



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais



**Desenvolvimento de Sonda Fluorescente para Determinação Específica da
Atividade Halogenante das Enzimas Mieloperoxidase e Peroxidase de
Eosinófilos**

Mestranda: Luiza de Carvalho Bertozo

Orientador: Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

BAURU

2017

Luiza de Carvalho Bertozo

Desenvolvimento de Sonda Fluorescente para a Determinação Específica da Atividade
Halogenante das Enzimas Mieloperoxidase e Peroxidase de Eosinófilos

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do título de Mestre à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, área de concentração Química dos Materiais, sob orientação do Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes.

Bauru – SP

2017

Bertoza, Luiza de Carvalho.

Desenvolvimento de Sonda Fluorescente para a
Determinação Específica da Atividade Halogenante das
Enzimas Mieloperoxidase e Peroxidase de Eosinófilos /
Luiza de Carvalho Bertoza, 2017
128 f.:il

Orientador: Valdecir Farias Ximenes

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual
Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2017

1. Ácido hipocloroso. 2. Ácido hipobromoso. 3.
Mieloperoxidase. I. Universidade Estadual Paulista.
Faculdade de Ciências. II. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Bauru



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LUIZA DE CARVALHO BERTOZO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS.

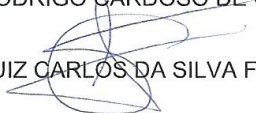
Aos 23 dias do mês de fevereiro do ano de 2017, às 14:00 horas, no(a) Anfiteatro da Pós-Graduação da Faculdade de Ciências - UNESP/Bauru, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. VALDECIR FARIAS XIMENES - Orientador(a) do(a) Departamento de Química / Faculdade de Ciências do Câmpus de Bauru da UNESP, Prof. Dr. RODRIGO CARDOSO DE OLIVEIRA do(a) Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, Prof. Dr. LUIZ CARLOS DA SILVA FILHO do(a) Departamento de Química / Faculdade de Ciências de Bauru, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de LUIZA DE CARVALHO BERTOZO, intitulada **Desenvolvimento de Sonda Fluorescente para a Determinação Específica da Atividade Halogenante das Enzimas Mieloperoxidase e Peroxidase de Eosinófilos**. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada à presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.



Prof. Dr. VALDECIR FARIAS XIMENES



Prof. Dr. RODRIGO CARDOSO DE OLIVEIRA



Prof. Dr. LUIZ CARLOS DA SILVA FILHO

Dedico esse trabalho aos meus pais, Marilene e Luis por sempre estarem ao meu lado me apoiando, pela educação, formação e amor oferecidos.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus pela vida e pela minha saúde permitindo que eu realizasse esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes, pela orientação, pelo suporte e pela confiança depositados em mim, pela amizade e pelo apoio pessoal e profissional prestado durante todo o decorrer do meu mestrado.

À Maria Luiza Zeraik pela amizade, pelas discussões e pelo auxílio as medidas de espectrometria de massas.

Aos meus pais por me apoiarem e darem todo o suporte necessário para que eu conseguisse realizar esse trabalho.

À Daniella por estar sempre ao meu lado, me apoiando e por ter contribuído em grande parte para a realização do meu mestrado.

Ao meu namorado Vinícius que permaneceu junto comigo durante toda essa caminhada, pela paciência, apoio, compreensão, carinho e amor à mim oferecidos.

Aos meus amigos de pós-graduação e de laboratório, Mayara, Débora, Diego, Fabíola e Bruna pela amizade e convivência durante a realização deste trabalho.

A todos os meus familiares e amigos, que de alguma maneira me apoiaram e incentivaram durante este tempo.

À Capes e a Fapesp (processo nº 2015/08267 – 1) pelo auxílio financeiro.

E a todos que colaboraram na realização deste trabalho,

MUITO OBRIGADA!

DE CARVALHO BERTOZO, L. **Desenvolvimento de Sonda Fluorescente para a Determinação Específica da Atividade Halogenante das Enzimas Mieloperoxidase e Peroxidase de Eosinófilos**. 2017. 128 f. Dissertação (Mestre em Ciências dos Materiais) - UNESP – Faculdade de Ciências, Bauru, 2017.

Resumo

A enzima mieloperoxidase (MPO), proveniente dos neutrófilos e monócitos, é capaz de catalisar a oxidação de íons Cl^- e Br^- a partir da redução do peróxido de hidrogênio. Os oxidantes formados, ácido hipocloroso (HOCl) e ácido hipobromoso (HOBr) são intensamente reativos e atuam como agentes bactericidas, podendo estar envolvidos em processos deletérios que caracterizam doenças de cunho inflamatório. A determinação da atividade halogenante específica da MPO não é trivial, pois devido ao alto potencial redox da forma ativa composto I (1,16 V), além de Cl^- e Br^- , ela é capaz de catalisar a oxidação de vários compostos orgânicos pelo mecanismo peroxidásico. Assim, são poucas as metodologias utilizadas até o momento que medem exclusivamente a atividade halogenante. Neste trabalho desenvolvemos uma metodologia para a determinação da atividade halogenante da MPO utilizando a sonda fluorescente dansilglicina (DG), a qual se mostrou insensível a ação peroxidásica da enzima, mas susceptível ao ataque eletrofílico dos ácidos HOCl e HOBr . Os estudos de cinética rápida mostram que a velocidade de reação entre a DG e o HOCl aumenta com a adição de Br^- . Foi possível verificar a queda linear na intensidade de fluorescência da DG quando concentrações crescentes de HOCl foram adicionadas ao meio reacional juntamente com uma concentração fixa de Br^- . Os mesmos resultados foram obtidos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e, quando acoplado ao espectrômetro de massas, foi possível identificar o produto da reação, o composto bromossustituído da DG. Os estudos utilizando a enzima MPO comprovaram a especificidade da metodologia, visto que a queda de fluorescência na ausência de Cl^- e Br^- foi mínima. A peroxidase de eosinófilos também é capaz de catalisar a oxidação de haletos, produzindo principalmente o HOBr . Desta maneira, ao aplicar a metodologia da DG na determinação da atividade halogenante da EPO, a produção de HOCl/HOBr também pode ser analisada. Posteriormente, ao utilizar a metodologia da DG, em estudos com inibidores, foi possível distinguir o mecanismo de um inibidor reversível do mecanismo de um inibidor irreversível, em estudos realizados para a MPO e para a EPO. Concluímos que o método baseado na queda de fluorescência da DG possui grande potencial como técnica para detecção direta e específica da atividade halogenante das enzimas MPO e EPO.

Palavras-chave: Ácido hipocloroso, ácido hipobromoso, mieloperoxidase, fluorescência, dansilglicina.

Abstract

The enzyme myeloperoxidase (MPO) is able to catalyze the oxidation of chloride (Cl^-) and bromide (Br^-) ions from the reduction of hydrogen peroxide. The formed oxidizing agents, hypochlorous acid (HOCl) and hypobromous acid (HOBr) are highly reactive and involved in deleterious inflammatory processes that characterizes many diseases. The determination of the specific halogenating activity of MPO is not trivial, because due to high redox potential of the active form of compound I (MPO-I, 1.16 V), MPO is also capable to catalyze the oxidation of various organic compounds by the peroxidase mechanism. Thus, there are few methods used to date to measure only the halogenating activity. In this work, we developed a methodology for determining the halogenating activity of MPO using the fluorescent probe dansylglycine (DG), which proved insensitive to peroxidase action, but susceptible to electrophilic attack of HOCl and HOBr . The fast kinetics studies show that the reaction rate between DG and HOCl increases with the addition of Br^- . It was possible to verify a linear decrease in fluorescence intensity of DG when increasing concentrations of HOCl were added to the reaction medium together with a fixed concentration of Br^- . The same results were obtained using high performance liquid chromatography (HPLC) and, when coupled to mass spectrometry, it was possible to identify the product of the reaction, the compound bromo-dansylglycine. The abstraction of Cl^- and Br^- from the buffer blocked totally the fluorescence decay of dansylglycine. Eosinophil peroxidase is also capable of catalyzing the oxidation of halides, mainly producing HOBr . Thus, when applying the DG methodology in the determination of the halogenating activity of EPO, the production of HOCl / HOBr was also verified. By applying the DG methodology in studies with MPO and EPO inhibitors, it was possible to distinguish the mechanism of a reversible inhibitor from an irreversible one. In conclusion, this method based on the DG fluorescence bleaching has a great potential as a direct and selective analytical technique and for detection of MPO and EPO halogenating activity.

Key words: hypochlorous acid, hypobromous acid, myeloperoxidase, fluorescence, dansylglycine.

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema do mecanismo peroxidásico.	7
Figura 2. Estrutura da MPO humana com a resolução de 1,7 angstroms.	9
Figura 3. Adesão neutrofílica.	10
Figura 4. Ativação do neutrófilo e produção de HOCl.	10
Figura 5. Representação do mecanismo catalítico da MPO.	12
Figura 6. Esquema do mecanismo da atividade catalásica da MPO.	13
Figura 7. Esquema da ação da 5-fluortriptamina na inibição do ciclo halogenante da MPO. .	20
Figura 8. Mecanismo de inibição da ceruloplasmina no ciclo halogenante da MPO.	21
Figura 9. Representação da ação do ABAH na inibição do mecanismo halogenante da MPO	22
Figura 10. Mecanismo da metodologia que utiliza a taurina cloramina e o TMB para a detecção do HOCl.....	25
Figura 11. Esquema metodologia que utiliza APF na identificação do HOCl e HOBr.	27
Figura 12: Dansilglicina – DG.	29
Figura 13. Sistema de stopped-flow (SX20/LED Stopped-Flow System, Applied Photophysics, UK).	38
Figura 14. Detector de fluorescência e absorbância (Synergy H1 Hybrid Reader, Biotek, Winooski, VT, USA).	39
Figura 15. Cromatografia líquida de alta eficiência HPLC (Jasco acoplado aos detectores UV- Vis e fluorescência).	40
Figura 16. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (Bruker, Massachusetts, EUA).	43

Figura 17. Detector amperométrico e um biossensor específico para peróxido de hidrogênio (TBR 4100 Free Radical Analyzer, World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA). .	50
Figura 18. Reatividade do HOBr e do HOCl com a dansilglicina.	57
Figura 19. Reações entre a Dansilglicina e o HOCl na ausência e na presença de Br ⁻ utilizando o stoppe-flow.	59
Figura 20. Brometo como co-catalisador da reação entre a dansilglicina e o HOCl utilizando o <i>stopped-flow</i>	60
Figura 21. Brometo como co-catalisador nas reações entre a dansilglicina e o HOCl utilizando o fluorímetro de microplacas.	61
Figura 22. Análise do HPLC da reação entre a DG, Br ⁻ e HOCl. Insert: DG.	63
Figura 23. Análise de HPLC da reação entre a DG, o Br ⁻ e o HOCl em diferentes concentrações.....	64
Figura 24. Curva analítica do HOCl obtida por meio do HPLC.	65
Figura 25. Curva analítica de HOCl obtida pelo fluorímetro	66
Figura 26. Espectros de absorbância da DG em diferentes condições de reacionais.	67
Figura 27. Espectros de absorbância para a DG, Produto 1 e Produto 2 obtidos no HPLC. ..	68
Figura 28. Estrutura da DG e dos possíveis produtos da reação, com os valores de log P e a massa exata.	70
Figura 29. Espectro de massas da dansilglicina.	71
Figura 30. Espectro de massas do produto bromo-substituído (Produto 1).	72
Figura 31. Espectro de massas do produto cloro-substituído.	73

Figura 32. Estudo do Br^- como co-catalisador da reação entre a dansilglicina, a MPO e o H_2O_2 em PBS.	76
Figura 33. Curva analítica de H_2O_2 para a MPO.	78
Figura 34. Curva analítica de HOCl utilizando a técnica da taurina /TMB.	79
Figura 35. Curva analítica da metodologia utilizando a técnica da taurina/TMB.....	80
Figura 36. Estudo cinético para diferentes concentrações de MPO.	81
Figura 37. Velocidade de reação obtida a partir da variação da concentração de MPO.	82
Figura 38. Comparação da metodologia da taurina/TMB com a metodologia da DG considerando a curva analítica de H_2O_2	83
Figura 39. Coleta de dados no detector eletroquímico de H_2O_2	91
Figura 40. Curva analítica de H_2O_2 utilizando o detector eletroquímico de H_2O_2	91
Figura 41. Análise no detector de H_2O_2 : ausência ou presença de Br^-	92
Figura 42. Análise no detector de H_2O_2 : ausência de Br^- e ausência de Cl^- e Br^-	94
Figura 43. Análise no detector de H_2O_2 : metodologia da DG com e sem Br^- e metodologia da taurina.	96
Figura 44. Gráfico de cinética utilizando 5-fluortriptamina e a metodologia da DG para a MPO.	97
Figura 45. Velocidade de reação e porcentagem de inibição na presença de 5-fluortriptamina para a MPO.	99
Figura 46. Gráfico de cinética utilizando 4-ABAH e a metodologia da DG para a MPO. ..	100
Figura 47. Velocidade de reação e porcentagem de inibição na presença de 4-ABAH para a MPO.	101

Figura 48. Curva analítica de H_2O_2 para EPO.	104
Figura 49. Estudo cinético realizado para a EPO.	105
Figura 50: Velocidade de reação determinada a partir de diferentes concentrações de EPO.	106
Figura 51. Gráfico de cinética utilizando 5-fluortriptamina e a metodologia da dansilglicina para a EPO.	111
Figura 52. Velocidade e porcentagem de inibição de reação na presença de 5-fluortriptamina para a EPO.	112
Figura 53. Gráfico de cinética utilizando 4-ABAH e a metodologia da DG para a EPO. ...	113
Figura 54. Velocidade e porcentagem de inibição da reação na presença de 4-ABAH para a EPO.	114
Figura 55. Gráfico de cinética obtido para em pH =5 e pH=7,4 para a MPO e para a EPO na ausência de Br^-	117
Figura 56. Gráfico de cinética obtido para em pH =5 e pH=7 para a MPO e para a EPO na presença de Br^-	119

Lista de Tabelas

Tabela 1. Consumo de DG utilizando diferentes condições reacionais para MPO e H ₂ O ₂ 100 μ M.	85
Tabela 2. Consumo de DG utilizando diferentes condições reacionais para a MPO e H ₂ O ₂ 50,0 μ M.	86
Tabela 3. Consumo de DG na ausência de Cl ⁻ e Br ⁻ para a MPO e H ₂ O ₂ 100 μ M.	87
Tabela 4. Consumo de DG na ausência de Cl ⁻ e Br ⁻ para a MPO e H ₂ O ₂ 50 μ M.	88
Tabela 5. Consumo de DG na reação com HRP ou MPO e H ₂ O ₂ 100 μ M.	89
Tabela 6. Consumo de DG na reação com HRP ou MPO e H ₂ O ₂ 50,0 μ M.	89
Tabela 7. Constantes de velocidade da reação da mieloperoxidase.	102
Tabela 8. Constantes de velocidade da reação da peroxidase de eosinófilos.	103
Tabela 9. Consumo da DG utilizando diferentes condições reacionais para a EPO e H ₂ O ₂ 100 μ M.	107
Tabela 10. Consumo de DG utilizando diferentes condições reacionais para EPO e H ₂ O ₂ 50 μ M.	108
Tabela 11. Consumo de DG na ausência de Cl ⁻ e Br ⁻ para a EPO e H ₂ O ₂ 100 μ M.	109
Tabela 12. Consumo de DG na ausência de Cl ⁻ e Br ⁻ para a EPO e H ₂ O ₂ 50 μ M.	110
Tabela 13. Constante de velocidade da reação da MPO em pH=5 e pH=7.	116
Tabela 14. Constante de velocidade da reação da EPO em pH=5 e pH=7.....	116

Lista de Abreviaturas

4-ABAH – Hidrazida do ácido 4-aminobenzóico

APF – Aminofenil-fluoresceína

CB – Celestine blue B

DG – Dansilglicina

EPO – Peroxidase de eosinófilos

EROs – Espécies reativas de oxigênio

HDL – Lipoproteínas de alta densidade

HOBr – Ácido hipobromoso

HOCl – Ácido hipocloroso

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

HRP – Peroxidase de raiz forte (horseradish peroxidase)

LDL – Lipoproteínas de baixa densidade

MMP – Metaloproteinases

MPO – Mieloperoxidase

PBS – Solução fisiologia salina tamponada com fosfato (Phosphate Buffered Saline)

TMB – 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina

Sumário

1– INTRODUÇÃO	1
2.1 – A Enzima Peroxidase	5
2.2 – Mieloperoxidase.....	8
2.3 – Peroxidase de eosinófilos.....	14
2.4 – O uso da mieloperoxidase para diagnósticos de doenças	16
2.5 – O desenvolvimento de inibidores para a mieloperoxidase	19
2.6 – Métodos para a determinação da atividade da mieloperoxidase.....	23
2.7 – A aplicação da dansilglicina como reagente fluorescente susceptível a ataque eletrofílico do HOCl e HOBr	28
3 – OBJETIVO	30
4 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 – Reagentes e Soluções.....	31
4.2 – Equipamentos.....	31
4.3 – Preparo de soluções	32
4.3.1 – Solução fisiologia salina tamponada com fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline, PBS</i>).....	32
4.3.2 – <i>Dansilglicina</i>	33
4.3.3 – <i>Ácido hipocloroso</i>	33
4.3.4 – <i>Brometo de sódio</i>	33
4.3.5 – <i>Acetato de amônia</i>	33
4.3.6 – <i>Solução tampão fosfato de sódio 10,0 mM, pH=7,5</i>	34

4.3.7 – Iodeto de Potássio	34
4.3.8 – Ácido acético	34
4.3.9 – Tetrametilbenzidina - TMB	34
4.3.10 – Solução tampão PBS-aurina	35
4.3.11 – Catalase.....	35
4.3.12 – Peróxido de hidrogênio	35
4.3.13 – Mieloperoxidase	35
4.3.14 – Peroxidase de Raiz Forte, HRP	36
4.3.15 – 5-fluortriptamina	36
4.3.16 – Hidrazida do ácido 4-aminobenzoico (4-ABAH)	37
4.3.17 – Solução tampão fosfato de sódio 100 mM, pH=5 com adição de NaCl 100 mM	37
4.4 – Procedimentos.....	37
4.4.1 – Estudo da adição de brometo na reação entre a dansilglicina e o HOCl utilizando o stopped-flow.	37
4.4.2 – Estudo da adição de brometo na reação entre a dansilglicina e o HOCl utilizando o fluorímetro de microplacas.	38
4.4.3 – Determinação da curva analítica do HOCl utilizando o HPLC.	40
4.4.4 – Determinação da curva analítica do HOCl utilizando o fluorímetro de microplacas.	41
4.4.5 – Estudo do espectro de absorvância da dansilglicina.....	42
4.4.6 – Identificação dos produtos da reação	42

