doar elétrons para radicais reativos, reduzindo-os em compostos menos reativos e estáveis. O poder de redução do ácido e cafeico e seus derivados foi testado no ensaio de FRAP, mostrado na Figura 18. O éster CAPE obteve um resultado inferior da capacidade de redução de ferro, em comparação com o seu precursor e com o padrão do ensaio, o Trolox. Neste ensaio, alto valor de absorbâncias indica alta redução do complexo Fe^{3+} -TPTZ. GÖÇER e colaborador (2011) mostraram resultados para a capacidade de redução de íons Ferro do CAPE serem inferiores que Trolox (GÖÇER; GÜLÇİN et al., 2011).

Como dito anteriormente, $\text{O}_2^{\cdot-}$ é a primeira ERO a ser produzida pela ativação da NADPH Oxidase. Quando os neutrófilos são ativados, as EROs geradas podem converter, via oxigenação, sondas quimiluminescentes, como a lucigenina, à derivados intermediários instáveis e excitados, induzindo a emissão de luz na forma de fótons.

Portanto, o ácido cafeico e seus derivados foram inicialmente testados como inibidores da quimiluminescência da lucigenina produzida pela ativação de neutrófilos. A lucigenina é preferencialmente reduzida pelo $\text{O}_2^{\cdot-}$, onde o O_2 produzido pela ativação da NADPH Oxidase reduz a lucigenina para seu radical cátion, que reage conseqüentemente com outra molécula de O_2 ,

formando uma molécula rica em energia, chamada dioxietano, que se decompõe emitindo luz (GASBARRINI et al., 1998; ALVEZ et al., 2003).

Quando testados em ensaios *ex-vivo*, o CAPE apresentou-se significativamente mais potente que os outros compostos. Como pode ser observado na Figura 19, o ácido cafeico e CIPE foram totalmente ineficientes, enquanto o ácido clorogênico apresentou certa inibição da produção de $O_2^{\cdot-}$, porém o CAPE foi o composto mais eficiente.

O ensaio dependente de lucigenina, apesar de ser altamente utilizado como detecção de $O_2^{\cdot-}$, apresenta certas controvérsias quanto a sua seletividade (BARBACANNE et al., 2000). Por este motivo, considerando a alta eficácia do CAPE, realizamos a ativação da NADPH Oxidase em neutrófilos utilizando uma segunda sonda cromogênica para $O_2^{\cdot-}$, WST-1. As vantagens desta sonda, é sua solubilidade em água e sua impermeabilidade de membrana, onde o sal de formazana produzido pela reação específica com $O_2^{\cdot-}$ pode ser detectada de forma extracelular em medidas de absorbâncias convencionais. Pelos resultados apresentados na Figura 21, podemos concluir que a alta capacidade de inibição da produção de $O_2^{\cdot-}$ mostrada por CAPE foi confirmada neste ensaio de WST-1. O ensaio com lucigenina, combinado ao WST-1, confirmou a evidência de que o efeito inibitório não é devido a interação dos compostos com as sondas luminescentes ou cromogênicas, sugerindo uma real inibição da NADPH Oxidase. Também pode-se eliminar a possibilidade destes resultados serem devido uma citotoxicidade dos compostos em relação ao neutrófilos utilizados, pois pelo ensaio Azul de Trypan, a viabilidade mostrou-se maior de 98% (dados não mostrados).

Para confirmar que este potente resultado de CAPE não é por tão somente pela sua alta eficiência como antioxidante, testamos os compostos por sua atividade *scavenger* de $O_2^{\cdot-}$; realizou-se um

estudo livre de células, portanto livre de NADPH Oxidase, utilizando a xantina/xantina oxidase como produtora de $O_2^{\cdot-}$. Como é mostrado pela Figura 22, nas mesmas concentrações utilizadas nos ensaios anteriores, as diferenças entre CAPE, ácido cafeico e ácido clorogênico não foram significativamente expressiva.

CAPE também foi mais potente que a apocinina, um conhecido inibidor de NADPH Oxidase, utilizado como padrão nestes ensaios. A eficácia da esterificação de ácidos fenólicos pode ser mostrada em estudos realizados com ácido cafeico e ésteres alquílicos (PARACATU et al., 2013) e ácido protocatecúico e seus derivados ésteres (DE FARIA et al, 2012).

O efeito biológico do CAPE em células PMN ativadas, também teve consequências sobre a produção de HOCl. Este achado é altamente significativo, pois, além de ser o principal e o mais potente microbicida produzido por essas células, o HOCl é capaz de atacar biomoléculas de importância fisiológica, além dos tecidos, visto que células de mamíferos não são capazes de inibir a ação deste radical por via catalítica devido à ausência de defesas enzimáticas contra oxidantes clorados, estando relacionado com lesão tecidual em diversas patologias, incluindo doenças cardiovasculares (BAI et al., 2009; FORD, 2010). Os resultados mostrados na Figura 23 indicam um grande efeito inibitório da produção de HOCl quando as células foram tratadas com ácido cafeico e seus derivados. Mais uma vez o CAPE demonstrou ser o mais eficiente, inibindo a produção de HOCl.

No entanto, três diferentes razões poderiam explicar esta diminuição na produção de HOCl por neutrófilos ativados, quando tratados com CAPE: (a) Inibição da atividade da enzima MPO; (b) atividade *scavenger* direta ao HOCl; e (c) inibição da produção de $O_2^{\cdot-}$.

Em um sistema livre de células (excluindo, assim, qualquer interferente que pudesse estar envolvido em um ensaio celular),

medimos a capacidade dos compostos de inibir a atividade clorinante da enzima MPO. Na Figura 24, vemos que todos os compostos, incluindo o CAPE, foram incapazes de inibir a produção de HOCl neste ensaio livre de células, portanto, não inibindo a atividade da enzima MPO ou atuando como *scavenger* de HOCl.

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. Nestes ensaios, utilizamos como padrão a flurotriptamina, um potente inibidor de MPO, onde nesses ensaios, foi capaz de bloquear a produção de HOCl.

De acordo com a cascata enzimática de produção de EROs pela NADPH Oxidase, a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ para H_2O_2 é o próximo passo a ser estudado, mas para fins didáticos, vamos analisa-los agora. A avaliação da inibição da produção de H_2O_2 foi realizada utilizando a sonda fluorescente, Amplex Red. Este ensaio tem sido reportado como um método altamente específico e sensível para a detecção de peróxido de hidrogênio extracelular, de acordo com a pesquisa de Rinaldi e colaboradores (2007).