4.4.7 – Estudo da adição de íons Br^- na reação	44
4.4.8 – Determinação da curva analítica de H_2O_2	44
4.4.9 – Determinação da curva analítica do HOCl utilizando a metodologia com TMB e taurina.	45
4.4.10 – Determinação da curva analítica do H_2O_2 utilizando a metodológica com TMB e taurina	45
4.4.11 – Estudo da cinética enzimática utilizando a MPO	46
4.4.12 – Estudo da ausência de MPO ou Br^- ou H_2O_2 na reação.....	47
4.4.13 – Estudo da ausência de Cl^- e/ou Br^- na reação	48
4.4.14 – Estudo da reação utilizando a peroxidase de raiz forte (HRP)	48
4.4.15 – Utilização do ensaio amperométrico para o monitoramento da reação	49
4.4.16 – Estudos com inibidores para MPO	51
4.4.17 – Determinação da curva analítica de H_2O_2 para a EPO	51
4.4.18 – Estudo da cinética enzimática utilizando a EPO	52
4.4.19 – Estudo da ausência de EPO ou Br^- ou H_2O_2 na reação.....	53
4.4.20 – Estudo da ausência de Cl^- e/ou Br^- na reação utilizando a EPO	53
4.4.21 – Estudos com inibidores para EPO	54
4.4.22 – Estudo do efeito do pH no meio reacional	55
4.4.23 – Cálculo do limite de detecção (LOD)	56
4.4.24 – Tratamento dos dados	56
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 – Brometo como co-catalisador na reação entre a dansilglicina e o HOCl	57

5.2 – Estudos Cromatográficos	62
5.3 – Estudo da reação por fluorimetria	65
5.4 – Identificação dos produtos da reação utilizando Cromatografia líquida de alta eficiência/Espectroscopia de massa (HPLC-MS)	67
5.5 – Estudo da influência do Br ⁻ na velocidade de reação com MPO	74
5.6 – Estudo da variação de concentração de H ₂ O ₂ na reação entre DG, MPO, e Br ⁻	77
5.7 – Aplicação da metodologia utilizando a taurina e o TMB na determinação da atividade halogenante da MPO	78
5.8 – Estudo cinético utilizando MPO	80
5.9 – Comparação da metodologia taurina/TMB com a metodologia da Dansilglicina	82
5.10 – Estudo da especificidade da metodologia	85
5.11 – Monitoramento do consumo de H ₂ O ₂	90
5.12 – Estudo com os inibidores para MPO – 5-fluortriptamina e hidrazida do ácido 4-aminobenzóico	96
5.13 – Estudo da variação de concentração de H ₂ O ₂ na reação entre DG, EPO, e Br ⁻	102
5.14 – Estudo cinético utilizando a EPO	104
5.15 – Estudo da especificidade da metodologia com EPO	107
5.16 – Estudo com os inibidores para EPO – 5-fluortriptamina e hidrazida do ácido 4-aminobenzóico	110
5.17 – Estudo da variação do pH na reação de formação de HOCl e/ou HOBr para a MPO e EPO	115
6 – CONCLUSÃO	120

Referências Bibliográficas.....	121
---------------------------------	-----

1– INTRODUÇÃO

A enzima mieloperoxidase, MPO, é encontrada principalmente nos neutrófilos humanos em concentrações relativamente altas (JANTSCHKO et al., 2005). Devido ao seu alto potencial redox, ela é a única enzima capaz catalisar, com eficiência, a oxidação dos íons Cl^- à ácido hipocloroso (HOCl), por meio de seu mecanismo halogenante (BOZEMAN; LEARN; THOMAS, 1990). Neste contexto, a peroxidase de eosinófilos, EPO, também é capaz de catalisar a oxidação de haletos via mecanismo halogenante, produzindo principalmente o ácido hipobromoso (HOBr).

O HOCl , possui efeito antimicrobiano, e é um oxidante altamente reativo, citotóxico e que reage com grande parte das moléculas biológicas. Desta forma, destaca-se a importância da atividade halogenante da MPO, visto que o HOCl produzido está envolvido em inúmeros processos degenerativos e sinalização celular, levando, por exemplo, à apoptose de diferentes células (CRUZ, 2010).

A relação entre MPO e a EPO com doenças de cunho inflamatório tornou-se relevante quando danos causados nos tecidos foram associados a presença de HOCl e HOBr . O HOCl e o HOBr são produzidos a partir de reações catalisadas pela MPO e/ou EPO, assim, a determinação de sua atividade halogenante em um organismo tornou-se a chave para possíveis diagnósticos dessas doenças (LORIA et al., 2008, SCHINDHELM et al., 2009 e Van Der VEEN et al, 2009). Pesquisas recentes têm utilizado marcadores biológicos para a detecção desses produtos. Por exemplo, utiliza-se a tirosina que ao formar a 3-clorotirosina comprova a presença do HOCl , que somente pode ser produzido na presença da MPO (MARTINS, 2010).

A aterosclerose é uma das doenças mais estudadas considerando os efeitos causados pela atividade halogenante da MPO. O HOCl é capaz de oxidar as lipoproteínas de baixa

densidade (LDL), gerando partículas aterogênicas que podem resultar na redução disfuncional das lipoproteínas de alta densidade (HDL), impedindo, por exemplo, que elas protejam as paredes das artérias e alterando o transporte reverso do colesterol, que acaba se acumulando nas células (LORIA et al., 2008, BORATO et al., 2016; SONG et al., 2015). Essas hipóteses foram comprovadas, pois em LDL e HDL isolados a partir de lesões de aterosclerose em humanos foi detectada a 3-clorotirosina (MARTINS, 2010). Desta maneira, diversas doenças associadas a aterosclerose, como por exemplo, obesidade e diabetes foram estudadas considerando o envolvimento da MPO (ANDRADE et al., 2012; BORATO et al., 2016 e SONG et al., 2015).

Se a produção dos oxidantes em excesso catalisada pela MPO e/ou EPO pode ser uma das causas do desenvolvimento de algumas doenças, a inibição da atividade halogenante das enzimas pode ser utilizada como um possível tratamento terapêutico. Essa hipótese contribuiu para o desenvolvimento de inibidores para a atividade halogenante da MPO. Os inibidores podem agir de diferentes maneiras, como por exemplo, por meio de oxidações de substratos envolvendo 1 elétron, produzindo e acumulando o composto II ou inativando a enzima utilizando substratos suicidas (CHAVALI et al., 2015). O composto hidrazida do ácido 4-aminobenzóico (4-ABAH) é um inibidor irreversível para a MPO, uma vez que ele modifica o grupo heme da enzima causando a sua inativação. O 4-ABAH foi utilizado em um estudo realizado por Tiyerili et al. (2016) em ratos portadores de aterosclerose, provocando um efeito vasculoprotetor no animal. A principal finalidade dos estudos que buscam o desenvolvimento de novos inibidores para a atividade halogenante da MPO é utilizá-los como possíveis agentes farmacológicos em doenças que são associadas à enzima.

Dado a importância da MPO e da EPO no contexto dos processos inflamatórios e o desenvolvimento de inibidores das mesmas no contexto terapêutico, torna-se relevante a aplicação de metodologias capazes de determinar a atividade halogenante destas enzimas. No

entanto, a determinação da atividade halogenante dessas enzimas não é trivial, pois devido ao alto potencial redox e baixa seletividade, não apenas os íons cloreto e brometo são oxidados, mas também diversos compostos orgânicos. Assim, metodologias indiretas têm sido desenvolvidas para determinação específica da atividade halogenante das mesmas. Dentre estas, a mais utilizada, para a MPO, é a baseada nas mudanças de absorbância do 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Nesta metodologia utiliza-se a taurina que ao reagir com o HOCl leva à formação de um produto estável, taurina cloramina que se acumula no meio reacional. Então, após a finalização da reação enzimática, adiciona-se o TMB que é oxidado à um composto de cor azul. A intensidade da cor será proporcional a concentração de HOCl. Esse método apesar de seletivo, é um método indireto de determinação da atividade halogenante da MPO (DYPBUKT et al., 2005 e KETTLE et al., 2014). Recentemente foi desenvolvida uma nova metodologia baseada em medidas de fluorescência. Trata-se do uso da molécula aminofenil-fluoresceína (APF) que não é fluorescente, porém, é convertida por HOCl ou HOBr em uma molécula fluorescente, a fluoresceína. Os testes na determinação da atividade halogenante utilizando essa metodologia também foram realizados em neutrófilos e a sonda conseguiu detectar de maneira seletiva a presença dos oxidantes (SETSUKINAI et al., 2002 e FLEMMIG et al., 2015).

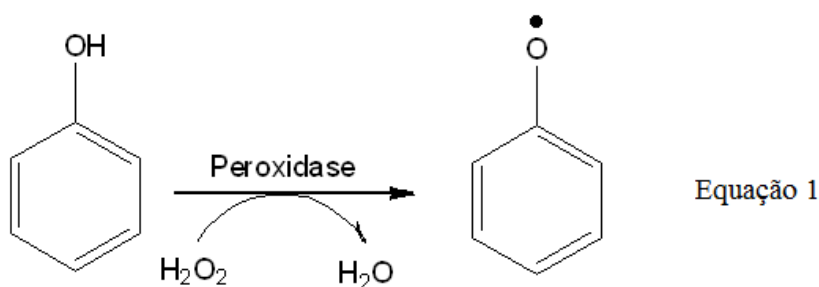
Dado a relevância do tema, neste trabalho, buscamos desenvolver uma nova metodologia para determinar a atividade enzimática da MPO e da EPO e que seja sensível e específica para atividade halogenante das mesmas. Trata-se do uso da molécula conhecida como dansilglicina (DG) que é uma sonda fluorescente utilizada na detecção de sítios de ligação na albumina. Em estudos anteriores realizados por Ximenes, Morgon e Souza (2015) foi comprovado que a DG é susceptível ao ataque eletrofílico do HOCl e/ou HOBr. Desta maneira, diferentemente da metodologia que utiliza a APF, desenvolvemos um método de determinação da atividade halogenante da MPO e da EPO baseado em uma reação eletrofílica

entre a sonda fluorescente e HOCl e/ou HOBr. Posteriormente, aplicamos a metodologia desenvolvida utilizando a DG em estudos com inibidores para a MPO e a EPO.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – A Enzima Peroxidase

As peroxidases são enzimas pertencentes à classe das oxirredutases e se caracterizam por utilizar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como co-substrato em reações de oxidação. Elas são heme proteínas, possuindo o grupo protoporfirina IX (heme) como grupo prostético. A enzima nativa possui peso molecular na faixa de 35000 a 100000 g.mol^{-1} . Os substratos mais comuns para as peroxidases se caracterizam por possuírem em sua estrutura grupos fenólicos e/ou anilínicos (BANCI, 1997; O'BRIEN, 2000 e VASCONCELLOS NETO, 2010). A Equação 1 exemplifica uma reação, neste caso envolvendo um fenol, catalisada por uma peroxidase.



Baseado na similaridade das estruturas, as peroxidases estão divididas em dois grupos: o primeiro que inclui as peroxidases que possuem origem em fungos, plantas e bactérias e o segundo que engloba as provenientes dos animais. As peroxidases do primeiro grupo são formadas por uma sequência de aproximadamente 300 aminoácidos ligados não covalentemente, e podem ser subdivididas em três classes, baseada em uma sequência

homóloga de aminoácidos: a Classe I formada pelas peroxidases procariotas, a Classe II que constitui as peroxidases de fungos e a Classe III que engloba as peroxidases de plantas, como por exemplo, a *horseradish peroxidase* ou peroxidase de raiz forte, HRP (BATTISTUZZI et al., 2010a e O'BRIEN, 2000). As peroxidases de origem animal possuem estruturas muito maiores, formadas por uma sequência de cerca de 576–738 aminoácidos ligados covalentemente, como por exemplo, a mieloperoxidase (MPO) e a peroxidase de eosinófilos (EPO). Elas provavelmente tiveram origem em um ancestral diferente das peroxidases do primeiro grupo e normalmente desempenham funções na defesa contra agentes patogênicos (O'BRIEN, 2000).

As peroxidases catalisam as diversas reações por meio de um ciclo catalítico comum. Este ciclo tem início pela reação entre a enzima e uma molécula de H_2O_2 por meio de um processo envolvendo dois elétrons, no qual o H_2O_2 é reduzido a água e a enzima é oxidada à forma intermediária conhecida como composto I. O composto I encontra-se a dois níveis de oxidação acima se comparado a forma nativa da enzima e contém em sua estrutura um centro oxiferril e um radical cátion orgânico localizado no grupo heme. O composto I ao oxidar um substrato, por meio de uma etapa envolvendo um elétron, é reduzido à forma intermediária denominada de composto II, em que o centro oxiferril é mantido. O composto II será reduzido à forma nativa da enzima a partir da oxidação de mais um substrato em uma etapa envolvendo um elétron (BATTISTUZZI et al., 2010a). Este ciclo é nomeado como mecanismo peroxidásico e está ilustrado na Figura 1.

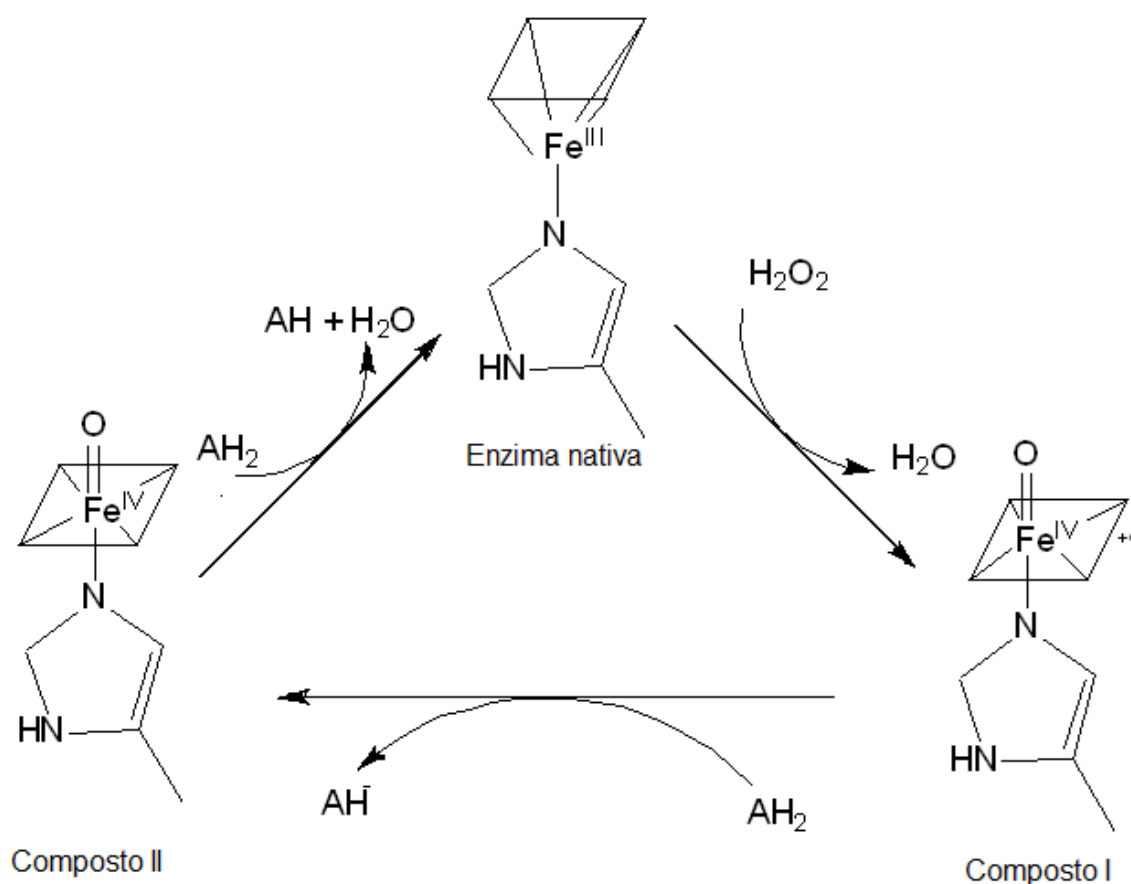


Figura 1. Esquema do mecanismo peroxidásico.

A enzima nativa está representada simplificada destacando o centro oxiferril ligado à uma histidina. O substrato está representado na forma AH_2 . A enzima nativa forma o composto I a partir da redução do H_2O_2 . O composto I, ao oxidar um substrato, forma o composto II, que irá retornar a forma nativa da enzima a partir da oxidação de um substrato. Adaptado de Battistuzzi *et al.* (2010a).

Os valores dos potenciais de redução das reações do ciclo catalítico que envolvem a oxidação do substrato variam para cada enzima. Por isso, as peroxidases podem apresentar especificidade para determinados substratos, em que a eficiência da transferência de elétrons será melhor realizada, ou seja, a atividade catalítica da enzima será favorecida (BATTISTUZZI *et al.*, 2010a).

Além disso, a estrutura da enzima é outro fator relevante que pode definir a especificidade de uma peroxidase pelo substrato. A estrutura pode determinar os sítios de

ligação dos substratos e as interações envolvidas. A especificidade pode ser modulada por alterações que não provoquem mudanças significativas na estrutura secundária da enzima, como por exemplo, substituição de alguns aminoácidos (POULOS; KRAUT, 1980).

As peroxidases estão envolvidas em diversas reações que desempenhar diferentes funções. Na família das peroxidases de animais iremos destacar a mieloperoxidase e a peroxidase de eosinófilos que desempenham papéis de defesa no organismo (VAN DER VEEN *et al*, 2009).

2.2 – Mieloperoxidase

Agner (1941) descobriu em um enfisema de tuberculose uma nova enzima, diferente das que ele conhecia na época. Ele inicialmente denominou esta enzima de verdoperoxidase, devido a sua estrutura e propriedades. Anos depois, Theorell e Ákeson (1943) denominaram a enzima de mieloperoxidase.

A mieloperoxidase, MPO, é constituída de duas subunidades idênticas ligadas por uma ponte de dissulfeto (ARNHOLD; FLEMMIG, 2010). Sua estrutura é caracterizada por três ligações covalentes – duas ligações éster (Asp260 e Glu408) e uma tioéter (Met409), entre a porção de proteína e o grupo heme, as quais permitem a estabilidade da estrutura (Figura 2) (VAN ANTWERPEN; BOUDJELTIA, 2015). Ela é uma proteína catiônica, devido a presença de resíduos de arginina (ARNHOLD; FLEMMIG, 2010).

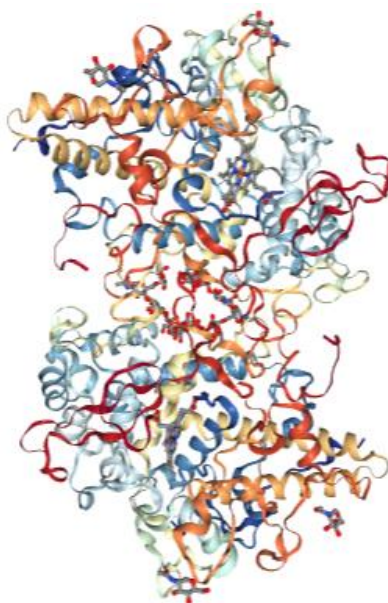


Figura 2. Estrutura da MPO humana com a resolução de 1,7 angstroms.

Obtida por meio do RCSB Protein Data Bank (PDB) – PDB ID: 5FIW de ROSE *et al.*, 2016 e ROSE; HILDEBRAND, 2015. <http://www.rcsb.org/pdb/ngl/ngl.do?pdbid=5FIW>.

Pertencente ao grupo das peroxidases de animais, a MPO é encontrada no compartimento secretor dos neutrófilos humanos e monócitos em concentrações relativamente altas, cerca de 5 % do peso seco da célula (JANTSCHKO *et al.*, 2005).

Os neutrófilos são as células de defesa do organismo humano e estão relacionados aos processos inflamatórios. Neste contexto, a MPO está relacionada a produção de HOCl, pelo neutrófilo, em um processo inflamatório. A partir de um estímulo inflamatório, os neutrófilos presentes na corrente sanguínea, por meio de processos de captura, rolagem e adesão, são transmigrados até o local da inflamação (Figura 3). Uma vez que eles sejam ativados, ocorrerá o chamado *burst* oxidativo, em que o ânion superóxido (O_2^-) será produzido por meio da NADPH-oxidase. O O_2^- produzido anteriormente é uma das fontes de produção do H_2O_2 por meio da superóxido dismutase (SOD). A MPO, ao ser liberada, utilizará o H_2O_2 na produção do HOCl, seu principal produto (Figura 4) (NUSSBAUM *et al.* 2013 e KLEBANOFF, 2005).

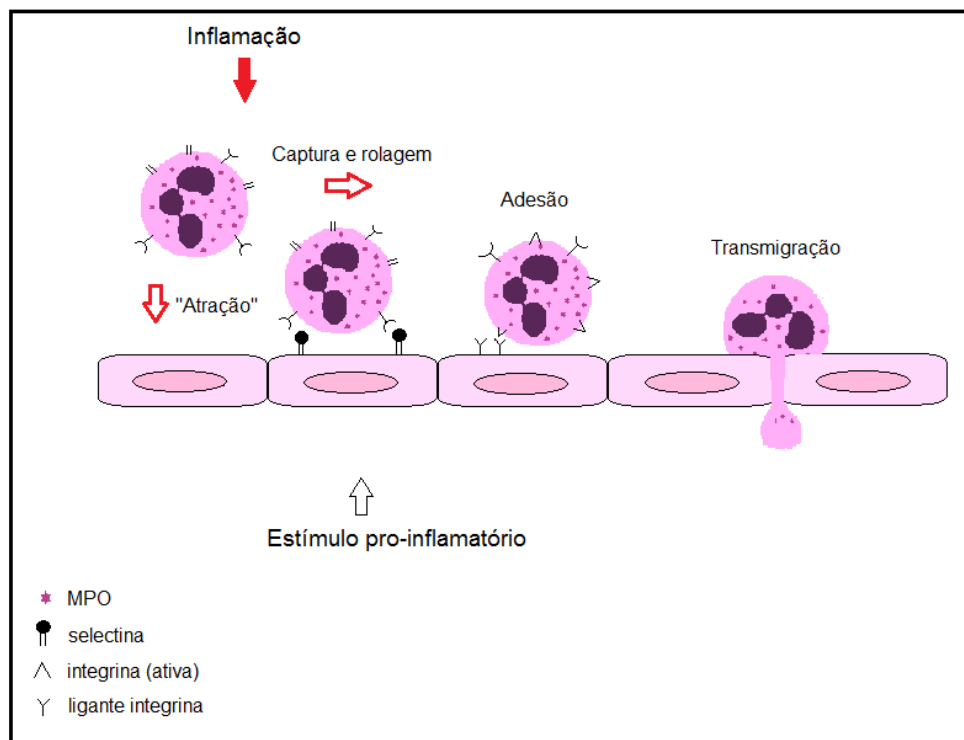


Figura 3. Adesão neutrofílica.

Demonstração do processo de transmigração de um neutrófilo presente na corrente sanguínea ao local da inflamação, a partir de um estímulo pro-inflamatório. Adaptado de Nussbaum et al. (2013).

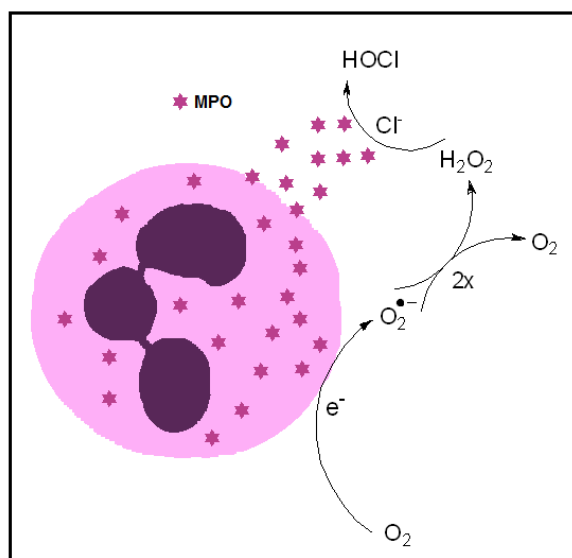


Figura 4. Ativação do neutrófilo e produção de HOCl.

Demonstração do processo de ativação de um neutrófilo, evidenciando a produção do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e do ácido hipocloroso ($HOCl$). Adaptado de Silva e Freitas [2016].

A atividade antimicrobiana da MPO já era bem conhecida (KLEBANOFF, 1968) quando Agner, K. (1972) estudou a capacidade oxidante da enzima na presença de Cl^- e propôs que a formação de HOCl livre estava ocorrendo, ou seja, ele foi o primeiro a afirmar que a MPO era capaz de catalisar a oxidação do Cl^- . Posteriormente, Stelmazynska e Zgliczynski (1974) realizaram estudos adicionais, mostrando a formação do HOCl catalisada pela MPO, associando-a à deaminação e a decarboxilação de aminoácidos.

A MPO catalisa reações de oxidação dos íons cloreto (Cl^-), como demonstrado anteriormente (Figura 4), a partir da redução do H_2O_2 , formando o ácido hipocloroso (HOCl), um oxidante altamente reativo, citotóxico e que reage com grande parte das moléculas biológicas. Além disso, ela também catalisa as reações de oxidação dos íons brometo (Br^-), tiocianato (SCN^-) e iodeto (I^-) (BOZEMAN; LEARN; THOMAS, 1990).

Comparada às outras peroxidases, a MPO apresenta uma propriedade fundamental e que a distingue das demais. Trata-se de sua exclusividade como a única capaz de oxidar o Cl^- ao HOCl com alta eficiência. Esta exclusividade está relacionada ao potencial de redução (E^0) do par redox composto-I/MPO nativa, o maior entre as peroxidases conhecidas. Nesta reação, diferente do mecanismo peroxidásico apresentado anteriormente (Figura 1), a forma intermediária composto-I oxida o cloreto em dois elétrons e se reduz diretamente à forma nativa da enzima, esta via exclusiva é conhecida como atividade halogenante. As reações destacadas em vermelho na Figura 5 ilustra o mecanismo halogenante da MPO, exemplificado a partir da oxidação de íons Cl^- (MALLE et al., 2007, JANTSCHKO et al., 2005).

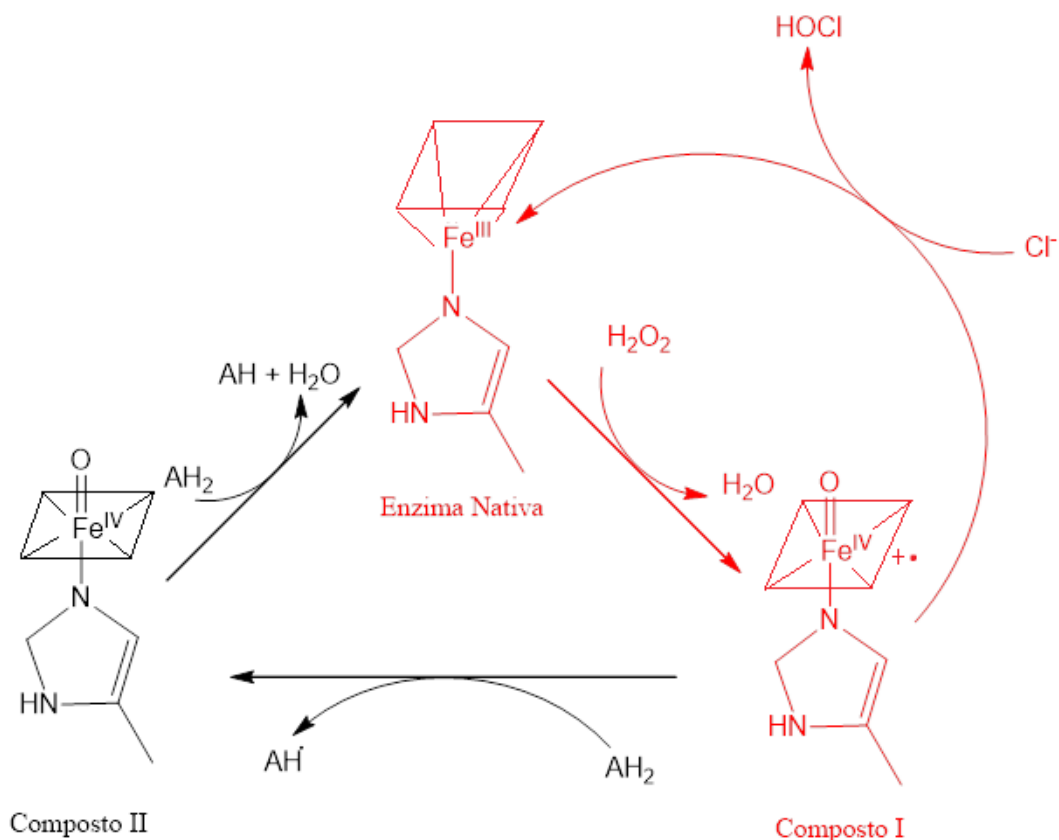


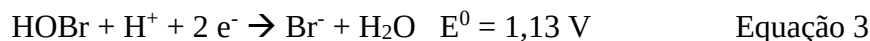
Figura 5. Representação do mecanismo catalítico da MPO.

A enzima nativa está representada simplificada destacando o centro oxiferril ligado à uma histidina. O substrato está representado na forma AH₂. As reações em vermelho representam o mecanismo halogenante da enzima, enquanto que as reações em preto ilustram o mecanismo peroxidásico. Adaptado de Battistuzzi et al, 2010a.

Neste contexto, a EPO, apesar de ser capaz de oxidar Br⁻, não é capaz de oxidar Cl⁻ com a mesma eficiência que MPO. Isto pode ser explicado levando em consideração o E⁰ dos pares redox composto I/enzima nativa. Enquanto o valor de E⁰ para a EPO é de 1,10 V, a MPO apresenta o potencial redox igual a 1,16 V (ARNHOLD; FLEMMIG, 2010). Cabe ressaltar que a oxidação de Br⁻ à HOBr é termodinamicamente mais susceptível do que Cl⁻ à HOCl devido ao potencial redox dos mesmos (Equações 2 e 3) (AUGUSTO; MIYAMOTO, 2011 e KETTLE et al., 2014).



Equação 2



Em conclusão, a MPO, além de sua atividade como peroxidase clássica, catalisando a oxidação de inúmeros substratos orgânicos via mecanismo peroxidásico (passos de 1 elétron), é também capaz de oxidar o cloreto em dois elétrons diretamente, via atividade halogenante. A atividade halogenante da MPO depende das concentrações de Cl^- e H_2O_2 , sendo que em excesso o H_2O_2 pode prejudicar a atividade da enzima (MALLE et al., 2007, JANTSCHKO et al., 2005).

Além das atividades halogenante e peroxidásica, a MPO também possui a atividade catalásica, em que ela é capaz de degradar o H_2O_2 . Kettle e Winterbourn (2001) demonstraram que o H_2O_2 reage com a MPO e com composto-I em reações que liberam água e oxigênio. Isso acontece quando o meio está isento de substrato para a MPO e quando o H_2O_2 está em excesso (KETTLE; WINTERBOURN, 2001). A Figura 6 representa o esquema do mecanismo catalásico da MPO.

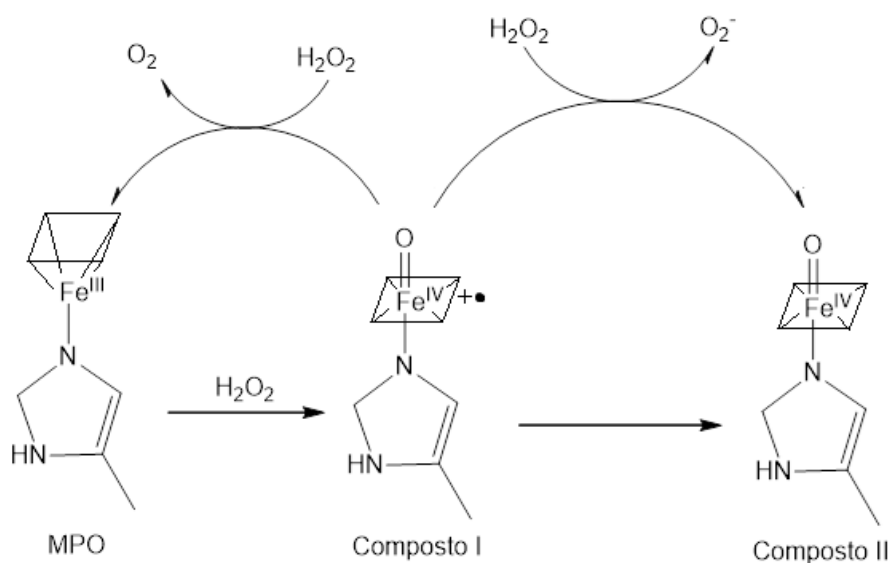


Figura 6. Esquema do mecanismo da atividade catalásica da MPO.

A enzima nativa está representada simplificada destacando o centro oxiferril ligado à uma histidina. Adaptado de Klebanoff (2005) e Kettle e Winterbourn (2001).

A MPO é capaz de oxidar haletos por meio do seu mecanismo halogenante, ela também pode oxidar outros substratos por meio do seu mecanismo peroxidásico e na ausência de substrato, ela é capaz de degradar o H_2O_2 presente no meio em excesso. Além disso, a MPO pode ser inativada se o H_2O_2 estiver presente em excesso no meio, mesmo na presença de alguns substratos. Paumann-page et al. (2013) mostraram que a presença de H_2O_2 em alta concentração causa a inativação da MPO, com uma constante de velocidade de inativação de $3,9 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, em que os grupos heme são destruídos, liberando o ferro e separando as pequenas subunidades polipeptídicas do grupo prostético heme. O HOCl gerado a partir da oxidação do Cl^- pela MPO também pode contribuir para inativar a enzima dentro dos fagossomos. Depois que todos os substratos para o HOCl são “saciados”, ele inativa a MPO e o sistema NADPH-oxidase (PAUMANN-PAGE et al., 2013 e WEISS et al., 1982).

Apesar de todas as funções que a MPO pode desempenhar, a atividade halogenante é sem dúvida a mais importante, visto que somente ela pode produzir o HOCl, que além de ser um potente agente antimicrobiano, está envolvido em inúmeros processos degenerativos e sinalização celular, levando, por exemplo, à apoptose de diferentes células (CRUZ, 2010).

2.3 – Peroxidase de eosinófilos

A peroxidase de eosinófilos, EPO, pertence ao grupo das peroxidases de animais e é encontrada nos eosinófilos em uma concentração quatro vezes maior do que a MPO nos neutrófilos (WEVER; PLAT; HAMERS, 1981 e GIOIA *et al.*, 1996). A EPO é um monômero e possui um peso molecular de 77.000 Da e é formada por duas subunidades de proteínas que contém um grupo prostético Fe-protoporfirina-IX modificado (SIBBETT; KLEBANOFF;

HURST, 1985 e WANG; SLUNGAARD, 2006). Como a MPO e a EPO são hemoproteínas derivadas de um gene ancestral comum elas apresentam um grau de similaridade na estrutura de 50 a 70 % (ZENG; FENNA, 1992 e GIOIA et al., 1996). Porém, a EPO se difere significativamente da MPO em suas propriedades físicas e químicas, pois enquanto a EPO é um monômero, a MPO é um dímero ligado por meio de uma ponte de dissulfeto (FURTMÜLLER *et al.*, 2000a).

De maneira semelhante à MPO, a EPO é capaz de catalisar, utilizando o H_2O_2 , a reação de oxidação de diferentes substratos orgânicos, por meio de seu mecanismo peroxidásico e, também, catalisa a oxidação de haletos e de pseudo-haletos por meio de seu mecanismo halogenante (VAN DALEN; KETTLE, 2001 e BATTISTUZZI et al., 2010b). O mecanismo halogenante de EPO é semelhante ao apresentado para a MPO na Figura 5.

A EPO é capaz de oxidar íons Cl^- porém de maneira menos eficiente do que a MPO, devido ao potencial redox do par composto I/EPO nativa (1,10 V) (JANTSCHKO et al., 2005). Pesquisas sugerem que a EPO catalisa a oxidação de Cl^- somente em pH ácido (FURTMÜLLER et al., 2000a). Deste modo, apesar de no plasma sanguíneo a concentração de cloreto (100 mM) ser superior às concentrações de brometo (20-100 μM) e tiocianato (20-120 μM), as evidências indicam que a EPO utiliza preferencialmente os íons Br^- e SCN^- como substratos (VAN DALEN; KETTLE, 2001).

O sistema EPO/ H_2O_2 possui uma potente capacidade de matar bactérias, parasitas e vírus. O HOBr formado por meio do sistema EPO/ H_2O_2 / Br^- é um forte antioxidante que se assemelha com o HOCl (WANG; SLUNGAARD, 2006) e pode reagir com diversas moléculas no meio biológico, dentre elas, aminoácidos, nucleotídeos, olefinas e tirosina (SLUNGAARD; MAHONEY JR, 1991). A formação da bromotirosina é utilizada como um biomarcador da oxidação do Br^- *in vivo* pela EPO (WU *et al.*, 1999).