Observando os dados apresentados na Figura 25, concluiu-se que o C2 (CAPE) foi o mais potente inibidor deste ensaio. A detecção de H_2O_2 por Amplex Red é baseada na oxidação catalisada por uma peroxidase, a MPO no caso dos neutrófilos. Nossos resultados mostraram que CAPE foi capaz de inibir 94% do H_2O_2 produzido por PMN, na sua maior concentração testada (10 μ M). Enquanto que ácido cafeico (C1) inibiu cerca de 60%, porém as análises estatísticas apontaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre ambos, onde CAPE mostrou ser o melhor inibidor (Figura 22A).

Os resultados vêm mostrando que o aumento da hidrofobicidade resultante da esterificação do ácido cafeico, indicou um aumento significativo da inibição da enzima NADPH oxidase, e

que não se trata de uma ação “*scavenger*” dos compostos derivados sobre as EROs produzidas, como provamos em vários ensaios apresentados anteriormente.

Vários estudos já comprovaram a eficiência, a sensibilidade e a especificidade do ensaio com DHR para determinar a produção de H₂O₂ produzido no meio intracelular (RINALDI, 2007).

Para o ensaio de produção intracelular de H₂O₂, utilizamos dois estímulos diferentes, PMA e *Staphylococcus aureus*, visto que 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.

O PMA, utilizado por ativar neutrófilos e monócitos, induz rapidamente o consumo de oxigênio e produção de ânion superóxido e também é capaz de induzir uma série de reações em células fagocíticas, que muito se assemelham às 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*), induzindo a fagocitose da partícula bacteriana (RINALDI et al., 2007; JANN et al., 2011).

Basicamente, a ativação da NADPH oxidase por esses estímulos depende da ativação de uma proteína PKC, que participa da ativação fosforilando a frações de citoplasma como a p47phox e remodelamento o citoesqueleto de actina e da degranulação (BABIOR, 1999; EL-BENNA et al., 2005; PANDEY; FULTON, 2011, UYAMA et al., 2015). Essa proteína é composta por duas subunidades: (a) uma subunidade regulatória que apresenta os domínios C1, responsável pela ligação com PMA, e C2, responsável pela ligação de cálcio (sendo esta proteína dependente de ligações

com Ca^{2+}); (b) uma subunidade catalítica altamente conservada dentre as diferentes isoformas da PKC, que apresenta os domínios C3 responsáveis pela ligação do ATP e C4 para ligações do substrato (UEYAMA et al., 2004; ELBENNA et al., 2005; SANTOS, 2007). O PMA, que é um mediador solúvel capaz de atravessar a membrana plasmática, age como mensageiros, ao se ligar ao domínio C1 causa o aumento significativo da afinidade de PKC pela membrana celular, ativando diretamente PKC (EL-BENNA et al., 2005; SANTOS, 2007; PANDEY; FULTON, 2011).

Já o *Staphylococcus aureus* promove 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 então, lideram a liberação intracelular do mensageiro, por exemplo a fosfolipase C que cliva fosfatidilinositol (um lipídeo de membrana) em DAG (Diacilglicerol), onde a PKC também depende deste, e IP3 (trifosfatoinositol). Este IP3 está envolvido na liberação de cálcio intracelular e DAG ativa PKC (BABIOR, 1999; EL-BENNA et al., 2005).

Para este ensaio, a possibilidade da utilização do sangue total viabilizou melhores condições para a utilização de citometria de fluxo, devido a necessidade de pequenas quantidades de amostra e a ausência da necessidade de separação celular. Primeiramente, avaliou-se o ácido cafeico e derivados em várias concentrações a fim de determinarmos uma curva concentração-resposta, onde as concentrações testadas foram 50, 100, 200 e 500 μM . 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 (células estimuladas e isentas das substâncias de estudos) e a produção de H_2O_2 espontânea foi descontada. Os

resultados corresponderam a quantidade de peróxido de hidrogênio intracelular inibido ou não, pelas substâncias em relação ao total que foi produzido durante a reação.

Os resultados apresentados na Figura 26 mostraram que a porcentagem de inibição de peróxido de hidrogênio aumentou de acordo com o aumento da concentração de ácido cafeico e CAPE. Quando as células foram estimuladas com PMA (Figura 26A, 26B), C1 mostrou porcentagem de inibição do peróxido produzido no meio intracelular menor que 40%, mesmo em altas concentrações, enquanto que C2 apresentou capacidade de inibição significativa em relação ao anterior ($p < 0,05$). Quando neutrófilos foram estimulados com a bactéria (Figura 26C), C2 mostrou uma diminuição na capacidade de inibição, mas ainda assim, apresentou melhores resultados que seu precursor C1. Estes resultados corroboram com aqueles apresentados pelo ensaio de Amplex Red, quando a avaliação da inibição de peróxido foi feita extracelularmente. A capacidade inferior de inibição de C1 comparada a C2, exclui a possibilidade de uma ação sequestradora do peróxido e, mais uma vez, o aumento da lipofobicidade da substância determinou a melhoria do seu potencial inibidor.

Um estudo com um fluorapocinina, análogo da apocinina, mostrou melhor capacidade na inibição de H_2O_2 intracelular quando comparado a apocinina, em ensaio de DHR por citometria de fluxo. O estudo sugere que 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 cafeico, e sim a maior hidrofobicidade que estas substâncias apresentam, facilitando seu acesso às membranas celulares (ALMEIDA et al, 2011). Um estudo com ácido protocatecúico e diversos ésteres alquílicos realizado por nosso grupo de trabalho, mostrou que o mesmo padrão foi obtido, onde o éster protocateculato de heptila

apresentou melhores resultados de inibição da produção de H₂O₂ intracelular que seu precursor ácido (FARIA, 2014).

A fagocitose compreende uma das vias para ativação da NADPH oxidase representando um papel fundamental na imunidade do hospedeiro à invasão microbiana, portanto foi de grande interesse avaliação da capacidade do ácido cafeico e derivados em relação à sua interferência nesta função efetora dos neutrófilos. O ensaio de DHR nos permitiu avaliar a inibição do H₂O₂ intracelular por neutrófilos ativados com *S. aureus*, ao mesmo tempo nos permitiu avaliar se nossas substâncias interferiam na fagocitose. Os mesmos parâmetros foram utilizados para determinação da população celular: o tamanho (*forward scatter*, FSC) e a granulosidade celular (*side scatter*, SSC).