A detecção de bromotirosina possibilitou correlacionar a atividade halogenante da EPO com diversas doenças, na maioria, respiratórias, por exemplo, a asma. Em indivíduos asmáticos foi determinada uma concentração de cerca de 100 vezes maior de bromotirosina do que em indivíduos não-asmáticos (MACPHERSON *et al.*, 2001).

Apesar de ser menos estudada do que a MPO, as evidências envolvendo doenças do cunho respiratório e a EPO tornam importante o estudo da atividade halogenante desta enzima. Além disso, juntas, a MPO e a EPO são as únicas enzimas, presentes no sistema de defesa do organismo humano, capazes de catalisar a oxidação de haletos via mecanismo halogenante.

2.4 – O uso da mieloperoxidase para diagnósticos de doenças

Pesquisas recentes têm evidenciado que a MPO pode ser utilizada como um marcador para diagnósticos de doenças. Isso porque, a geração de HOCl e HOBr em excesso tem sido associada à danos nos tecidos, podendo causar inflamações agudas e crônicas (LORIA *et al.*, 2008, SCHINDHELM *et al.*, 2009 e Van Der VEEN *et al.*, 2009).

Estudos clínicos têm demonstrado que altos níveis de MPO no sangue podem estar relacionados às doenças coronarianas (TIYERILI *et al.*, 2016 e SONG *et al.*, 2015). A inflamação causada pelo estresse oxidativo é uma das primeiras fases da formação da aterosclerose. Assim, a MPO por estar envolvida em processos de estresse oxidativo pode ser utilizada como um marcador desses eventos cardiovasculares (SONG *et al.*, 2015).

A MPO é capaz de oxidar as lipoproteínas de baixa densidade (ox-LDL), gerando partículas aterogênicas que podem resultar na redução disfuncional das lipoproteínas de alta densidade (HDL), impedindo, por exemplo, que elas protejam as paredes das artérias e

alterando o transporte reverso do colesterol, que acaba se acumulando nas células (LORIA *et al.*, 2008, BORATO *et al.*, 2016; SONG *et al.*, 2015). A incubação do LDL juntamente com o HOCl mostrou a oxidação dos resíduos de lisina da apolipoproteína B-100, a proteína predominante do LDL (HAZELL; STOCKER, 1993). Em um estudo semelhante, a incubação do HDL com a MPO mostrou que a HDL não modificada compete com a HDL modificada pelo receptor BI da apolipoproteína A-I, a principal proteína do HDL. A ligação do HDL ao receptor BI é o passo principal para o fluxo do colesterol, deste modo, a ligação de uma espécie modificada contribui para a acumulação do colesterol nas paredes das artérias (MARSCHE, 2002).

A MPO é capaz de catalisar a oxidação de óxido nítrico (NO), contribuindo para a disfunção endotelial, pois o consumo de NO afeta a resposta vasomotora (LAU; BALDUS, 2006). As pesquisas sugerem que a MPO inicialmente se liga às células endoteliais, e posteriormente, a enzima é posicionada entre as células endoteliais e as células musculares onde é capaz de interceptar o NO, limitando a sua biodisponibilidade (BALDUS *et al.*, 2001 e NICHOLLS, 2005).

O efeito negativo da MPO e do HOCl também foi evidenciado nas metaloproteinases (MMP) que são responsáveis por degradar matrizes extracelular de proteínas, como, elastina e colágeno, além de contribuir para a instabilidade das placas ateroscleróticas (FU *et al.*, 2001). O HOCl, produzido na oxidação do Cl^- catalisada pela MPO, é capaz de ativar a MMP, aumentando o risco de formação de trombos, que está relacionada a aterosclerose (LAU; BALDUS, 2006).

Especificamente, estas propostas foram comprovadas a partir do monitoramento da 3-clorotirosina, um marcador para o HOCl, pois é a única molécula capaz de produzir tal produto. Assim, em LDL isolada a partir de lesões de aterosclerose em humanos, foi detectada a presença deste aminoácido clorinado. O mesmo ocorreu em HDL extraído dos tecidos

lesionados, em que, altos níveis de 3-clorotirosina foram detectados (MARTINS, 2010). Nestes exemplos, por meio da detecção da 3-clorotirosina foi possível associar o HOCl formado a partir do sistema $\text{MPO-H}_2\text{O}_2\text{-Cl}^-$ aos danos causados nos tecidos envolvidos.

O HOCl, o principal produto da reação com a MPO, também pode induzir reações que modificam lipídeos, DNA, proteínas e catalisar o consumo de óxido nítrico. A MPO estimula a apoptose do endotélio e inicia a disfunção endotelial, e por isso, tanto a MPO como o HOCl são encontrados em lesões provocadas pela aterosclerose (TIYERILI et al., 2016).

Dentro deste contexto, outras doenças associadas a aterosclerose estão sendo estudadas considerando o papel da MPO, como por exemplo, a obesidade. Estudos revelaram um alto nível de MPO no plasma de indivíduos obesos. Andrade et al. (2012) observou um aumento de 29 % nos níveis de MPO em mulheres obesas quando comparadas com mulheres magras. Desta maneira, o acompanhamento dos níveis de MPO pode servir como um biomarcador, indicando o risco de doenças cardiovasculares, por exemplo, em indivíduos obesos (BORATO et al., 2016 e WANG et al., 2014).

A associação da obesidade com a diabetes do tipo 2 tem como consequência um maior nível de neutrófilos no sangue periférico com elevados níveis de MPO (WANG et al., 2014). Estudos envolvendo diabéticos do tipo 2 e a MPO indicam que pacientes com diabetes apresentam um nível da enzima no sangue superior aos não-diabéticos. Concentrações altas de glicose estimulam a produção de H_2O_2 , e com isso aumenta a atividade da MPO, uma vez que ela utiliza o H_2O_2 em seu mecanismo catalítico. Desta forma, o aumento do nível de MPO no sangue pode estar relacionado aos danos das células endoteliais, reduzindo a elasticidade dos vasos sanguíneos, e afetando a pressão arterial dos pacientes (SONG et al., 2015).

A artrite reumatoide é outra doença relacionada à concentração de MPO. Os estudos de Stamp et al. (2012) detectaram a 3-clorotirosina, em pacientes com artrite reumatoide, confirmando que o HOCl foi produzido e reage com as proteínas. Vivekanandan-giri et al.

(2013) confirmou essa hipótese afirmando que a concentração de MPO no plasma de um indivíduo com artrite reumatoide é duas vezes maior do que em um indivíduo saudável.

Além das patologias mencionadas, há evidências do envolvimento da MPO em outras doenças, tais como, doenças neurodegenerativas, fibrose cística, alguns tipos de câncer, doenças renais, entre outras (PATTISON; DAVIES, 2006). Por isso, o monitoramento da atividade catalítica da MPO, poderia ser utilizado como um marcador para diagnósticos, uma vez que a alteração da concentração da enzima pode ser associada aos efeitos deletérios. Portanto, o desenvolvimento de métodos específicos para analisar a atividade halogenante da MPO pode ter importantes aplicações em ciências biomédicas.

2.5 – O desenvolvimento de inibidores para a mieloperoxidase

Considerando as inúmeras evidências da MPO e de seu produto principal HOCl em várias doenças de cunho inflamatório e cardiovascular, fica claro que inibidores dessa enzima poderiam se constituir como um potencial fármaco. Este fato contribuiu para o desenvolvimento de inibidores capazes de interromper a atividade halogenante da MPO, fazendo com que os principais produtos *in vivo*, HOCl e HOBr não sejam produzidos em excesso (TIDÉN, ANNA-KARIN et al, 2011).

Existem diversas formas que atualmente estão sendo desenvolvidas para controlar a resposta tóxica da MPO. Entre elas podemos destacar a inibição da NADPH-oxidase que está ligada a fonte de H₂O₂, inibição do ciclo catalítico da MPO utilizando inibidores reversíveis e inativação da enzima utilizando substratos suicidas (CHAVALI et al., 2015). Resumidamente, os inibidores para a MPO podem ser classificados em três categorias: os compostos que

promovem a acumulação do composto II, compostos suicidas, e os compostos que se ligam reversivelmente à enzima nativa (FORBES et al., 2013).

As substâncias que causam a acumulação do composto II reagem rapidamente com o composto I, como por exemplo os compostos indólicos e triptaminas. Esses compostos são capazes de desviar o ciclo da atividade halogenante da enzima, ocorrendo a acumulação do composto II. Em um estudo realizado por Jantschko *et al.* (2005) os compostos 5-fluortriptamina e 5-clorotriptamina foram os que apresentaram resultados mais eficazes na inibição da MPO. Porém é improvável que esses inibidores sejam eficazes no ambiente fisiológico, em que existe a abundância de ânions ascorbato e urato, por exemplo, que irão converter o composto II à enzima nativa (FORBES et al., 2013). A Figura 7 ilustra o mecanismo de ação de 5-fluortriptamina.

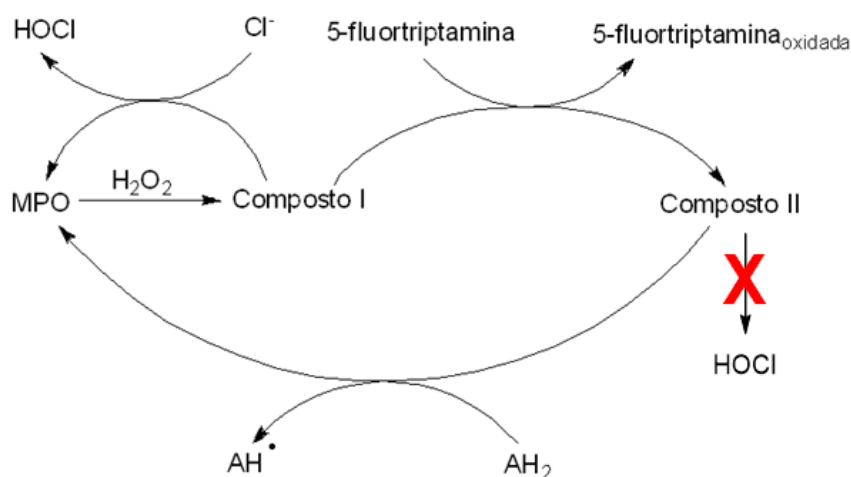


Figura 7. Esquema da ação da 5-fluortriptamina na inibição do ciclo halogenante da MPO.

Simulação do mecanismo de ação da 5-fluotriptamina, em que o substrato está representado na forma AH₂.

Outro exemplo é a ceruloplasmina, uma proteína do plasma que atua como um inibidor endógeno para a MPO. Apesar de possuir um IC_{50} inferior aos inibidores já conhecidos para a MPO, a ceruloplasmina é capaz de reagir com o composto I, formando o composto II, e, em seguida, ela retarda a conversão do composto II à enzima nativa. O mecanismo de inibição da ceruloplasmina está ilustrado na Figura 8 (FORBES et al., 2013 e CHAPMAN et al., 2013).

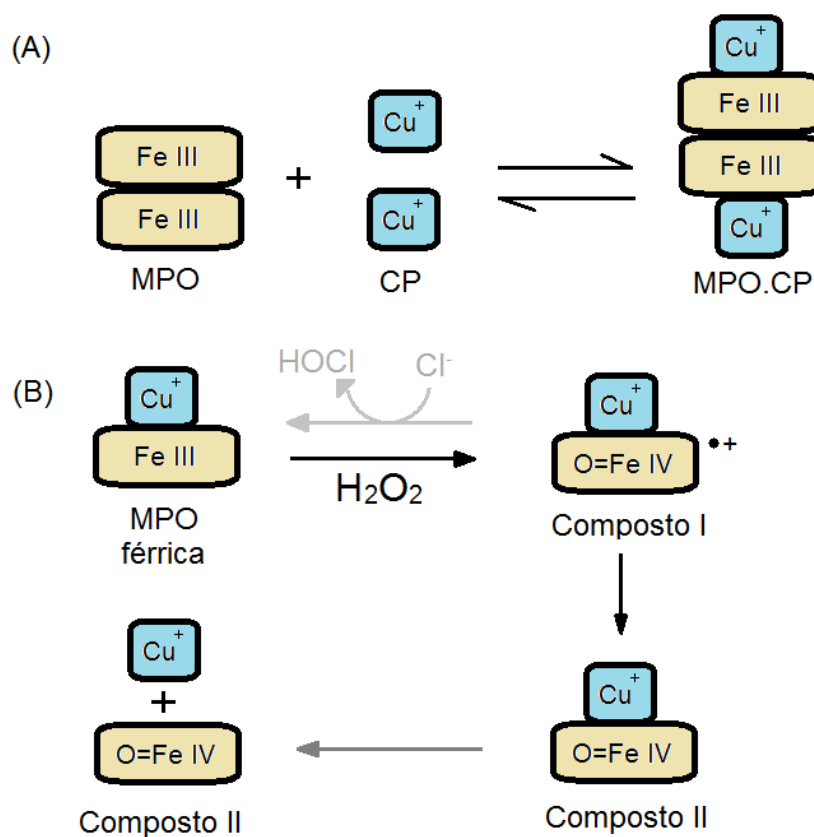


Figura 8. Mecanismo de inibição da ceruloplasmina no ciclo halogenante da MPO.

(A) A MPO é formada por dímeros idênticos e duas moléculas ceruloplasmina (CP) ligam-se reversivelmente em cada grupo heme da enzima (B) A reação entre o H₂O₂ e a MPO ligada a ceruloplasmina induz a formação do composto II. A conversão do composto II à enzima nativa será retardada, pois ocorrerá somente depois que a ceruloplasmina estiver dissociada. Adaptado de Chapman et al., 2013).

Os compostos hidrazida do ácido 4-aminobenzóico (ABAH) e 2-tioxantinas são considerados inibidores suicidas ou irreversíveis para a MPO. A ABAH é um excelente inibidor irreversível para a MPO, uma vez que ele modifica o grupo heme da enzima, provocando a sua desativação (Figura 9) (KETTLE; GEDYE; WINTERBOURN, 1997). As 2-thioxantinas são utilizadas, também, como inibidores irreversíveis da atividade halogenante da MPO, pois se ligam covalentemente ao grupo heme da enzima, modificando sua estrutura. Assim, a enzima não é capaz de oxidar os íons cloretos e/ou brometos (TIDÉN, ANNA-KARIN et al, 2011 e WARD et al., 2013).

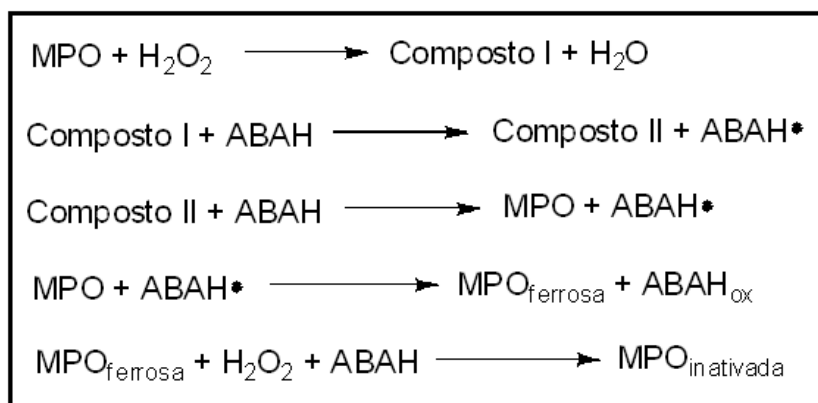


Figura 9. Representação da ação do ABAH na inibição do mecanismo halogenante da MPO.

O ABAH é oxidado por meio do mecanismo peroxidásico da MPO produzindo espécies radiculares. Esses radicais convertem a MPO na sua forma ferrosa, que é acumulada e inativada irreversivelmente por meio da destruição dos grupos heme. Adaptado de Kettle; Gedye; Winterbourn, (1997) e Klebanoff (2005).

Tiyerili et al. (2016) realizou um estudo com ratos portadores de aterosclerose aplicando doses de 4-ABAH e observou que o inibidor provocou um efeito vasculoprotetor no animal. Esses resultados confirmam que os inibidores podem ser utilizados como possíveis fármacos em doenças em que a MPO possa estar envolvida. Em outro estudo realizado por

Churg et al. (2012) foi observado o efeito do uso da 2-tioxantinas em cobaias que apresentavam doenças pulmonares crônicas. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que o inibidor foi capaz de parar a progressão do enfisema pulmonar e conseguiu proteger parcialmente contra a hipertensão pulmonar, sugerindo que sua aplicação pode ser utilizada como um tratamento terapêutico para doenças pulmonares.

Os estudos envolvendo inibidores para a MPO tem como principal finalidade atuar como possíveis agentes farmacológicos em doenças em que a enzima possa estar envolvida.

2.6 – Métodos para a determinação da atividade da mieloperoxidase

O sistema MPO-H₂O₂ na presença de haletos pode ser uma poderosa ferramenta antimicrobiana, porém, como mencionado anteriormente, ele pode, também, ser associado a processos deletérios nos seres humanos, quando ocorre a produção de excesso de HOCl e/ou HOBr. Neste contexto, destaca-se a importância da determinação da atividade catalítica da MPO. A literatura apresenta diversos métodos utilizados nesta determinação. Dentre a atividade peroxidásica e a halogenante da MPO, a determinação da última é mais importante, visto que, a MPO é a única enzima capaz de oxidar, com eficiência, íons cloreto à HOCl. Ensaio clássico de peroxidases que utilizam substratos como, guaiacol, o-dianisidina e ácido *p*-hidroxifenilacetico, não são específicos para a MPO, visto que eles podem participar do ciclo catalítico de outras peroxidases (DYPBUKT et al., 2005).

A produção do HOCl não pode ser monitorada diretamente já que ele não se acumula, reagindo com outros compostos presentes em solução. Por isso, na determinação da atividade halogenante da MPO, deve-se utilizar um substrato que possua alguma característica que

possa sofrer algum tipo de alteração durante a reação de oxi-redução, como, por exemplo, mudanças na absorbância, na fluorescência ou na quimiluminescência. A alta capacidade oxidante da MPO é a principal dificuldade encontrada nesta determinação, pois ela pode oxidar o substrato utilizado para a análise, formando o composto II, e, neste caso, o valor da atividade halogenante determinado estará superestimado (KETTLE et al., 2014).

Um dos métodos mais utilizados na determinação da atividade halogenante é a utilização da taurina. A taurina reage com o HOCl formando a taurina cloramina, um produto estável, que na presença de iodeto, oxida o 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), formando um complexo de cor azul (Figura 10). A intensidade da cor do complexo será proporcional a taxa de reação entre os compostos e pode ser mensurada utilizando a absorbância. Este ensaio é sensível e específico para a MPO, porém, ao utilizá-lo não será possível monitorar continuamente a produção de HOCl (DYPBUKT et al., 2005 e KETTLE et al., 2014). Além disso, o TMB utilizado neste método, não pode ser adicionado no momento da reação de formação do HOCl, pois ele seria oxidado pela MPO por meio do mecanismo peroxidásico. Por isso, dizemos que o método utilizando taurina e TMB, apesar de seletivo, é um método indireto de determinação da atividade halogenante da MPO.

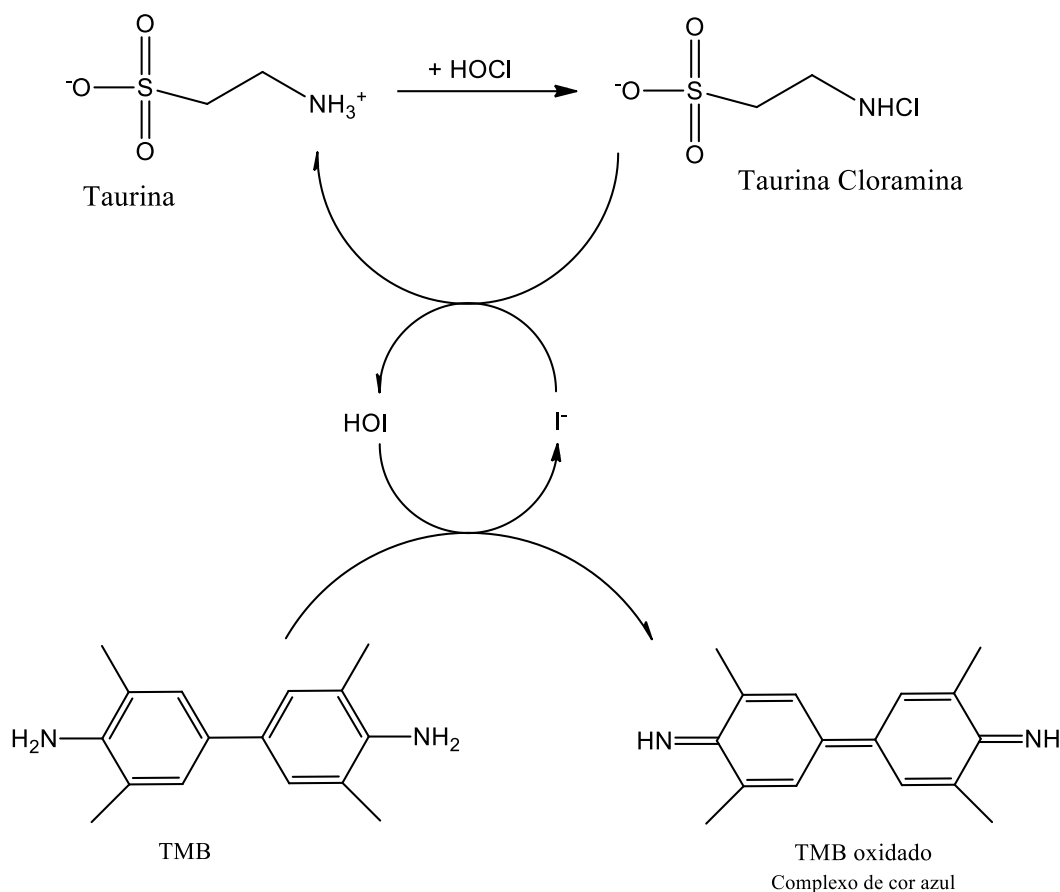


Figura 10. Mecanismo da metodologia que utiliza a taurina cloramina e o TMB para a detecção do HOCl .

Adaptado de Kettle et al. (2014).

A metodologia que utiliza a taurina e o TMB também é empregada quando a produção de HOCl é realizada nos neutrófilos. Apesar de a produção de HOCl não ser monitorada continuamente, essa metodologia é simples e sensível a concentração de HOCl produzido nos neutrófilos (KETTLE et al., 2014).

Outro método utilizado para quantificar a atividade halogenante da MPO envolve o ascorbato que reage com HOCl formado. O consumo do ascorbato em reação pode ser monitorado por meio da absorbância em 266 nm. A desvantagem desse método, é que se usado em grande quantidade, o ascorbato será oxidado pela MPO por meio do mecanismo

peroxidásico, formando o composto II, e assim comprometerá a análise da formação do HOCl (KETTLE et al., 2014 e CHESNEY et al., 1991).

O uso de eletrodos para monitorar o consumo de H_2O_2 também pode ser utilizado na determinação da atividade halogenante da MPO. A medida que o H_2O_2 é consumido na reação, ocorre a formação do composto I que irá oxidar os íons Cl^- . Esse método é útil na determinação de constantes cinéticas. Porém, o sinal do eletrodo é prejudicado pelos componentes do sistema, o que impede que o consumo de H_2O_2 seja registrado com precisão (KETTLE et al., 2014).

Em um estudo recente Sokolov et al. (2015) relatou um novo método para a determinação da atividade halogenante da MPO. Ele utilizou o celestine blue B (CB) na reação entre a MPO, Cl^- e H_2O_2 na presença de taurina e KI. O CB não é um substrato para o mecanismo peroxidásico da MPO e a partir de medidas de absorbância, ele encontrou que a relação entre a concentração de taurina-cloramina e o CB é de 1:2. Além disso, a alteração nas medidas de absorbância do CB na presença de Cl^- é igual quando está na presença de Br^- , o que permite que a medida da atividade halogenante da MPO possa ser determinada em relação a qualquer uma das duas espécies de halogêneos. Essa metodologia também possibilitou realizar medidas de cinética enzimática diferentemente da metodologia que utiliza o TMB. Por meio da metodologia utilizando o CB ainda foi possível analisar a produção contínua de HOCl nos neutrófilos. Contudo, a técnica apresentou algumas desvantagens, como por exemplo, a sensibilidade do CB a exposição de luz, exigindo que a solução fosse mantida no escuro durante os experimentos.

O uso de sondas fluorescentes para identificar a produção de HOCl possui vantagens, pois trata-se de uma técnica de alta sensibilidade, seletividade e que permite a observação *in situ* (LIU et al., 2014). Neste contexto, a aminofenil-fluoresceína (APF) é uma molécula utilizada como sonda na determinação da atividade halogenante da MPO ou EPO. Ela é uma

molécula não fluorescente, porém, é convertida por HOCl, HOBr em uma molécula fluorescente, a fluoresceína (SETSUKINAI et al., 2002 e FLEMMIG et al., 2015). Nesta reação ocorre a clivagem da molécula APF, na porção aminofenil, como mostra a Figura 11. Os testes na determinação da atividade halogenante utilizando o APF também foram realizados nos neutrófilos e a sonda conseguiu detectar de maneira seletiva a presença dos oxidantes (SETSUKINAI et al., 2002).

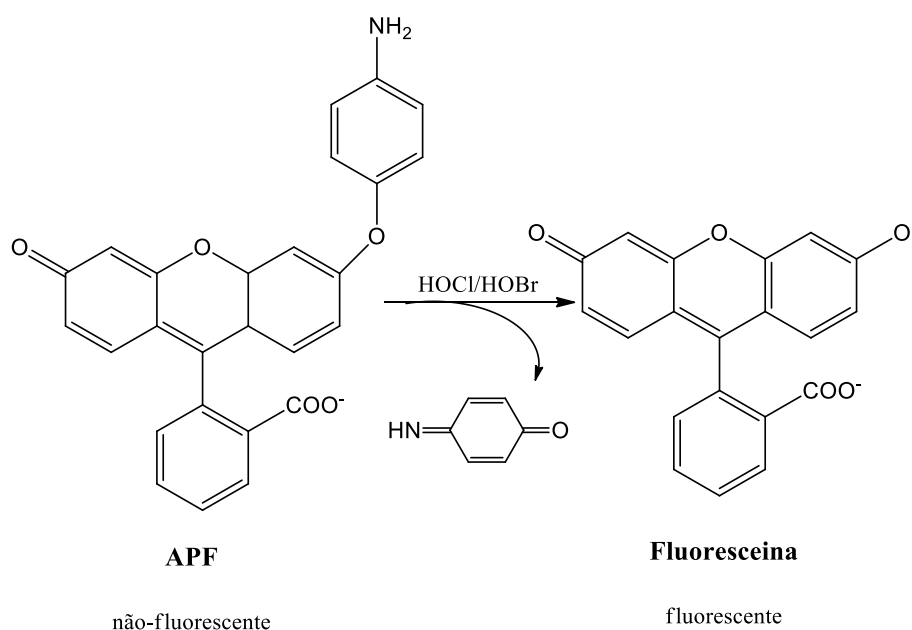


Figura 11. Esquema metodologia que utiliza APF na identificação do HOCl e HOBr.
Adaptado de Setsukinai et al. (2002).

Esses métodos são específicos para a MPO e, apesar de conter algumas desvantagens, são sensíveis à produção de HOCl (KETTLE et al., 2014). Porém alguns desses métodos são indiretos, sendo necessário a presença de outro substrato, que deve ser adicionado depois da reação de formação do HOCl, para capturar os íons cloreto e assim, conseguir mensurar a atividade halogenante da MPO.

O desenvolvimento de uma metodologia que possa identificar e quantificar seletivamente a produção de HOCl e/ou HOBr possui grande relevância no contexto em que a MPO é associada a possíveis processos deletérios nos seres humanos.

2.7 – A aplicação da dansilglicina como reagente fluorescente susceptível a ataque eletrofílico do HOCl e HOBr

Para analisar a atividade halogenante da MPO é necessário utilizar um substrato que possua alguma característica espectroscópica que possa sofrer algum tipo de alteração durante a reação de oxi-redução, neste caso, a fluorescência. Como mencionamos anteriormente, já existem técnicas que utiliza a fluorescência para determinar a atividade halogenante da MPO, como, por exemplo, a aplicação da aminofenil-fluoresceína (APF) que ao reagir com o HOCl e/ou HOBr se torna fluorescente (SETSUKINAI et al., 2002). O uso da fluorescência é vantajoso, pois trata-se de uma técnica simples e altamente seletiva.

Ximenes, Morgon e Souza (2015) estudaram a reatividade do HOCl e do HOBr em diferentes compostos, dentre eles, a dansilglicina, DG (Figura 12). A DG já é utilizada como sonda fluorescente em estudos para a caracterização de sítios de ligação na albumina (Zhang et al., 2014). Os autores comprovaram que a DG é susceptível ao ataque eletrofílico tanto do HOCl como do HOBr. Por meio de medidas de fluorescência de cinética rápida, eles determinaram que o HOBr ($k_2 = 7,30 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) possui uma reatividade significativamente maior do que o HOCl ($k_2 = 5,20 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (XIMENES; MORGON; SOUZA, 2015).

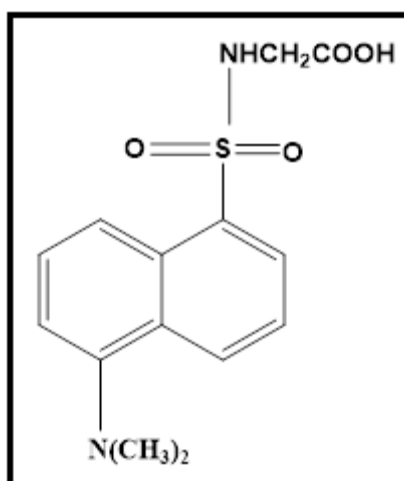


Figura 12. Dansilglicina – DG.

Diante dos pressupostos apresentados, a DG possui as características necessárias para se tornar uma sonda para a determinação da atividade halogenante da MPO, pois ela possui uma propriedade mensurável (fluorescência) e é vulnerável ao ataque eletrofílico do HOCl e do HOBr.

3 – OBJETIVO

Estudo e desenvolvimento de metodologia analítica, sensível e específica, capaz de determinar diretamente a atividade halogenante das enzimas mieloperoxidase e peroxidase de eosinófilos. Aplicação da metodologia desenvolvida em estudos com inibidores reversíveis e irreversíveis.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Reagentes e Soluções

Os reagentes e soluções utilizados nesses estudos foram: dansilglicina (DG - $C_{14}H_{16}N_2O_4S$), ácido hipocloroso (HOCl), brometo de sódio (NaBr), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4), fosfato dibásico de sódio (Na_2HPO_4), fosfato monobásico de sódio 99% (NaH_2PO_4), acetato de amônia, acetonitrila, iodeto de potássio, ácido acético, tetrametilbenzidina (TMB), taurina, dimetilformamida (DMF), catalase, 5-fluortriptamina, 4-hidroxibenzilhidrazida, todos adquiridos pela Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi adquirido da Merck (Darmstadt, Germany). As enzimas mieloperoxidase (MPO) e peroxidase de eosinófilos (EPO) foram adquiridas da Planta Natural Products (Vienna, Austria).

4.2 – Equipamentos

Os equipamentos utilizados neste trabalho foram: medidor de pH (Analyser modelo 300 Digital - São Paulo, Brasil); balança analítica AG245 (Mettler Toledo, Ohio, EUA); espectrofotômetro UV-Vis *Lambda 35* (Perkin Elmer, Shelton, CT, USA); estufa de incubação (Thermo Eletron Corporation, Waltham, Massachusetts, EUA); espectrômetro adaptado para estudos de cinética rápida, *stopped-flow*, (SX20/LED Stopped-Flow System, Applied

Photophysics, UK); espectrômetro de fluorescência e absorbância adaptado para microplacas (Synergy H1 Hybrid Reader, Biotek, Winooski, VT, USA); cromatógrafo de alta eficiência HPLC acoplado aos detectores UV-Vis e fluorescência (Jasco, Easton, MD, USA), cromatógrafo de alta eficiência HPLC acoplado ao espectrômetro de massas *Microtof II* (Bruker, Massachusetts, EUA); detector amperométrico e eletrodo específico para peróxido de hidrogênio (TBR 4100, Free Radical Analyzer, World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA).

4.3 – Preparo de soluções

Os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico e foram utilizados tal como fornecidos, sem purificação adicional. A água foi duplamente deionizada utilizando um sistema de osmose reversa (Quimis Aparelhos Científicos, São Paulo, Brasil) e um sistema de purificação Milli-Q (Simplicity Millipore, Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha).

4.3.1 – Solução fisiologia salina tamponada com fosfato (Phosphate Buffered Saline, PBS)

Para o preparo de 200 mM de tampão PBS foram pesados 8,00 g de NaCl, 0,200 g de KCl, 1,15 g de Na₂HPO₄ e 0,200 g de KH₂PO₄. Os sais foram dissolvidos em água, o pH foi ajustado para 7,4, em um medidor de pH, e o volume completado para 1,00 L em balão volumétrico. A solução foi mantida em geladeira.

4.3.2 – Dansilglicina

Para o preparo de 5,00 mL da sonda dansilglicina (DG) 2,50 mM (Massa Molar = 308,35 g.mol⁻¹), foram pesados 0,00383 g de DG e diluído em uma solução de ácido nítrico padronizado a 0,10 M. E a partir desta fizeram-se as diluições necessárias em água, para cada experimento. A solução estoque foi mantida na geladeira e a solução de trabalho era descartada todos os dias.

4.3.3 – Ácido hipocloroso

Ácido hipocloroso (HOCl) foi preparado a partir da diluição da solução comercial (1,43 M). A concentração desta solução foi determinada utilizando o espectrofotômetro UV-Vis, a partir da Lei de Lambert-Beer e sabendo-se que $\epsilon_{292} = 350 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ para o HOCl dissolvido em NaOH 0,01 M. A solução de trabalho, HOCl 500 μM , foi preparada a partir da diluição, em água, da solução concentrada. A solução de trabalho foi descartada todos os dias.

4.3.4 – Brometo de sódio

Para o preparo de 2,00 mL de brometo de sódio, NaBr, 100 mM (Massa Molar = 102,89 g.mol⁻¹) foram pesados 0,2057 g de NaBr e diluído em água. Esta solução foi mantida estocada na geladeira.

4.3.5 – Acetato de amônia

Para o preparo de 1,00 L da solução de acetato de amônia 10,0 mM, pH=7,2 (Massa Molar = 77,08 g.mol⁻¹) foram pesados 0,7708 g do sal e diluído em água. O pH foi ajustado

em um medidor de pH. A solução foi filtrada utilizando um sistema de vácuo antes de ser utilizada no HPLC.

4.3.6 – Solução tampão fosfato de sódio 10,0 mM, pH=7,5

Para o preparo da solução tampão fosfato 10,0 mM, pH 7,5 foram preparadas uma solução de fosfato dibásico de sódio 10,0 mM (0,1420 g em 100 mL de água) e uma solução de fosfato monobásico de sódio 10,0 mM (0,1199 g em 100 mL de água). Em um béquer foram adicionados 50 mL da solução de fosfato monobásico de sódio 10,0 mM. O ajuste do pH foi realizado adicionando-se a solução de fosfato dibásico de sódio 10,0 mM.

4.3.7 – Iodeto de Potássio

Para o preparo de 10 mL de uma solução de iodeto de potássio, KI, 10,0 mM (Massa Molar = $166,0 \text{ g.mol}^{-1}$) foram pesados 0,1660 g de KI e diluído em água.

4.3.8 – Ácido acético

Para o preparo de 100 mL de uma solução de ácido acético 0,80 M (Massa Molar = $60,05 \text{ g.mol}^{-1}$) foram pipetados 4,60 mL de ácido acético concentrado e completado o volume de 100 mL com água em um balão volumétrico.

4.3.9 – Tetrametilbenzidina - TMB

Para o preparo de 5,00 mL da solução de tetrametilbenzidina, TMB, 14,0 mM (Massa Molar: $240,35 \text{ g.mol}^{-1}$) foram pesados 0,1682 g de TMB e diluído em 2,50 mL de

dimetilformamida e 2,50 mL de ácido acético 0,80 M. Por fim, foi adicionado 100 μ L de KI 10,0 mM nesta solução. Esta solução foi descartada ao fim do dia.

4.3.10 – Solução tampão PBS-aurina

Para o preparo de 20,0 mL da solução tampão PBS-aurina 10,0 mM foram pesados 0,0250 g de aurina (Massa Molar = 125,2 g.mol⁻¹) e diluído em 20,0 mL de PBS.

4.3.11 – Catalase

Para o preparo de uma solução de catalase 1,00 mg/mL foram pesados 0,00100 g de catalase e diluído em 1,00 mL de água. A solução foi mantida na geladeira.