Os resultados mostraram que, quando os neutrófilos foram incubados, inicialmente com ácido cafeico ou CAPE e a fagocitose foi induzida pela bactéria, não houve diferença na capacidade fagocítica destas células quando comparada as células controle positivo da reação (não foram tratadas com as substâncias). Este resultado foi demonstrado independente da concentração da substância utilizada, sendo que estas variaram entre 200 e 500 µM (Figura 27A). 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 C1 quanto de C2). No entanto, o CAPE (C2) não apresentou diferenças significativas entre as concentrações de 200µM e 500µM, inibindo cerca de 70% da internalização de bactérias, não apresentando também diferenças significativa com ácido cafeico na sua maior concentração 500µM (Figura 27B).

Pode-se concluir, de modo geral, nestas altas concentrações, as substâncias não alteram a capacidade fagocítica da célula. Outro fator importante, estes resultados indicam que a lipofilicidade da

substância não tem relação com potência fagocítica celular, não sendo um fator relevante para que uma possível alteração nesta atividade dos fagócitos fosse provocada.

Resultados obtidos por Wang e colaboradores (2009) em ensaios realizados com CAPE, na concentração de 10 μ M, mostraram que esta substância inibiu seletivamente NADPH oxidase, mas não inibiu a capacidade fagocítica em monócitos humanos. Estes resultados corroboram com aqueles apresentados no presente trabalho. Outro estudo recente com a apocinina e fluorapocinina, mostrou resultados semelhantes aos deste estudo, onde a apocinina e seu derivado diminuíram a quantidade de bactérias internalizadas, mas não inibiu a fagocitose (ALMEIDA et al, 2011).

A seletividade do éster fenetílico do ácido cafeico em inibir a atividade de NADPH oxidase em neutrófilos, porém não induzir alteração na atividade fagocítica de neutrófilos pode ser uma característica importante e vantajosa, por exemplo, em doenças crônicas como a DGC, 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.

A citocina TNF- α é uma das citocinas pró-inflamatórias mais envolvidas na resposta inflamatória, sendo produzida por macrófagos em resposta a determinados antígenos. Há evidências mostrando a relação desta citocina com a NADPH Oxidase em diversos modelos experimentais com diversas linhagens celulares. Alguns estudos recentes mostram que TNF- α participa do mecanismo de disfunção endotelial por induzir a ativação de NADPH oxidase e aumentar a produção de ânion superóxido prejudicando a vasodilatação do endotélio. 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- α . Sugerem ainda, que p47phox é essencial na ativação de NADPH oxidase induzida por TNF- α , por sua expressão e fosforilação serem reguladas e moduladas pela citocina (DEWAS et al., 2003; BARTH et al., 2012; HUANG et al., 2012; LONG et al., 2012).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, que desempenha um papel importante na regulação das respostas inflamatórias. Também produzida por macrófagos, 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. Esta citocina, quanto a relação com a NADPH Oxidase, regula a produção de EROs em neutrófilos. Além disso, inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias em resposta a LPS, LPS + INF-g e TNF- α , e regula negativamente a produção de EROs derivadas de NADPH oxidase (CASSATELLA, 1998; MOORE, 2001).

Considerando a relação entre NADPH Oxidase e a produção de TNF- α , decidiu-se comparar as substâncias C1 e C2 como inibidores da expressão de TNF- α por monócitos ativados por *S. aureus*. Os resultados expressos na Figura 28A podemos concluir que a maior hidrofobicidade de CAPE foi extremamente relevante para sua alta eficiência em diminuir a produção de TNF- α . Como já era esperado, o CAPE foi significativamente mais efetivo que seu precursor ácido, inibindo a produção de TNF- α em mais de 90% em sua maior concentração de 70 μ M, enquanto o ácido cafeico, obteve uma inibição da produção desta citocina bastante inferior, na mesma concentração.

Resultados similares foram obtidos para IL-10, como pode ser observado na Figura 28B, CAPE inibiu cerca de 100% da produção de IL-10 na concentração de 70 μ M, apresentando uma diferença estatística significativa quando comparado com seu

precursor. O fato do composto CAPE ser mais efetivo na inibição da produção da IL-10 pode ser mais uma consequência da relação desta citocina com a NADPH Oxidase.

Uma evidência adicional que prova que a hidrofobicidade é um fator importante no efeito biológico de um composto, visto que ambos compostos apresentam potências antioxidantes similares, o que é altamente relacionado com a ativação da NADPH Oxidase.

Estudos mostram que o CAPE já se apresentou efetivo na inibição da produção de TNF- α , expressos em macrófagos estimulados por LPS, inibindo de modo dose-dependente, apresentando resultados significativos acima de 10 μ M, inibindo a secreção desta citocina em macrófagos (JUMAN et al., 2012). Outro estudo, conduzido por Sy e colaboradores (2011), mostrou que CAPE foi capaz de aumentar a secreção de TGF- β 1 e inibir a produção de IL-10. CAPE inibiu a produção de IL-10 por monócitos humanos de crianças saudáveis estimulados por PMA, corroborando com os resultados de nossa pesquisa (SY et al., 2011).

O aumento da infiltração de neutrófilos, aumenta a produção de TNF- α , em doenças cardíacas induzidas por endotoxinas. O efeito inibitório de CAPE sobre a produção de TNF- α pode estar relacionado ao fato de que, CAPE é um conhecido inibidor de NF- κ β (Nuclear fator-kappa beta), um dos mais importantes fatores de transcrição que regula a expressão de genes envolvidos na proliferação celular, respostas inflamatórias e adesão celular. Inibindo este fator NF- κ β , consecutivamente, inibiria a produção de diversas citocinas pró-inflamatórias (MOTAWI; DARWISH; ABD EL TAWAB, 2010).

A inibição de TNF- α se fez importante porque demonstrou um efeito protetor do éster do ácido cafeico e em menor grau, do ácido cafeico, 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, mostrando um alto potencial para intervenções terapêuticas.