4.3.12 – Peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio, H₂O₂, foi preparado a partir da diluição da solução comercial (9,00 M). A concentração desta solução foi determinada utilizando o espectrofotômetro UV-Vis, a partir da Lei de Lambert-Beer e sabendo-se que $\epsilon_{240} = 43,6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para o H₂O₂ dissolvido em água. A solução de trabalho, H₂O₂ 500 μ M foi preparada a partir da diluição, em água, da solução concentrada. A solução de trabalho era descartada todos os dias.

4.3.13 – Mieloperoxidase

Para o preparo da enzima mieloperoxidase adicionou-se 100 μ L de água em 100 μ g de MPO, produzindo assim uma solução 16,0 μ M. Foram feitas dez alíquotas de 10,0 μ L a partir

dessa solução. Utilizando uma dessas alíquotas, a solução de trabalho de MPO 0,80 μM , foi preparada com a adição de 190 μL de água.

4.3.14 – Peroxidase de eosinófilos

Para o preparo da enzima peroxidase de eosinófilos adicionou-se 100 μL de água em 100 μg EPO, produzindo assim uma solução 16,0 μM . Foram feitas dez alíquotas de 10,0 μL a partir dessa solução. Utilizando uma dessas alíquotas, a solução de trabalho de EPO 0,80 μM , foi preparada com a adição de 190 μL de água.

4.3.14 – Peroxidase de Raiz Forte, HRP

Para o preparo de HRP, 100 μM (Massa molar = 44000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) foram pesados 0,0044 g de HRP e diluído em tampão PBS. Sabendo-se que $\epsilon_{403} = 1,02 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para a solução de HRP, utilizamos o espectrofotômetro de UV-Vis em 403 nm a fim de aferir a concentração desta solução. A solução de 0,80 μM foi preparada a partir da diluição da solução de HRP em água deionizada.

4.3.15 – 5-fluortriptamina

Para o preparo de 1,00 mL de 5-fluortriptamina 10,0 mM (Massa Molar = 214,7 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) foram pesados 0,0022 g de 5-fluortriptamina e diluído em água. Esta solução foi mantida estocada na geladeira.

4.3.16 – Hidrazida do ácido 4-aminobenzóico (4-ABAH)

Para o preparo de 1,00 mL de 4-hidroxibenzilhidrazida 10,0 mM (Massa Molar = $152,15 \text{ g.mol}^{-1}$) foram pesados 0,0015 g de 4-hidroxibenzilhidrazida e diluído em água. Esta solução foi mantida estocada na geladeira.

4.3.17 – Solução tampão fosfato de sódio 100 mM, pH=5 com adição de NaCl 100 mM

Para o preparo da solução tampão fosfato 100 mM, pH 5 foram preparadas uma solução de fosfato dibásico de sódio 100 mM (2,3996 g em 100 mL de água) e uma solução de fosfato monobásico de sódio 100 mM (1,1688 g em 100 mL de água). Em um béquer foram adicionados 100 mL da solução de fosfato monobásico de sódio 100 mM. O ajuste do pH foi realizado adicionando-se a solução de fosfato dibásico de sódio 100 mM. Em 200 mL dessa solução de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH=5 foi adicionado 1,1688 g de NaCl. Essa solução foi a utilizada nos ensaios.

4.4 – Procedimentos

4.4.1 – Estudo da adição de brometo na reação entre a dansilglicina e o HOCl utilizando o *stopped-flow*.

Para o estudo da ação de íons Br^- como co-catalisador da reação entre a DG e o HOCl utilizamos o sistema de *stopped-flow* equipado com LED de alta intensidade e filtros de corte, apresentado na Figura 13. Para monitorar a fluorescência intrínseca da DG utilizamos na excitação um LED de 360 nm e na emissão utilizamos um filtro de corte de 450 nm.



Figura 13. Sistema de stopped-flow (SX20/LED Stopped-Flow System, Applied Photophysics, UK).

A fim de evitar a formação do HOBr e observar apenas o efeito da adição de Br^- na reação, a injeção do HOCl e do Br^- foram realizadas num mesmo momento. O equipamento possui duas seringas para a injeção dos compostos no início da reação. Desta maneira, a primeira seringa possuía a DG juntamente com o Br^- e a segunda possuía apenas o HOCl. As análises foram realizadas em solução tampão PBS e a concentração de DG ($50,0 \mu\text{M}$) e de HOCl ($100 \mu\text{M}$) foram mantidas fixas e as concentrações de Br^- ($12,5$ - $100 \mu\text{M}$) foram variadas.

4.4.2 – Estudo da adição de brometo na reação entre a dansilglicina e o HOCl utilizando o fluorímetro de microplacas.

O estudo da adição de íons Br^- na reação entre a DG e o HOCl também foi realizado utilizando um fluorímetro de microplacas (Figura 14). Para isso foram utilizadas placas de 96

poços NuncTM Denmark pretas. O equipamento foi ajustado para realizar medidas de fluorescência em regime de cinética de ponto final. Nas análises, o comprimento de onda de excitação foi ajustado em 340 nm, e o comprimento de onda de emissão foi ajustado em 575 nm. A sensibilidade do equipamento foi de 100 e foram realizadas agitações de 5 segundos antes de cada análise. As medidas foram programadas para serem realizadas, a 37°C, em intervalos de 1 minuto durante 30 minutos.



Figura 14. Detector de fluorescência e absorbância (Synergy H1 Hybrid Reader, Biotek, Winooski, VT, USA).

A reação foi realizada em solução tampão PBS e foi desencadeada com a adição de HOCl 100 μ M. A concentração de DG foi mantida fixa (50,0 μ M) e a concentração de Br⁻ foi variada (0,100-10,0 mM). O volume final da reação foi de 250 μ L. A placa foi mantida dentro do equipamento a 37 °C antes da adição do HOCl. As análises foram realizadas em triplicata. Os dados obtidos pelo equipamento foram trabalhados utilizando o software GraphPad Prism 5.0 e os resultados foram expressos considerando o valor da fluorescência da DG após 30 minutos de reação.

4.4.3 – Determinação da curva analítica do HOCl utilizando o HPLC.

Para determinar a variação da fluorescência da DG em diferentes concentrações de HOCl utilizou-se um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detectores UV-Vis e fluorescência (Figura 15). Utilizou-se uma coluna de fase reversa C18 (Luna, Phenomenex, 250 x 4,6 mm, 5 nm), o sensor de UV-Vis foi ajustado em 254 nm e o sensor de fluorescência em $\lambda_{\text{ex}} = 335 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 522 \text{ nm}$, o fluxo foi de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e alíquotas de $20 \text{ } \mu\text{M}$ foram injetadas no HPLC. As análises foram realizadas no tempo total de 30 minutos. A fase móvel foi constituída de acetato de amônia 10 mM, pH=7,2 e acetonitrila em um sistema de gradiente que inicialmente possui a proporção de 75:25 (%v/v) e aos 10 minutos altera a sua proporção para 65:35 (%v/v) permanecendo constante até os 25 minutos em que a condição inicial de análise era reestabelecida até o tempo final de 30 minutos.



Figura 15. Cromatografia líquida de alta eficiência HPLC (Jasco acoplado aos detectores UV-Vis e fluorescência).

Antes de serem injetadas no equipamento, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. O valor da área de cada pico obtido no cromatograma foi determinado utilizando o *software* de integração do equipamento. Os resultados foram expressos em valor da área do pico referente a DG em função da concentração de HOCl.

4.4.4 – Determinação da curva analítica do HOCl utilizando o fluorímetro de microplacas.

Para estudar a variação da fluorescência da DG em diferentes concentrações de HOCl também utilizamos o fluorímetro de microplacas. O equipamento foi programado para medir o espectro de fluorescência, sendo que, o comprimento de onda de excitação foi ajustado em 340 nm, e a emissão foi obtida no intervalo de 450-650 nm. A sensibilidade do equipamento foi de 100 e foram realizadas agitações de 5 segundos antes de cada análise.

As reações foram preparadas em solução tampão PBS e as concentrações de DG (50,0 μM) e de Br^- (1,00 mM) foram mantidas fixas, enquanto a concentração de HOCl foi variada (12,5-100 μM). O volume final de reação foi de 250 μL . Antes de serem injetados no equipamento, as placas pretas com as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos.

A fim de obter o valor absoluto da fluorescência da DG no máximo de fluorescência em 575 nm, o fluorímetro de microplacas foi programado para realizar medidas de ponto final, sendo que, o comprimento de onda de excitação foi ajustado em 340 nm, e o comprimento de onda de emissão foi ajustado em 575 nm. A sensibilidade do equipamento foi de 100 e foram realizadas agitações de 5 segundos antes de cada análise. Da mesma maneira que na análise dos espectros de fluorescência, as reações foram preparadas em solução tampão PBS e as concentrações de DG (50,0 μM) e de Br^- (1,00 mM) foram mantidas fixas, enquanto a concentração de HOCl foi variada (12,5-100 μM). O volume final de reação

foi de 250 μL . Antes de serem injetadas no equipamento, as placas pretas com as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. As análises foram feitas em triplicata. Os resultados foram expressos em valor absoluto da fluorescência da DG em função da concentração de HOCl.

4.4.5 – Estudo do espectro de absorbância da dansilglicina

Para estudar o espectro de absorbância da DG após a sua reação com o Br^- e o HOCl utilizamos o detector de absorbância de microplacas. O equipamento foi ajustado para determinar o espectro de absorbância no intervalo 250-450 nm.

As amostras foram preparadas em tampão PBS e as concentrações de DG (50,0 μM) e de Br^- (1,00 mM) foram mantidas fixas, enquanto a concentração de HOCl foi variada (50,0 ou 100 μM). O volume final de reação foi de 250 μL . Antes de ser analisada no equipamento, a placa transparente com as amostras foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Os resultados foram expressos em absorbância da DG em função do comprimento de onda.

4.4.6 – Identificação dos produtos da reação

Para determinar a estrutura dos produtos da reação entre a DG e o HOCl na ausência e na presença de Br^- utilizamos um equipamento de cromatografia de alta eficiência (HPLC) acoplado a um espectrômetro de massa (Figura 16). Essas análises foram realizadas na Central de Espectrometria de Massas de Micromoléculas Orgânicas (CEMMO) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

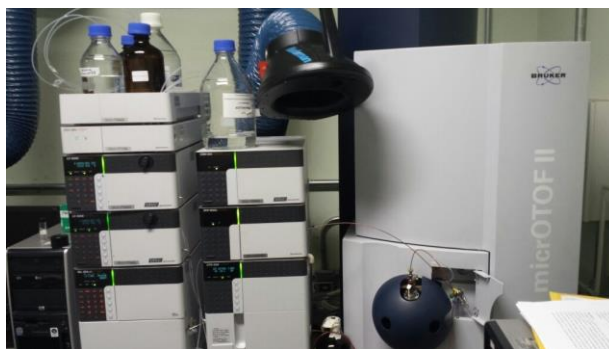


Figura 16. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (Bruker, Massachusetts, EUA).

No HPLC utilizou-se uma coluna C18, o sensor de UV-Vis foi ajustado em 254 nm, o fluxo foi de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e alíquotas de $20 \text{ } \mu\text{L}$ foram injetadas no equipamento. As análises foram realizadas no tempo total de 40 minutos. A fase móvel foi constituída de acetato de amônia $10,0 \text{ mM}$, $\text{pH}=7,2$ e acetonitrila em um sistema de gradiente que inicialmente possui a proporção de $75:25 \text{ (\%v/v)}$ e aos 10 minutos altera a sua proporção para $65:35 \text{ (\%v/v)}$ permanecendo constante até os 25 minutos, alterando-se novamente e permanecendo constante até os 35 minutos em $0:100 \text{ (\%v/v)}$, em que a condição inicial de análise era reestabelecida até o tempo final de 40 minutos. O espectrômetro de massas possuía um setor de análise de tempo de voo (TOF), o calibrante interno utilizado foi o TFA sodiado (NaTFA) e as análises foram feitas no modo positivo e no negativo.

Foram preparadas três amostras em solução tampão PBS. A primeira foi constituída apenas de DG ($50,0 \text{ } \mu\text{M}$), a segunda amostra foi formada por DG ($50,0 \text{ } \mu\text{M}$), Br^- ($1,00 \text{ mM}$) e HOCl ($100 \text{ } \mu\text{M}$) e a terceira amostra foi constituída de DG ($50,0 \text{ } \mu\text{M}$) e HOCl ($100 \text{ } \mu\text{M}$). Todas as amostras foram preparadas no mesmo momento e programadas para serem injetadas no equipamento nesta ordem. Os espectros de massas foram obtidos diretamente do equipamento em formato de imagem.

4.4.7 – Estudo da adição de íons Br^- na reação

O estudo da adição de íons Br^- na reação entre a DG, a MPO e H_2O_2 foi realizado utilizando um fluorímetro de microplacas. O equipamento foi ajustado para realizar medidas de fluorescência em regime de cinética de ponto final. Nas análises, o comprimento de onda de excitação foi ajustado em 340 nm, e o comprimento de onda de emissão foi ajustado em 575 nm. A sensibilidade do equipamento foi de 100 e foram realizadas agitações de 5 segundos antes de cada análise. As medidas foram programadas para serem realizadas, a 37 °C, em intervalos de 1 minuto durante 30 minutos.

As amostras foram preparadas em solução tampão PBS e em placas pretas. As concentrações de DG (50,0 μM), de MPO (20,0 nM) e de H_2O_2 (100 μM) foram mantidas fixas e a concentração de Br^- foi variada (0,10-10,0 mM) durante a reação. O volume final da reação foi de 200 μL . O início da reação foi desencadeado com a adição de H_2O_2 . Desta maneira, antes da adição de H_2O_2 , a placa preta com as amostras foi incubada no interior do equipamento por 5 minutos a 37 °C. As análises foram feitas em triplicata. Os resultados foram expressos em valores de fluorescência da DG em função do tempo de reação.

4.4.8 – Determinação da curva analítica de H_2O_2

Para estudar a variação da fluorescência da DG em diferentes concentrações de H_2O_2 utilizou-se o fluorímetro de microplacas. O equipamento foi programado para medir a fluorescência em ponto final, sendo que, o comprimento de onda de excitação foi ajustado em 340 nm, e o comprimento de onda de emissão foi ajustado em 575 nm. A sensibilidade do equipamento foi de 100 e foram realizadas agitações de 5 segundos antes de cada análise.

As amostras foram preparadas em tampão PBS, mantendo as concentrações de DG (50,0 μM), MPO (20,0 nM) e Br^- (10,0 mM) fixas e variando a concentração de H_2O_2 (12,5-

100 μM) durante as reações. Em segundo ensaio, a concentração de MPO foi variada para 5,00 nM. O volume final da reação foi de 200 μL . Como o H_2O_2 desencadeava o início da reação, ele foi o último a ser adicionado no meio reacional. As placas pretas com as amostras foram incubadas na estufa a 37 °C por 30 minutos antes de serem analisadas pelo equipamento. As análises foram feitas em triplicata. Os resultados foram expressos em valor de fluorescência da DG em função das diferentes concentrações de H_2O_2 .

4.4.9 – Determinação da curva analítica do HOCl utilizando a metodologia com TMB e taurina.

Para determinar a variação na absorbância do TMB causada por diferentes concentrações de HOCl utilizamos o detector de absorbância de microplacas. Sabe-se que o HOCl reage com a taurina formando a taurina-cloramina que por sua vez é capaz de reagir com o TMB, causando alterações na sua absorbância. Desta maneira, o equipamento foi ajustado para medir a absorbância do TMB em 655 nm.

As amostras foram preparadas em tampão PBS-taurina utilizando placas transparentes e variando a concentração de HOCl (12,5-50 μM), em um volume final de 200 μL . Após 5 minutos de reação, foi adicionado 50,0 μL de TMB e depois de mais 5 minutos, as reações foram analisadas pelo equipamento. As análises foram feitas em triplicata. Os resultados foram expressos em valores de absorbância do TMB em função da concentração de HOCl.

4.4.10 – Determinação da curva analítica do H_2O_2 utilizando a metodológica com TMB e taurina

Para determinar a variação na absorbância do TMB causada por diferentes concentrações de H_2O_2 utilizamos o detector de absorbância de microplacas. O equipamento

foi ajustado para medir a absorbância do TMB em 655 nm. As amostras foram preparadas em tampão PBS-aurina em placas transparentes. Em um primeiro ensaio, a concentração de MPO foi mantida fixa em 20,0 nM, já em um segundo momento essa concentração foi alterada para 5,00 nM. Nos dois ensaios, a concentração de H₂O₂ foi variada (12,5-100 µM) durante as reações. O início da reação foi desencadeado com a adição de H₂O₂. O volume final da reação foi de 200 µL. A placa transparente com as amostras foi incubada a 37 °C utilizando a estufa. Após esse período foi adicionado 10,0 µL de catalase 1,000 mg/mL para consumir o H₂O₂ restante no meio reacional. Em seguida, após 5 minutos, adicionou-se 50,0 µL de TMB. Esperou-se mais 5 minutos antes de realizar as medidas de absorbância do TMB. As análises foram feitas em triplicata. Os resultados foram expressos em valores de absorbância do TMB em função da concentração de H₂O₂.

4.4.11 – Estudo da cinética enzimática utilizando a MPO

Para estudar a variação causada na fluorescência da DG em função da concentração de MPO utilizamos o fluorímetro de microplacas. O equipamento foi programado para realizar medidas de cinética de ponto final, sendo que, o comprimento de onda de excitação foi ajustado em 340 nm, e o comprimento de onda de emissão foi ajustado em 575 nm. A sensibilidade do equipamento foi de 100 e foram realizadas agitações de 5 segundos antes de cada análise. As medidas foram programadas para serem realizadas, a 37 °C, em intervalos de 1 minuto durante 30 minutos.

As amostras foram preparadas em solução tampão PBS e em placas pretas. Inicialmente, as concentrações de DG (50,0 µM), de Br⁻ (10,0 mM) e de H₂O₂ (100 µM) foram mantidas fixas e a concentração de MPO foi variada (4,00 – 20,0 nM) durante a reação. O volume final da reação foi de 200 µL. O início da reação foi desencadeado com a adição de

H₂O₂. Desta maneira, antes da adição de H₂O₂, a placa preta com as amostras foi incubada no interior do equipamento por 5 minutos a 37 °C. As análises foram feitas em triplicata. Os resultados foram expressos em valores de fluorescência da DG em função do tempo de reação.

4.4.12 – Estudo da ausência de MPO ou Br⁻ ou H₂O₂ na reação

A fim de verificar o comportamento da sonda na ausência de algum dos componentes do meio reacional utilizou-se o fluorímetro de microplacas. O equipamento foi programado para medir a fluorescência em ponto final, sendo que, o comprimento de onda de excitação foi ajustado em 340 nm, e o comprimento de onda de emissão foi ajustado em 575 nm. A sensibilidade do equipamento foi de 100 e foram realizadas agitações de 5 segundos antes de cada análise.

As amostras foram preparadas em tampão PBS e em placas pretas. Nas amostras a concentração de DG foi de 50,0 µM, de MPO foi de 20,0 nM, de Br⁻ foi de 10,0 mM e de H₂O₂ foi de 100 ou 50,0 µM. Porém, o meio reacional de cada amostra apresentava diferentes condições. Em um primeiro caso, a amostra foi constituída de DG, MPO, Br⁻ e H₂O₂ em tampão PBS. No segundo caso o sistema não contém Br⁻. Na terceira condição o sistema está ausente de MPO e no último caso, o sistema estava ausente de H₂O₂. As reações foram desencadeadas com a adição de H₂O₂. Essas amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos na estufa antes de serem analisadas. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em porcentagem de DG consumida em reação ou concentração de DG consumida em reação.

4.4.13 – Estudo da ausência de Cl^- e/ou Br^- na reação

Para verificar as alterações de fluorescência da DG causada pela ausência de Cl^- e/ou Br^- na reação entre a DG, a MPO, e o H_2O_2 utilizou-se o fluorímetro de microplacas. O equipamento foi programado para medir a fluorescência em ponto final, sendo que, o comprimento de onda de excitação foi ajustado em 340 nm, e o comprimento de onda de emissão foi ajustado em 575 nm. A sensibilidade do equipamento foi de 100 e foram realizadas agitações de 5 segundos antes de cada análise.

As amostras foram preparadas em tampão fosfato de sódio 10,0 mM, pH=7,5 e em placas pretas. Nas amostras a concentração de DG foi de 50,0 μM , de MPO foi de 20,0 nM, de Br^- foi de 10,0 mM e de H_2O_2 foi de 100 ou 50,0 μM . Porém, o meio reacional de cada amostra apresentava diferentes condições. Em um primeiro caso, a amostra era constituída de DG, MPO, Br^- e H_2O_2 em tampão fosfato de sódio 10,0 mM, pH=7,5, ou seja, o meio estava ausente de Cl^- . Na segunda condição, a amostra foi constituída de DG, MPO e H_2O_2 em tampão fosfato de sódio 10,0 mM, pH=7,5, ou seja, o meio reacional estava ausente de Cl^- e de Br^- . As reações foram desencadeadas com a adição de H_2O_2 . Essas amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos na estufa antes de serem analisadas. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em porcentagem de DG consumida em reação ou concentração de DG consumida em reação.

4.4.14 – Estudo da reação utilizando a peroxidase de raiz forte (HRP)

Para verificar as alterações causadas na fluorescência da DG com a substituição da MPO pela HRP na reação utilizou-se o fluorímetro de microplacas. O equipamento foi programado para medir a fluorescência em ponto final, sendo que, o comprimento de onda de excitação foi ajustado em 340 nm, e o comprimento de onda de emissão foi ajustado em 575

nm. A sensibilidade do equipamento foi de 100 e foram realizadas agitações de 5 segundos antes de cada análise.

As amostras foram preparadas em tampão PBS e em placas pretas. Nas amostras a concentração de DG foi de 50,0 μM , de MPO ou HRP foi de 20,0 nM, de Br^- foi de 10,0 mM e de H_2O_2 foi de 100 ou 50,0 μM . Desta maneira, existiam duas condições diferentes de reação: uma em que estava presente a MPO no meio reacional e outra em que a HRP participava da reação. As reações foram desencadeadas com a adição de H_2O_2 . Essas amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos na estufa antes de serem analisadas. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em porcentagem de DG consumida em reação ou concentração de DG consumida em reação.

4.4.15 – Utilização do ensaio amperométrico para o monitoramento da reação

O consumo de H_2O_2 pela atividade catalítica da MPO foi monitorado usando um detector amperométrico e um biossensor específico para peróxido de hidrogênio (Figura 17). Inicialmente construiu-se uma curva analítica de H_2O_2 . No recipiente em que o eletrodo estava imerso em tampão PBS adicionou-se alíquotas de 20,0 μL de H_2O_2 em pequenos intervalos de tempo, a fim de verificar as mudanças no valor da corrente em função do aumento da concentração de H_2O_2 (20,0-120 μM). No final, com a adição de 10,0 μL de catalase 1 mg.mL^{-1} foi possível verificar a queda da corrente indicando que todo o H_2O_2 do meio foi consumido. Esses resultados foram expressos em valor da corrente em função da concentração de H_2O_2 e obteve-se uma equação da reta referente a esse gráfico.

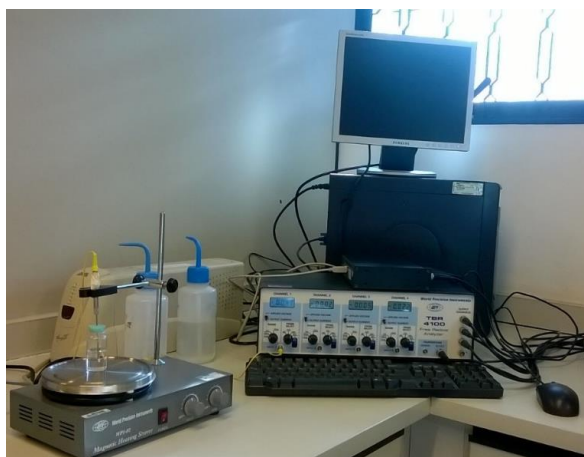


Figura 17. Detector amperométrico e um biossensor específico para peróxido de hidrogênio (TBR 4100 Free Radical Analyzer, World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA).

Inicialmente, o eletrodo estava em um recipiente imenso em tampão PBS onde foram adicionados a DG (50,0 μM), a MPO (20,0 nM), o Br^- (10,0 mM). A reação teve início com a adição do H_2O_2 (100 μM) a 25 °C. O monitoramento do consumo de H_2O_2 foi realizado por aproximadamente 7 minutos. A partir da equação da reta obtida na curva analítica de H_2O_2 os valores de corrente obtidos neste experimento foram convertidos em concentração de H_2O_2 . Os resultados foram expressos em consumo de H_2O_2 por tempo. O mesmo procedimento foi repetido quando o sistema estava ausente de Br^- .

Posteriormente analisamos o consumo de H_2O_2 na ausência de Cl^- e/ou Br^- . Desta maneira, o eletrodo estava em um recipiente imenso em tampão fosfato de sódio 10,0 mM, pH=7,5 onde foram adicionados a DG (50,0 μM), a MPO (20,0 nM), o Br^- (10,0 mM). A reação teve início com a adição do H_2O_2 (100 μM) a 25 °C. O monitoramento do consumo de H_2O_2 foi realizado por aproximadamente 7 minutos. A partir da equação da reta obtida na curva analítica de H_2O_2 os valores de corrente obtidos neste experimento foram convertidos em concentração de H_2O_2 . Os resultados foram expressos em consumo de H_2O_2 por tempo. O mesmo procedimento foi repetido quando o sistema estava ausente de Br^- .

4.4.16 – Estudos com inibidores para MPO

Os estudos envolvendo os inibidores 5-fluortriptamina e 4-hidroxibenzilhidrazida foram realizados utilizando o fluorímetro adaptado para microplacas. O equipamento foi programado para realizar medidas de cinética de ponto final, sendo que, o comprimento de onda de excitação foi ajustado em 340 nm, e o comprimento de onda de emissão foi ajustado em 575 nm. A sensibilidade do equipamento foi de 100 e foram realizadas agitações de 5 segundos antes de cada análise. As medidas foram programadas para serem realizadas, a 37 °C, em intervalos de 1 minuto durante 30 minutos.

As amostras foram preparadas em solução tampão PBS e em placas pretas. Inicialmente, as concentrações de DG (50,0 µM), de Br⁻ (10,0 mM), de MPO (16,0 nM) e de H₂O₂ (100 µM) foram mantidas fixas e a concentração de 5-fluortriptamina (0-20,0 µM) ou de 4-hidroxibenzilhidrazida (0-3,00 µM) foi variada durante a reação. O volume final da reação foi de 200 µL. O início da reação foi desencadeado com a adição de H₂O₂. Desta maneira, antes da adição de H₂O₂, a placa preta com as amostras foi incubada no interior do equipamento por 5 minutos a 37 °C. As análises foram feitas em triplicata. Os resultados foram expressos em valores de fluorescência da DG em função do tempo de reação.

4.4.17 – Determinação da curva analítica de H₂O₂ para a EPO

Para estudar a variação da fluorescência da DG em diferentes concentrações de H₂O₂ utilizou-se o fluorímetro de microplacas. O equipamento foi programado para medir a fluorescência em ponto final, sendo que, o comprimento de onda de excitação foi ajustado em 340 nm, e o comprimento de onda de emissão foi ajustado em 575 nm. A sensibilidade do equipamento foi de 100 e foram realizadas agitações de 5 segundos antes de cada análise.

As amostras foram preparadas em tampão PBS, mantendo as concentrações de DG (50,0 μM), EPO (20,0 nM) e Br^- (10,0 mM) fixas e variando a concentração de H_2O_2 (12,5-100 μM) durante as reações. O volume final da reação foi de 200 μL . Como o H_2O_2 desencadeava o início da reação, ele foi o último a ser adicionado no meio reacional. As placas pretas com as amostras foram incubadas na estufa a 37 °C por 30 minutos antes de serem analisadas pelo equipamento. As análises foram feitas em triplicata. Os resultados foram expressos em valor da variação da fluorescência da DG em função das diferentes concentrações de H_2O_2 .

4.4.18 – Estudo da cinética enzimática utilizando a EPO

Para estudar a variação causada na fluorescência da DG em função da concentração de EPO utilizamos o fluorímetro de microplacas. O equipamento foi programado para realizar medidas de cinética de ponto final, sendo que, o comprimento de onda de excitação foi ajustado em 340 nm, e o comprimento de onda de emissão foi ajustado em 575 nm. A sensibilidade do equipamento foi de 100 e foram realizadas agitações de 5 segundos antes de cada análise. As medidas foram programadas para serem realizadas, a 37 °C, em intervalos de 1 minuto durante 30 minutos.

As amostras foram preparadas em solução tampão PBS e em placas pretas. Inicialmente, as concentrações de DG (50,0 μM), de Br^- (10,0 mM) e de H_2O_2 (100 μM) foram mantidas fixas e a concentração de EPO foi variada (0,40 – 1,20 nM) durante a reação. O volume final da reação foi de 200 μL . O início da reação foi desencadeado com a adição de H_2O_2 . Desta maneira, antes da adição de H_2O_2 , a placa preta com as amostras foi incubada no interior do equipamento por 5 minutos a 37 °C. As análises foram feitas em triplicata. Os

resultados foram expressos em valores de fluorescência da DG em função do tempo de reação.

4.4.19 – Estudo da ausência de EPO ou Br⁻ ou H₂O₂ na reação

A fim de verificar o comportamento da sonda na ausência de algum dos compostos do meio reacional utilizou-se o fluorímetro de microplacas. O equipamento foi programado para medir a fluorescência em ponto final, sendo que, o comprimento de onda de excitação foi ajustado em 340 nm, e o comprimento de onda de emissão foi ajustado em 575 nm. A sensibilidade do equipamento foi de 100 e foram realizadas agitações de 5 segundos antes de cada análise.

As amostras foram preparadas em tampão PBS e em placas pretas. Nas amostras a concentração de DG 50,0 µM, de EPO e 20,0 nM, de Br⁻ 10,0 mM e de H₂O₂ 100 ou 50,0 µM foram mantidas fixas. Porém, o meio reacional de cada amostra apresentava diferentes condições. Em um primeiro caso, a amostra foi constituída de DG, EPO, Br⁻ e H₂O₂ em tampão PBS. No segundo caso o sistema não contém Br⁻. Na terceira condição o sistema está ausente de MPO e no último caso, o sistema estava ausente de H₂O₂. As reações foram desencadeadas com a adição de H₂O₂. Essas amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos na estufa antes de serem analisadas. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em porcentagem de DG consumida em reação ou concentração de DG consumida em reação.

4.4.20 – Estudo da ausência de Cl⁻ e/ou Br⁻ na reação utilizando a EPO

Para verificar as alterações de fluorescência da DG causada pela ausência de Cl⁻ e/ou Br⁻ na reação entre a DG, a EPO, e o H₂O₂ utilizou-se o fluorímetro de microplacas. O

equipamento foi programado para medir a fluorescência em ponto final, sendo que, o comprimento de onda de excitação foi ajustado em 340 nm, e o comprimento de onda de emissão foi ajustado em 575 nm. A sensibilidade do equipamento foi de 100 e foram realizadas agitações de 5 segundos antes de cada análise.

As amostras foram preparadas em tampão fosfato de sódio 10,0 mM, pH=7,5 e em placas pretas. Nas amostras a concentração de DG 50,0 μ M, de EPO 20,0 nM, de Br⁻ 10,0 mM e de H₂O₂ 100 ou 50,0 μ M foram mantidas fixas. Porém, o meio reacional de cada amostra apresentava diferentes condições. Em um primeiro caso, a amostra era constituída de DG, EPO, Br⁻ e H₂O₂ em tampão fosfato de sódio 10,0 mM, pH=7,5, ou seja, o meio estava ausente de Cl⁻. Na segunda condição, a amostra foi constituída de DG, EPO e H₂O₂ em tampão fosfato de sódio 10,0 mM, pH=7,5, ou seja, o meio reacional estava ausente de Cl⁻ e de Br⁻. As reações foram desencadeadas com a adição de H₂O₂. Essas amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos na estufa antes de serem analisadas. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em porcentagem de DG consumida em reação ou concentração de DG consumida em reação.

4.4.21 – Estudos com inibidores para EPO

Os estudos envolvendo os inibidores 5-fluortriptamina e 4-hidroxibenzilhidrazida foram realizados utilizando o fluorímetro adaptado para microplacas. O equipamento foi programado para realizar medidas de cinética de ponto final, sendo que, o comprimento de onda de excitação foi ajustado em 340 nm, e o comprimento de onda de emissão foi ajustado em 575 nm. A sensibilidade do equipamento foi de 100 e foram realizadas agitações de 5 segundos antes de cada análise. As medidas foram programadas para serem realizadas, a 37 °C, em intervalos de 1 minuto durante 30 minutos.

As amostras foram preparadas em solução tampão PBS e em placas pretas. Inicialmente, as concentrações de DG (50,0 μM), de Br^- (10,0 mM), de EPO (1,20 nM) e de H_2O_2 (100 μM) foram mantidas fixas e a concentração de 5-fluortriptamina (0-10,0 μM) ou de 4-hidroxibenzilhidrazida (0-0,30 μM) foi variada durante a reação. O volume final da reação foi de 200 μL . O início da reação foi desencadeado com a adição de H_2O_2 . Desta maneira, antes da adição de H_2O_2 , a placa preta com as amostras foi incubada no interior do equipamento por 5 minutos a 37 °C. As análises foram feitas em triplicata. Os resultados foram expressos em valores de fluorescência da DG em função do tempo de reação.

4.4.22 – Estudo do efeito do pH no meio reacional

O estudo do efeito do pH no meio reacional foi realizado utilizando o fluorímetro adaptado para microplacas. O equipamento foi programado para realizar medidas de cinética de ponto final, sendo que, o comprimento de onda de excitação foi ajustado em 340 nm, e o comprimento de onda de emissão foi ajustado em 575 nm. A sensibilidade do equipamento foi de 100 e foram realizadas agitações de 5 segundos antes de cada análise. As medidas foram programadas para serem realizadas, a 37 °C, em intervalos de 1 minuto durante 30 minutos.

As amostras foram preparadas em dois meios distintos: em solução tampão PBS, pH 7,4, e em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 5, em placas pretas. As concentrações de DG (50,0 μM), de Br^- (10,0 mM), de MPO ou EPO (20,0 nM) e de H_2O_2 (100 μM) foram mantidas fixas. O volume final da reação foi de 200 μL . O início da reação foi desencadeado com a adição de H_2O_2 . Desta maneira, antes da adição de H_2O_2 , a placa preta com as amostras foi incubada no interior do equipamento por 5 minutos a 37 °C. As análises foram feitas em

triplicata. Os resultados foram expressos em valores de fluorescência da DG em função do tempo de reação.

4.4.23 – Cálculo do limite de detecção (LOD)

Os limites de detecção foram calculados de acordo com a equação: $3,3(S_y/S)$, em que S_y é o desvio padrão da curva analítica e S é o valor do coeficiente angular da curva analítica (KUBATOVA, 2016). O LOD é a menor quantidade que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada considerando as condições utilizadas no teste (JUNQUEIRA, 2016).

4.4.24 – Tratamento dos dados

Os gráficos exibidos neste trabalho foram confeccionados utilizando o software GraphPad Prism versão 5.00 registrado por GraphPad Software, Inc (Califórnia, USA).

A diferença estatística foi determinada por One-Way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey. Também foi utilizado o teste t, e em ambos, um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Brometo como co-catalisador na reação entre a dansilglicina e o HOCl.

Estudos recentes em nosso laboratório mostraram que a sonda fluorescente DG tem a sua fluorescência intrínseca decrescida quando interage com HOCl e/ou HOBr (Figura 18) (XIMENES; MORGON; SOUZA, 2015). Tal característica, associada ao fato da ausência de grupos facilmente oxidáveis (grupos fenólicos ou anilínicos livres) fizeram-nos suspeitar que esta molécula poderia ser usada como sonda seletiva para a detecção da atividade halogenante da enzima MPO.

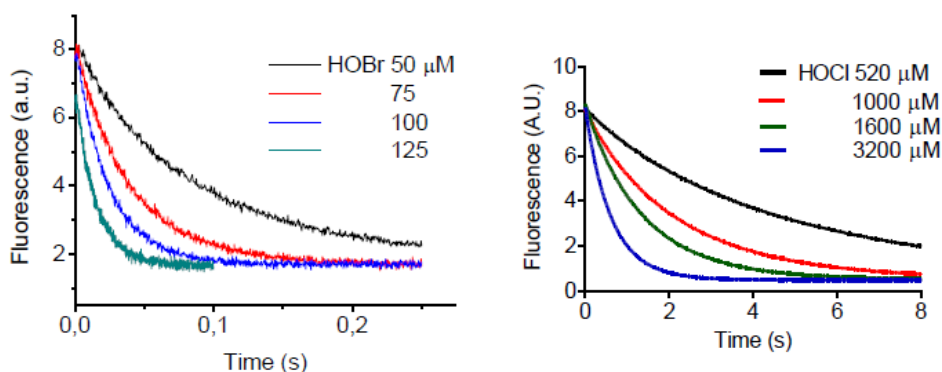


Figura 18. Reatividade do HOBr e do HOCl com a dansilglicina.