Apesar do sistema imune humano ser altamente especializado e eficiente em lutar contra infecções bacterianas, alguns patógenos desenvolveram a capacidade de se esquivar e explorar esta capacidade em seu próprio benefício, permanecendo no organismo hospedeiro, causando serias consequências como imunodeficiência, câncer e morte, como por exemplo uma infecção por *Helicobacter pylori* (PARACATU et al., 2013). Estudos apontaram para o papel de IL-10 na diminuição da resposta imune anti-viral e a capacidade do vírus de persistir no corpo humano. A indução na produção da IL-10 pelo hospedeiro durante uma infecção crônica parece ser um meio viral de induzir a supressão do sistema imune, sugerindo que é possível retomar a imunidade anti-viral interferindo na expressão de IL-10 (FILIPPI; VON HERRATH, 2008; KANEGAE et al., 2010).

A tendência de compostos fenólicos como a apocinina e agora, baseado em nossos resultados, o CAPE em inibir a produção de IL-10, contradiz o efeito clássico dos antioxidantes de manter os níveis altos de IL-10 em uma resposta inflamatória, no entanto, em uma doença crônica, a regulação de IL-10 e TNF- α por CAPE pode ser útil em combater a cronicidade de certas doenças (KANEGAE et al., 2010).

Como dito anteriormente, além do seu papel normal na fisiologia, uma ativação crônica ou uma alta produção de EROs pelas Nox, levam ao estresse oxidativo, o mecanismo chave para o desenvolvimento de diversas patologias crônicas, como aterosclerose, diabetes, doença de Alzheimer (HIRANO et al., 2015). Diversos estudos com animais, utilizando as frações gp91phox e/ou p47phox, sugerem que inibição de Nox2 pode ser uma importante estratégia terapêutica (HIRANO et al., 2015).

A apocinina, ou seus análogos como oligofenóis e quinonas, tem sido um dos mais estudados inibidores de NADPH Oxidase (MORA-PALE et al., 2012). Em estudo realizado com oligofenol da apocinina, Mora-Pale e colaboradores (2009) provou que este composto foi capaz de inibir a ligação da fração p47phox com a fração p22phox, através de ensaio com cultura de células endoteliais.

Nossos ensaios com células endoteliais, apresentados na Figura 31, apresentam a ligação das partículas de membrana p22phox com sua fração de citoplasma, p47phox, observado pela fluorescência na Figura 31C; no entanto não foi possível confirmar com este ensaio, a inibição da ligação destas quando tratadas com CAPE. Faz-se necessário, uma marcação fluorescente de uma das proteínas para visualizar a translocação para a membrana, que não foi possível observar neste ensaio, como foi mostrado no estudo realizado por UYEAMA e colaboradores (2007), onde células estimuladas com ácido araquidônico apresentaram a ligação entre as frações de NADPH Oxidase. Em outro estudo realizado por YUEAMA e colaboradores (2011), foi observado a translocação das frações de membrana em células HEK293, quando estimuladas e observadas em microscopia confocal. O *troubleshooting*, ou seja, a descoberta e correções dos problemas com o ensaio faz-se necessária. Uma vez visualizado a translocação via microscopia, uma confirmação por ensaio de *pull down* ou *western blot* para a real confirmação da inibição ou não dos compostos para estas frações será necessária.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Devido ao envolvimento das espécies reativas de oxigênio nas patologias de diversas doenças, grupos de pesquisas estão tentando desenvolver um efetivo e não-tóxico inibidor de NADPH Oxidase. Neste estudo, demonstramos, pela primeira vez o éster fenético do ácido cafeico, além do seu enorme potencial antioxidante e propriedades benéficas para a saúde, também é um potente inibidor da NADPH Oxidase. Os resultados aqui apresentados, mostraram claramente que além da sua porção catecol redox ativa, o aumento na hidrofobicidade de um composto causado pela sua esterificação foi importante para sua atividade eficaz.

Demonstramos usando um painel de ensaios, que a capacidade antioxidante de CAPE em ensaios livre de células não foi significativamente diferente do seu precursor ácido cafeico ou do ácido clorogênico.

No entanto, quando testados em ensaios celulares, o CAPE mostrou-se sempre mais potente e efetivo inibidor. Está claro que estes resultados são consequência da capacidade de CAPE difundir-se nas células e atingir o complexo multienzimático, NADPH Oxidase.

Como um potente inibidor de NADPH Oxidase, este composto natural derivado de própolis, poderá se constituir como um promissor fármaco para o tratamento de doenças crônicas inflamatórias, especialmente. Dentro desse contexto é importante considerar a sua seletividade em inibir a atividade de NADPH oxidase, porém não induzir alteração na atividade fagocítica de neutrófilos. Isto é uma característica importante e vantajosa, já que a fagocitose é uma atividade efetora importante do sistema imune para o reconhecimento e eliminação bacteriana, no combate à infecções por este tipo de patógeno.

Finalmente, quando analisamos a inibição eficaz da produção de TNF- α e IL-10 pelo composto CAPE, conclui-se que se trata de um composto com potencial atividade imunorreguladora.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.C. et al. 4-Fluoro-2-methoxyphenol, an apocynin analog with enhanced inhibitory effect on leukocyte oxidant production and phagocytosis. **Eur. J. Pharmacol.**, v.660, p.445–453, 2011.

ALVES, C.M.O.S. et al. 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.

AMBRUSO, D.R.; CUSACK, N.; THURMAN, G. NADPH oxidase activity of neutrophil specific granules: requirements for cytosolic components and evidence of assembly during cell activation. **Mol. Genet. Metab.**, v.81, p.313–321, 2004.

ARNOULD, T.; MICHIELS, C.; REMACLE, J. Hypoxic Human Umbilical Vein Endothelial Cells Induce Activation of Adherent Polymorphonuclear Leukocytes. **Blood**, v.83, n.12, p.3705-3716, 1994.

ARUOMA, O.I. et al. Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. **J. Agric. Food Chem.**, v.41, p.1880-5, 1993.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase: An Update. **Blood**, v. 93, n. 5, p. 1464-1476, 1999.

BABIOR, B. M.; COHEN, H. J. Phagocytes and oxidative stress. **Am. J. Med.**, v. 109, n. 1, p. 3-44, 2000.

BABIOR, B.M. NADPH Oxidase. **Curr. Opin. Immunol.**, v.16, p.42–47, 2004.

BAI, Y.P. et al. 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.

BANFI, B. et al. NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 44, p. 46065-46072, 2004.

BARBACANNE, M. et al. Detection of superoxide anion released extracellularly by endothelial cells using cytochrome c reduction, ESR, fluorescence and lucigenin-enhanced chemiluminescence techniques. **Free Radic. Biol. Med.**, vol. 29, no. 5, pp. 388–396, 2000.

BARTH, B.M. et al. Ceramide kinase regulates TNF α -stimulated NADPH oxidase activity and eicosanoid biosynthesis in neuroblastoma cells. **Cell Signal.**, v. 24, no. 6, p. 1126–1133, 2012.

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.

BROWN, D.I.; GRIENGLING, K.K. Nox proteins in signal transduction. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 47, n. 9, p. 1239-1253, 2009.

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. et al. 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.

CHAI, H. et al. Ginsenoside Rb1 Inhibits Tumor Necrosis Factor- α -Induced Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression in Human Endothelial Cells. **Biol. Pharm. Bull.**, v.31, n.11, p.2050-2056, 2008.

CHALAS, J. et al. Effect of ethyl esterification of phenolic acids on low-density lipoprotein oxidation. **Biomed. Pharmacother.**, v. 55, n. 1, p. 54-60, 2001.

CHEN, C.H. et al. 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. et al. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. **Gene.** v. 269, n. 1-2, p. 131-140, 2001.

COMINACINI, L. et al. Nebivolol and its 4-Keto Derivative Increase Nitric Oxide in Endothelial Cells by Reducing its Oxidative Inactivation. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.42, n.10, p.1838-44, 2003.

CROTZER, V.L. et al. Cutting Edge: NADPH Oxidase Modulates MHC Class II Antigen Presentation by B Cells. **J. Immunol.** 2012.

DE DEKEN, X. et al. 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.

DEWAS, C. et al. TNF- α induces phosphorylation of p47phox in human neutrophils: Partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF- α and

granulocytemacrophage colony-stimulating factor. **J. Immunol.**, vol. 171, no. 8, pp. 4392–4398, 2003.

DODD-O, J.M. et al. Effect of NADPH oxidase inhibition on caripulmonary bypass-induced lung injury. **Am. J. Physiol. Hearth Circ. Physiol.**, v. 287, n. 2, p. 927-936, 2004.

DRUMMOND, G.R. et al. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. **Nat. Rev. Drug Discov.** v.10, p.453-471, 2011.

EID, H.M. et al. Structural constraints and the importance of lipophilicity for the mitochondrial uncoupling activity of naturally occurring caffeic acid esters with potential for the treatment of insulin resistance. **Biochem. Pharmacol.**, v.79, p.444–454, 2010.

EL-BENNA, J. et al. 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.

DE FARIA, C.M.Q.G. et al. 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.

FARIA, Carolina Maria Quinello Gomes. **Ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos: propriedades antioxidantes e seus efeitos no metabolismo oxidativo de leucócitos.** 2014. Tese. (Doutorado em Bioquímica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, Araraquara, São Paulo.

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. eds. **Williams Hematology.** 7th. ed. New York: MacGraw-Hill, 2003. p. 224.

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.

FILIPPI, C.M.; VON HERRATH, M.G. IL-10 and the resolution of infections, **J. Pathol.**, v.214, p. 224–230, 2008.

FIUZZA, S.M. et al. Phenolic acid Derivatives with potential anticancer properties a structure–activity relationship study. Part 1:

Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. **Bioorg. Med. Chem.**, v.12, p.3581–3589, 2004.

FISCHER, M.T. et al. 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.

FREIRE, B.F.A.; QUELUZ, T.H.A.T. Neutrófilo: morfologia, cinética e funções. **J. Pneumol.**, v. 21, n. 4, p. 180-184, 1995.

GAO, H.M.; ZHOU, H.; HONG, J.S. NADPH oxidases: novel therapeutic targets for neurodegenerative diseases. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.33, n.6, p. 295-303, 2012.

GASBARRINI, A. et al. 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.

GASPAR, A. et al. Dietary Phenolic Acids and Derivatives. Evaluation of the Antioxidant Activity of Sinapic Acid and Its Alkyl Esters. **J. Agric. Food Chem.**, v.58, p.11273–11280, 2010.

GHOSE, A.K.; CRIPPEN, G.M. Atomic physicochemical parameters for threedimensional- structure-directed quantitative structureactivity relationships. 2. Modeling dispersive and hydrophobic interactions. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.**, v. 27, n. 1, p. 21-35; 1987.

GÖÇER, H.; GÜLÇİN, I. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): correlation of structure and antioxidant properties. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, v.62, n.8, p.821–825, 2010.

GONTHIER, M.P. et al. Microbial metabolism of caffeic acid and its esters chlorogenic and caftaric acids by human faecal microbiota in vitro. **Biomed. Pharmacother.**, v.60, p.536–540, 2006.

GROEMPING, Y.; RITTINGER, K. Activation and assembly of the NADPH Oxidase: a structural perspective. **Biochem. J.**, v.386, p.401-416, 2005.

GROTE, K. et al. Critical role for p47phox in reninangiotensin system activation and blood pressure regulation. **Cardiovasc. Res.**, v.71, p. 596–605, 2006.

HA, S.H. et al. Effect of ionic liquids on enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v.35, p.235–240, 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.

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.

HIRANO, K. et al. Discovery of GSK2795039, a Novel Small Molecule NADPH Oxidase 2 Inhibitor. **Antioxid. Redox. Signal.**, v.23, n.5, p.358-374, 2015.

HOIDAL, J.R. et al. Theeffect of phorbol myristate acetate on the metabolism and ultrastructure ofhuman alveolar macrophages. **Am. J. Pathol.**, v. 91, n. 3, p. 469-482, 1998.

HUANG, Y. et al. TNF- α induces endothelial dysfunction via PKC- ζ -dependentNADPH oxidase activation. **J. Huazhong. Univ. Sci. Technol. Med. Sci.**, vol. 32, no. 5, pp. 642–647, 2012.

HUTCHINSON, D.S. et al. 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.

JANN, N.J. et al. 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.; et al. 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. et al. 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. et al. Inhibition of NADPH Oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. **Endothelium**, v.9, p.191- 203, 2002.

JUMAN, S. et al. Caffeic Acid Phenethyl Ester Suppresses the Production of Proinflammatory Cytokines in Hypertrophic Adipocytes through Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages. **Biol. Pharm. Bull.** v.35, n.11, p.1941–1946, 2012.

KAMIGUTI, A.S. et al. 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.

KANEGAE, M.P. et al. 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. et al. The reactivity of ortho-methoxy-substituted catechol radicals with sulfhydryl groups: contribution for the comprehension of the mechanism of inhibition of NADPH of inhibition of NADPH oxidase by apocynin. **Biochem. Pharmacol.**, v. 74, n.3, p. 457-64, 2007.

KAWAHARA, T. et al. 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.

KLENIEWSKA, P. et al. The NADPH Oxidase Family and its Inhibitors. **Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)**, v. 60, n. 4, p. 277-294, 2012.

KITAGAWA, R.R. et al. Effect of the Isocoumarin Paepalantine on the Luminol and Lucigenin Amplified Chemiluminescence of Rat Neutrophils. **Biol. Pharm. Bull**, v.26, n.6, p.905-908, 2003.

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

KOMIYA, M. et al. Suppressive effects of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on intestinal tumorigenesis in obese KK-Ay and Apc mutant Min mice. **Cancer Sci.**, v.106, p.1499–1505, 2015.

KUBO, I. et al. Antioxidant Activity of Dodecyl Gallate. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p.3533-3539, 2002.

KUBO, I. et al. Antibacterial activity of alkylgallates against *Bacillus subtilis*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 5, p. 1072-1076, 2004.

KUDUGUNTI, S. et al. The metabolic bioactivation of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) mediated by tyrosinase selectively inhibits glutathione S-transferase. **Chem Biol Interact.**, v.192, p.243–256, 2011.

KUDUGUNTI, S. et al. Biochemical mechanism of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) selective toxicity towards melanoma cell lines. **Chem. Biol. Interact.**, v.188, p.1–14, 2010.

LAGUERRE, L. M. et al. Conjugated autoxidizable triene (CAT) assay: a novel spectrophotometric method for determination of antioxidant capacity using triacylglycerol as ultraviolet probe. **Anal. Biochem.**, v. 380, n. 2, p. 282–290, 2008.

LAPENNA, D.; CUCCUROLLO, F. Hypochlorous acid and its Pharmacological Antagonism: An update picture. **Gen. Pharmacol.**, v. 27, n. 7, p. 1145-1147, 1996.

LASSÈGUE, B.; CLEMPUS, R.E. Vascular NAD(P)H Oxidases: specific features, expression, and regulation. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.285, p.277-297, 2003.

LE BLANC, L.M. et al. Synthesis and Antiradical/Antioxidant Activities of Caffeic Acid Phenethyl Ester and Its Related Propionic, Acetic, and Benzoic Acid Analogues. **Molecules**, v.17, p.14637-14650, 2012.

LEE, N.K. et al. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. **Blood**, v. 106, n. 3, p. 852-859, 2005.

LENDE, A.B. et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of protocatechuic acid in rats and mice. **Inflammopharmacology.**, v. 19, n. 5, p. 255-263, 2011.

LI, J.M.; SHAH, A.M. Intracellular localization and preassembly of the NADPH Oxidase complex in cultured endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v.277, n.22, p.19952-19969, 2002.

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.

LONG, T. et al. TNF- α , erectile dysfunction, and NADPH oxidase-mediated ROS generation in corpus cavernosum in high-fat

diet/ streptozotocin-induced diabetic rats. **J. Sex. Med.**, vol. 9, no. 7, pp. 1801–1814, 2012.

LU, Z. et al. Structure–activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. **Neurochem. Int.**, v.48, p.263–274, 2006.

LUQMAN, S. et al. Experimental Assessment of Moringa oleifera Leaf and Fruit for Its Antistress, Antioxidant, and Scavenging Potential Using. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v.2012, 2012.

MADDOX, C.E.; LAUR, L.M. Antibacterial Activity of Phenolic Compounds Against the Phytopathogen *Xylella fastidiosa*. **Curr. Microbiol.**, v.60, p.53–58, 2010.

MCCANN, S.K.; ROULSTON, C.L. NADPH Oxidase as a Therapeutic Target for Neuroprotection against Ischaemic Stroke: Future Perspectives. **Brain Sci.**, v.3, p.561-598, 2013.

MOON, M.K. et al. Effect of Caffeic Acid on Tumor Necrosis Factor-Alpha-Induced Vascular Inflammation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. **Biol. Pharm. Bull.**, v.32, n.8, p.1371—1377, 2009.

MOORE, K.W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 683-765, 2001.

MORAIS, M.C. et al. Suppression of TNF- α induced NF κ B activity by gallic acid and its semisynthetic esters: possible role in cancer chemoprevention. **Nat. Prod. Res.**, v.24, n.18, p.1758-1765, 2010.

MORA-PALE, M. et al. Inhibition of human vascular NADPH oxidase by apocynin derived oligophenols. **Bioorg. Med. Chem.**, v.17, p.5146–5152, 2009.

MORA-PALE, M. et al. 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, p.962–969, 2012.

MOTAWI, T.K.; DARWISH, H.A.; ABD EL TAWAB, A.M. Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Endotoxin-Induced Cardiac Stress in Rats: A Possible Mechanism of Protection. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, p.1-10, 2010

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. et al. Alkyl caffeates as anti-Helicobacter pylori and scavenger of oxidants produced by neutrophils. **Med. Chem.**, v. 10, n.1, p. 74-80, 2013.

PARACATU, L.C. et al. Hydrophobicity and antioxidant activity acting together for the beneficial health properties of nordihydroguaiaretic acid. **Food Funct.**, v.6, n.6, p.1818-31, 2015.

PASTENE, E. et al. 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.

PFARR, N. et al. Congenital hypothyroidism caused by new mutations in the thyroid oxidase 2 (THOX2) gene. **Clin. Endocrinol. (Oxf)**, v. 65, n. 6, p. 810-815, 2006.

PONGNIMITPRASERT, N. Atherosclerosis and NADPH Oxidase. **Silpakorn. U. Sci. Tech. J.**, v.3, n.1, p. 13-34, 2009.

RADA, B. et al. Role of Nox2 in elimination of microorganisms. **Semin. Immunopathol.**, v. 30, n. 3, p. 237-253, 2008.

REIS, B. et al. 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.

RICHARDSON, M.P. et al. 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. et al. 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.

ROSSO, R. et al. Relationship between the lipophilicity of gallic acid n-alkyl esters' derivatives and both myeloperoxidase activity and HOCl scavenging. **Bioorg. Med. Chem.**, v.14, p.6409–6413, 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.

SHI, G.F. et al. 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.

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.

SELEMIDIS, S. et al. NADPH oxidases in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. **Pharmacol. Ther.**, v. 120, n. 3, p.254-291, 2008.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Curr. Protoc. Immunol.**, 2001.

SY, L.B. et al. The Immunoregulatory Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester on the Cytokine Secretion of Peripheral Blood Mononuclear Cells from Asthmatic Children. **Pediatr. Neonatol.**, v.52, p.327-331, 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. et al. 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.

UEYAMA et al. Superoxide Production at Phagosomal Cup/Phagosome through Protein Kinase C during Fc_R-Mediated Phagocytosis in Microglia. **J. Immunol.**, v.173, p.4582–4589, 2004.

UEYAMA et al. A Regulated Adaptor Function of p40*phox*: Distinct p67*phox* Membrane Targeting by p40*phox* and by p47*phox*. **Mol. Biol. Cell.**, v.18, p.441–454, 2007.

UEYAMA et al. Cooperation of p40*phox* with p47*phox* for Nox2-based NADPH Oxidase Activation during Fc_R Receptor (Fc_R)-mediated Phagocytosis. **J. Biol. Chem.**, v.286, n.47, p.40693–40705, 2011.

VASSELON, T.; DETMERS, P.A. Toll receptors: a central element in innate immune responses. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 3, p. 1033-1041, 2002.

WANG, L.C. et al. The effect of caffeic acid phenethyl ester on the functions of human monocyte-derived dendritic cells. **BMC Immunol.**, v.10, n.39, 2009.

WANG, H. et al. Altered vascular activation due to deficiency of the NADPH oxidase component p22phox. **Cardiovasc. Pathol.**, v.23, n.1, p. 35-42, 2013.

WATANABE, M.A.E. et al. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.63, p.1378–1386, 2011.

WASSMANN, S. et al. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.22, n. 2, p. 300-305, 2002.

WEN, Y.D. et al. Hydrogen Sulfide Protects HUVECs against Hydrogen Peroxide Induced Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress. **Plos One.**, v.8, n.2, 2013.

XIMENES, V.F. et al. 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, p.5355–5362, 2010.

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.

YU, L. et al. Gp91phox is the heme binding subunit of the superoxide generating NADPH oxidase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v 95, p.7993–7998, 1998.

ZHANG, L. et al. NADPH Oxidase: A Potential Target for Treatment of Stroke. **Oxid Med. Cell Longev.**, v.2016, p.1-9, 2016.

ZHAO, J. et al. Caffeic Acid Phenethyl Ester Protects Blood–Brain Barrier Integrity and Reduces Contusion Volume in Rodent Models of Traumatic Brain Injury. **J. Neurotrauma.**, v.29, p1209–1218, 2012.

ZHOU, H. et al. Rotenone activates phagocyte NADPH oxidase by binding to its membrane subunit gp91phox. **Free Radic. Biol. Med.**, v.52, p.303–313, 2012.

CAPÍTULO 2



Research Article

Caffeic Acid Phenethyl Ester: Consequences of Its Hydrophobicity in the Oxidative Functions and Cytokine Release by Leukocytes

Luana Chiquetto Paracatu,¹ Carolina Maria Quinello Gomes Faria,¹
 Camila Quinello,² Camila Rennó,² Patricia Palmeira,² Maria Luiza Zeralk,³
 Luiz Marcos da Fonseca,¹ and Valdecir Farias Ximenes^{1,4}

¹ Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), 14801-902 Araraquara, SP, Brazil

² Department of Pediatrics, Medical School, University of São Paulo, 05403-900 São Paulo, SP, Brazil

³ Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, São Paulo State University (UNESP), 14800-900 Araraquara, SP, Brazil

⁴ Department of Chemistry, Faculty of Sciences, São Paulo State University (UNESP), 17033-360 Bauru, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Valdecir Farias Ximenes; vfximenes@fc.unesp.br

Received 22 April 2014; Revised 23 July 2014; Accepted 24 July 2014; Published 28 August 2014

Academic Editor: Raffaele Capasso

Copyright © 2014 Luana Chiquetto Paracatu et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Numerous anti-inflammatory properties have been attributed to caffeic acid phenethyl ester (CAPE), an active component of propolis. NADPH oxidases are multienzymatic complexes involved in many inflammatory diseases. Here, we studied the importance of the CAPE hydrophobicity on cell-free antioxidant capacity, inhibition of the NADPH oxidase and hypochlorous acid production, and release of TNF- α and IL-10 by activated leukocytes. The comparison was made with the related, but less hydrophobic, caffeic and chlorogenic acids. Cell-free studies such as superoxide anion scavenging assay, triene degradation, and anodic peak potential (E_{pa}) measurements showed that the alterations in the hydrophobicity did not provoke significant changes in the oxidation potential and antiradical potency of the tested compounds. However, only CAPE was able to inhibit the production of superoxide anion by activated leukocytes. The inhibition of the NADPH oxidase resulted in the blockage of production of hypochlorous acid. Similarly, CAPE was the more effective inhibitor of the release of TNF- α and IL-10 by *Staphylococcus aureus* stimulated cells. In conclusion, the presence of the catechol moiety and the higher hydrophobicity were essential for the biological effects. Considering the involvement of NADPH oxidases in the genesis and progression of inflammatory diseases, CAPE should be considered as a promising anti-inflammatory drug.

1. Introduction

Propolis is a resin produced by honeybees and its chemical composition, colour, and aroma are changed according to geographical zones. Despite the chemical composition diversity, phenolic compounds are constituents that are always present in this natural product [1]. Among them, caffeic acid phenethyl ester is one of the propolis active components for which many potentially beneficial health properties have been demonstrated. Some recent findings include its antithrombotic potential through the inhibition of tumour necrosis

factor- (TNF- α) induced endothelial tissue factor expression and activity [2]. Suppression of the phosphoinositide 3-kinase/AKT/XIAP pathway has also been shown to lead to apoptosis in melanoma tumour cells both *in vitro* and *in vivo* [3]. Application is used for the treatment of burn wound healing, leading to a decrease in inflammatory parameters and in oxidative damage [4] and also has anti-*Helicobacter pylori* activity, through the inhibition of the *Helicobacter pylori* peptide deformylase [5].

NADPH oxidases are multienzymatic complexes which catalyse the one-electron reduction of molecular oxygen



Cite this: DOI: 10.1039/c5fo00091b

Hydrophobicity and antioxidant activity acting together for the beneficial health properties of nordihydroguaiaretic acid

Luana Chiquetto Paracatu,^{†a} Carolina Maria Quinello Gomes de Faria,^{†a} Maria Luiza Zeraik,^{†b} Camila Quinello,^c Camila Rennó,^c Patricia Palmeira,^c Luiz Marcos da Fonseca^a and Valdecir Farias Ximenes^{*,a,d}

Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and rosmarinic acid (RA), phenolic compounds found in various plants and functional foods, have known antioxidant and anti-inflammatory properties. In the present study, we comparatively investigated the importance of hydrophobicity and oxidisability of NDGA and RA, regarding their antioxidant and pharmacological activities. Using a panel of cell-free antioxidant protocols, including electrochemical measurements, we demonstrated that the anti-radical capacities of RA and NDGA were similar. However, the relative capacity of NDGA as an inhibitor of NADPH oxidase (*ex vivo* assays) was significantly higher compared to RA. The inhibitory effect on NADPH oxidase was not related to simple scavengers of superoxide anions, as confirmed by oxygen consumption by the activated neutrophils. The higher hydrophobicity of NDGA was also a determinant for the higher efficacy of NDGA regarding the inhibition of the release of hypochlorous acid by PMA-activated neutrophil and cytokine (TNF- α and IL-10) production by *Staphylococcus aureus*-stimulated peripheral blood mononuclear cells. In conclusion, although there have been extensive studies about the pharmacological properties of NDGA, our study showed, for the first time, the importance not only of its antioxidant activity, but also its hydrophobicity as a crucial factor for pharmacological action.

Received 24th January 2015,

Accepted 19th April 2015

DOI: 10.1039/c5fo00091b

www.rsc.org/foodfunction

1. Introduction

Polyphenols are one of the most numerous and widely distributed groups of substances in the plant kingdom; these compounds have currently attracted much attention as active constituents in functional foods and food supplements, which promise to improve human health.^{1,2} Polyphenols are known to possess antioxidant activity that inhibits oxidative damage and may consequently prevent inflammatory conditions,^{3,4} neurodegenerative diseases and ageing.⁵ Certain phenolic compounds, such as nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and rosmarinic acid (RA) present in many plants and functional

foods, have been studied due to their pharmacological properties.

NDGA (Fig. 1) is a natural lignin and the main metabolite extracted from the Creosote bush, *Larrea tridentata*, a plant that is abundant in the United States and Mexico.⁶ NDGA was one of the earliest phenolic antioxidants permitted for the stabilisation of edible fats and oils.⁷ NDGA was used as a food antioxidant in the USA in the 1940s; however, in 1970, the US Food and Drug Administration limited its use after some reports of toxicity.⁸ However, its pharmacological form, also known as masoprocol, was approved in the United States and is currently used as a topical treatment for actinic keratosis under the name Actinex (Chemex Pharmaceuticals, Denver, CO).⁹ The number of potential beneficial health effects of NDGA is astonishing. It is a powerful scavenger of the most common reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species, including peroxynitrite (ONOO⁻), hypochlorous acid (HOCl), singlet oxygen (¹O₂) and hydroxyl radical (HO[•]).¹⁰ NDGA is also an anti-inflammatory,^{11,12} neuroprotective,¹³ anti-viral,¹⁴ anti-hyperlipidaemic¹⁵ and anti-cancer agent.¹⁶ A comprehensive review of NDGA and its pharmacological properties can be found in the studies of Lü *et al.*⁶ and Hernández-Damián *et al.*⁸

^aDepartment of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), 14801-902 Araraquã, São Paulo, Brazil

^bDepartment of Organic Chemistry, Núcleo de Biotecnologia, Ecophysiology and Biotechnology of Natural Products (NuBBE), Institute of Chemistry, São Paulo State University (UNESP), 14800-060 Araraquã, São Paulo, Brazil

^cDepartment of Pediatrics, Medical School, University of São Paulo (USP), 05403-900 São Paulo, Brazil

^dDepartment of Chemistry, Faculty of Sciences, São Paulo State University (UNESP), 17033-36 Bauri, São Paulo, Brazil. E-mail: vfximenes@fcs.unesp.br

Tel: +55 14 3301-6088

† These authors contributed equally to this work.

APÊNDICE

FACULDADES DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DO
CÂMPUS DE ARARAQUARA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da relação entre estrutura química e atividade biológica de inibidores da NADPH-Oxidase em leucócitos: Relevância da oxidabilidade e hidrofobicidade.

Pesquisador: Luana Chiquetto Paracatu

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 21496413.8.0000.5426

Instituição Proponente: Faculdades de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 540.142

Data da Relatoria: 31/01/2014

Apresentação do Projeto:

O projeto relata, com detalhes, os procedimentos técnicos que serão realizados para estudar os processos enzimáticos envolvidos na produção e modulação de metabólitos oxidantes em leucócitos sob diferentes condições experimentais.

Para tanto, necessitará de sangue de seis voluntários para obtenção de leucócitos.

Os voluntários são membros do próprio grupo de pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

Expresso claramente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

São mínimos e relatados corretamente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem embasado em dados de literatura e, pelo que está descrito, não causará maiores problemas aos voluntários.

A coleta de sangue dos seis indivíduos segue o procedimento padrão e os voluntários são

Endereço: Rodovia Araraquara Jaú, Km 1

Bairro: Campus Universitário

CEP: 14.801-902

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6897

E-mail: sta@fctfar.unesp.br

FACULDADES DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DO
CÂMPUS DE ARARAQUARA



Continuação do Parecer: 540.142

membros do
grupo de pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Estão redigidos de forma correta.

Recomendações:

Correções executadas

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Reformulado o cronograma de execução.

ARARAQUARA, 25 de Fevereiro de 2014

Assinador por:
AMAURI ANTIQUERA LEITE
(Coordenador)

Endereço: Rodovia Araraquara Jaú, Km 1
Bairro: Campus Universitário CEP: 14.801-902
UF: SP Município: ARARAQUARA
Telefone: (16)3301-6897 E-mail: sta@fctar.unesp.br