Adaptado de XIMENES; MORGON; SOUZA, 2015.

Encontrada principalmente nos neutrófilos, a enzima MPO é capaz de catalisar a produção de HOCl e o HOBr a partir da oxidação dos íons Cl^- e Br^- respectivamente. No plasma sanguíneo a concentração de íons Cl^- (100-140 mM) é significativamente superior a concentração de íons Br^- (2-100 μM) e por isso, nos processos inflamatórios a produção de

HOCl passa a ser mais relevante do que a produção de HOBr (FURTMÜLLER; BURNER; OBINGER, 1998 e FURTMÜLLER et al., 2000b). No entanto, como demonstrado acima (Figura 18), HOBr é significativamente mais reativo que HOCl, o que também o torna importante no contexto biológico como pode ser exemplificado pelos trabalhos que mostram a formação de bromotirosina (WU et al., 1999 e SENTHILMOHAN; KETTLE, 2006), que é o produto formado pela reação entre tirosina e HOBr. Vale lembrar que além da formação direta via ação catalítica das enzimas MPO e EPO, o HOBr pode ser também produzido pela reação não enzimática entre HOCl e Br⁻ (Equações 4,5,6 e 7).



Tendo como ponto de partida estes dados da literatura, inicialmente estudamos o efeito da adição de íons Br⁻ na reação entre a DG e o HOCl. Neste sentido, para evitar a formação prévia de HOBr durante o experimento e poder observar o efeito de Br⁻ sob a velocidade da reação, o experimento foi planejado de modo que em uma das seringas de injeção do equipamento (*Stopped Flow*) foi adicionado DG e Br⁻ e na outra HOCl. Desse modo, a reação se iniciaria no exato momento de medida, não havendo formação prévia de HOBr. Objetivando ainda se aproximar de condições fisiológicas, para o meio reacional foi utilizado solução tampão fosfato-salino, PBS, (pH = 7,4) que possui íons Cl⁻ na concentração próxima à encontrada no plasma sanguíneo, ou seja, 140 mM. Utilizamos ainda 100 µM de HOCl, concentração próxima aos valores produzidos por neutrófilos ativados (ZHANG et al., 2003).

Inicialmente buscou-se encontrar o melhor tempo para monitoramento da reação entre DG e HOCl. Mantendo as concentrações de DG (50,0 μM) e HOCl (100 μM) fixas, e o tempo total de 10, 20 e 40 s, mediu-se o tempo de decaimento da fluorescência da DG (Figuras 19A, 19B e 19C). Como pode ser observado, 40 s foi suficiente para completar a reação. Na sequência, estudamos o efeito da adição de Br^- (100 μM) nesta reação e verificamos um aumento expressivo na velocidade, sendo necessário menos de 2 segundos para observar a queda completa da intensidade de fluorescência (Figura 19D).

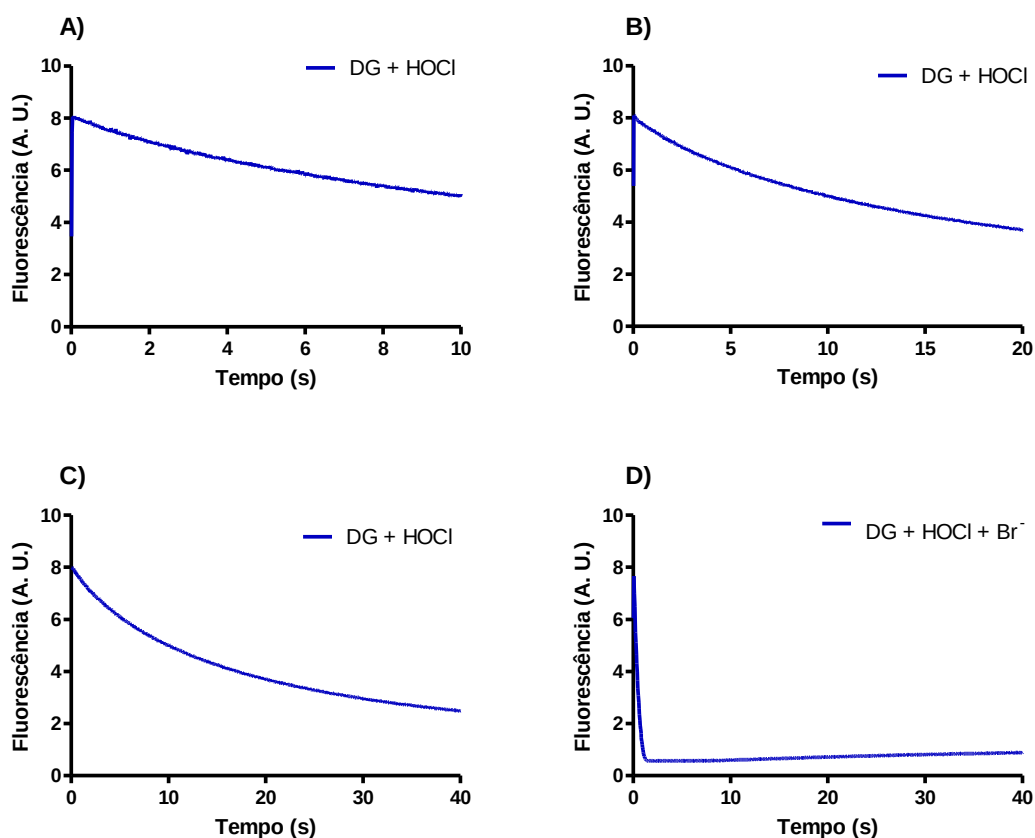


Figura 19. Reações entre a Dansilglicina e o HOCl na ausência e na presença de Br^- utilizando o stoppe-flow.

(A) 10 segundos de análise. (B) 20 segundos de análise. (C) 40 segundos de análise. (D) 40 segundos de análise na presença de Br^- . DG 50 μM , HOCl 100 μM e Br^- 100 μM , em PBS.

Mantendo o tempo de análise em 4 segundos, observou-se que era possível verificar a queda completa da intensidade da fluorescência na presença de Br^- . Por isso, este intervalo de tempo foi escolhido para realizar as demais análises. Os resultados apresentados na Figura 20 mostram o efeito da adição de Br^- (0-100 μM) na reação, mantendo fixas as concentrações de DG (50,0 μM) e HOCl (100 μM).

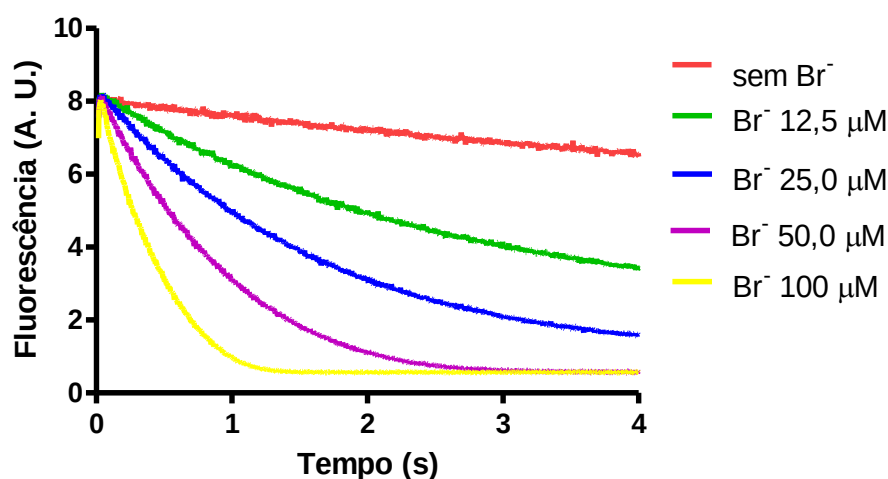


Figura 20. Brometo como co-catalisador da reação entre a dansilglicina e o HOCl utilizando o *stopped-flow*.
DG 50,0 μM , HOCl 100 μM e Br^- (0-100) μM em PBS.

Estes resultados indicam que, seja na presença de HOBr puro (XIMENES; MORGON; SOUZA, 2015), seja adicionando íons Br^- na presença de HOCl (Figura 20), a eficiência da reação com DG foi significativamente maior, efeito este que pode ser visualizado em experimentos de cinética rápida. Porém, o objetivo último desse projeto é desenvolver uma metodologia que possa ser aplicada em equipamentos convencionais em tempos maiores e adaptado para medida em leitores de microplacas. Para isso, repetiram-se os experimentos, mantendo as concentrações de DG (50,0 μM) e HOCl (100 μM) fixas e variando-se as

concentrações de Br^- (0,10-10,0 mM) utilizando o fluorímetro de microplacas. Os valores absolutos de fluorescência da DG obtidos no final dos 30 minutos estão representados no gráfico de barras, apresentado na Figura 21.

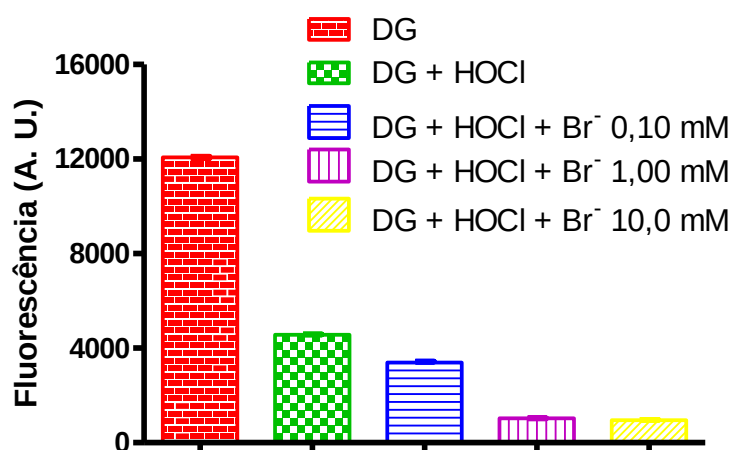


Figura 21. Brometo como co-catalisador nas reações entre a dansilglicina e o HOCl utilizando o fluorímetro de microplacas.

DG 50,0 μM , HOCl 100 μM e Br^- (0,10-10,0) mM em PBS, 30 minutos de incubação.

Os valores absolutos de fluorescência mostram que a adição de íons Br^- aumenta a eficiência de consumo de DG, uma vez que, a mesma perdeu a sua fluorescência intrínseca, da mesma maneira que foi observado quando foi utilizado medidas em intervalos de tempos curtos. Verificamos também que nas condições de análise, Br^- 1,00 mM e 10,0 mM apresentaram resultados próximos quando comparado ao valor absoluto da fluorescência. Por esta razão, adotamos Br^- 1,00 mM nas análises posteriores com HOCl puro. Além disso, concluímos que o tempo de 30 minutos de incubação é suficiente para que se complete a reação entre DG, Br^- e HOCl.

5.2 – Estudos Cromatográficos

Inicialmente buscamos uma metodologia cromatográfica (HPLC) para a análise de DG, porém nenhum registro específico para essa molécula foi encontrado. Takeuchi (2005) relatou um estudo utilizando HPLC para aminoácidos como derivados dansilados, porém não exclusivo para a DG. Baseado em seu artigo, procuramos desenvolver uma metodologia específica para a DG, pois estudos com HPLC podem auxiliar na compreensão do mecanismo da reação em estudo.

As condições cromatográficas determinadas para esse novo método foram: coluna de fase reversa C18, detector PDA é ajustado em 254 nm, sensor de fluorescência em $\lambda_{\text{ex}} = 335$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 522$ nm, fluxo é de 1 mL/min e injeções de 20 μL . A fase móvel foi constituída por acetato de amônia 10 mM, pH=7,2 e acetonitrila em um sistema de gradiente que inicialmente possui a proporção de 75:25 (%v/v) e aos 10 minutos altera a sua proporção para 65:35 (% v/v) permanecendo constante até os 25 minutos em que a condição inicial de análise é reestabelecida até o tempo final de 30 minutos.

A Figura 22 apresenta o cromatograma obtido para uma reação, ou seja, DG (50,0 μM), Br^- (10,0 mM) e HOCl (100 μM) presentes no meio reacional e para o padrão (somente DG 50,0 μM). A DG apresentou tempo de retenção de 6,7 minutos, e os possíveis produtos da reação entre ela e o Br^- e o HOCl exibiram tempos de retenção de 8,3 e 15,3 minutos.

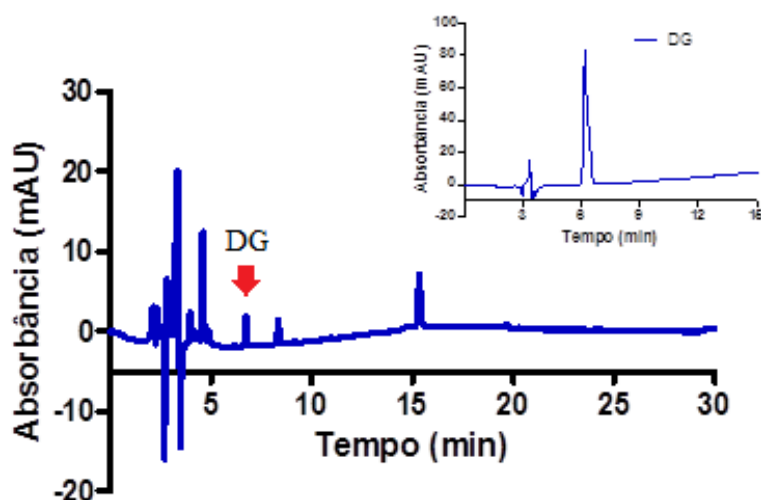


Figura 22. Análise do HPLC da reação entre a DG, Br⁻ e HOCl. Figura insertada: DG.

Fase móvel: Início acetato de amônia 40 mM, pH=7,2 e a acetonitrila 75:25 (%V/V). Aos 10 minutos de análise a proporção passou a ser 65:35 (%V/V) e permanecendo constante até os 25 minutos, em que a proporção retornava à condição inicial. DG 50,0 µM, Br⁻ 1,00 mM e HOCl 100 µM em PBS.

Utilizando as condições cromatográficas determinadas anteriormente e o sensor de fluorescência do HPLC, foi possível obter os cromatogramas relativos a sonda fluorescente quando foram mantidas fixas as concentrações de DG (50,0 µM), Br⁻ (1,00 mM) e diferentes concentrações de HOCl (25,0-100 µM) como apresentado na Figura 23.

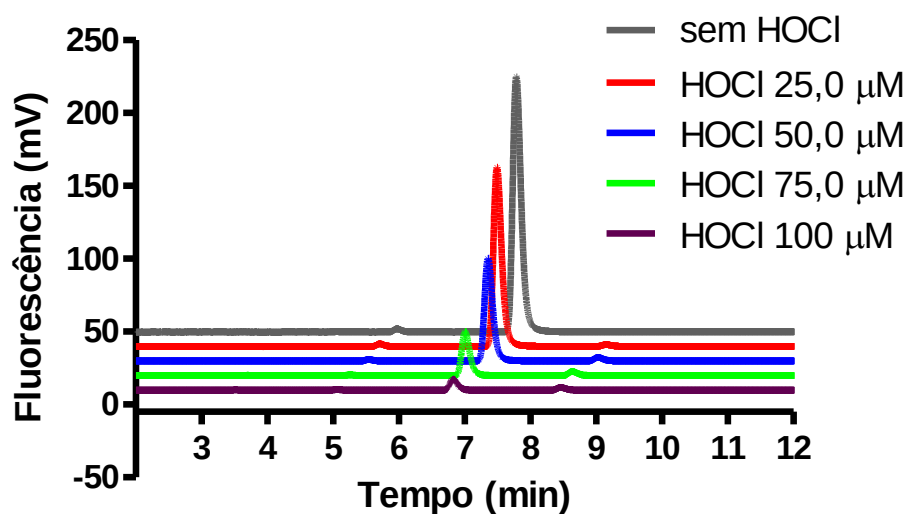


Figura 23. Análise de HPLC da reação entre a DG, o Br⁻ e o HOCl em diferentes concentrações. Fase móvel: Início acetato de amônia 40,0 mM, pH=7,2 e a acetonitrila 75:25 (%V/V). Aos 10 minutos de análise a proporção passou a ser 65:35 (%V/V) e permanecendo constante até os 25 minutos, em que a proporção retornava à condição inicial. DG 50,0 μM, Br⁻ 1,00 mM e HOCl (25,0-100) μM.

A partir dos valores relativos a área sob cada pico apresentado no cromatograma da Figura 23, foi possível obter uma relação linear em função da concentração de HOCl (Figura 24). Em resumo, utilizando a técnica cromatográfica desenvolvida podemos mensurar de forma eficiente a concentração de DG consumida em função da concentração de HOCl.

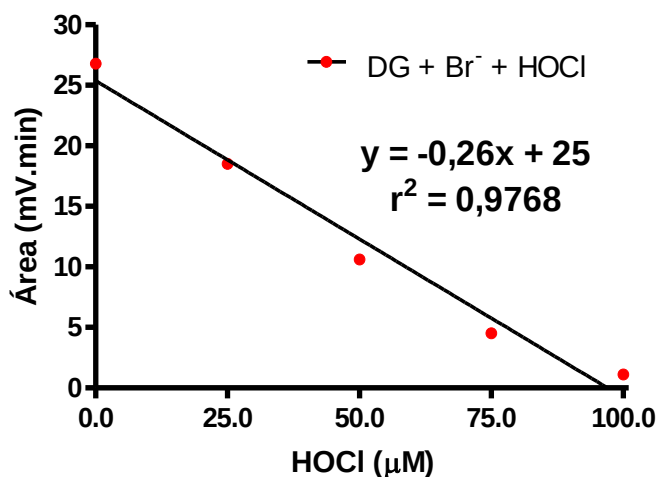


Figura 24. Curva analítica do HOCl obtida por meio do HPLC.
 DG 50,0 μM, Br⁻ 1,00 mM e HOCl (25,0-100) μM em PBS.

5.3 – Estudo da reação por fluorimetria

Os estudos cromatográficos mostraram que a intensidade de fluorescência da sonda DG varia conforme a concentração de HOCl é alterada. Um estudo semelhante foi realizado medindo diretamente a fluorescência da solução, que será a técnica central proposta para ser usada na metodologia de determinação da atividade halogenante da MPO com a DG. A Figura 25A mostra os espectros de fluorescência da sonda e seu decaimento ao reagir com Br⁻ e HOCl em diferentes concentrações. A Figura 25B apresenta a correlação linear obtida a partir dos valores máximos de fluorescência (λ_{ex} em 340 nm, λ_{em} em 575 nm) em função da concentração de HOCl.

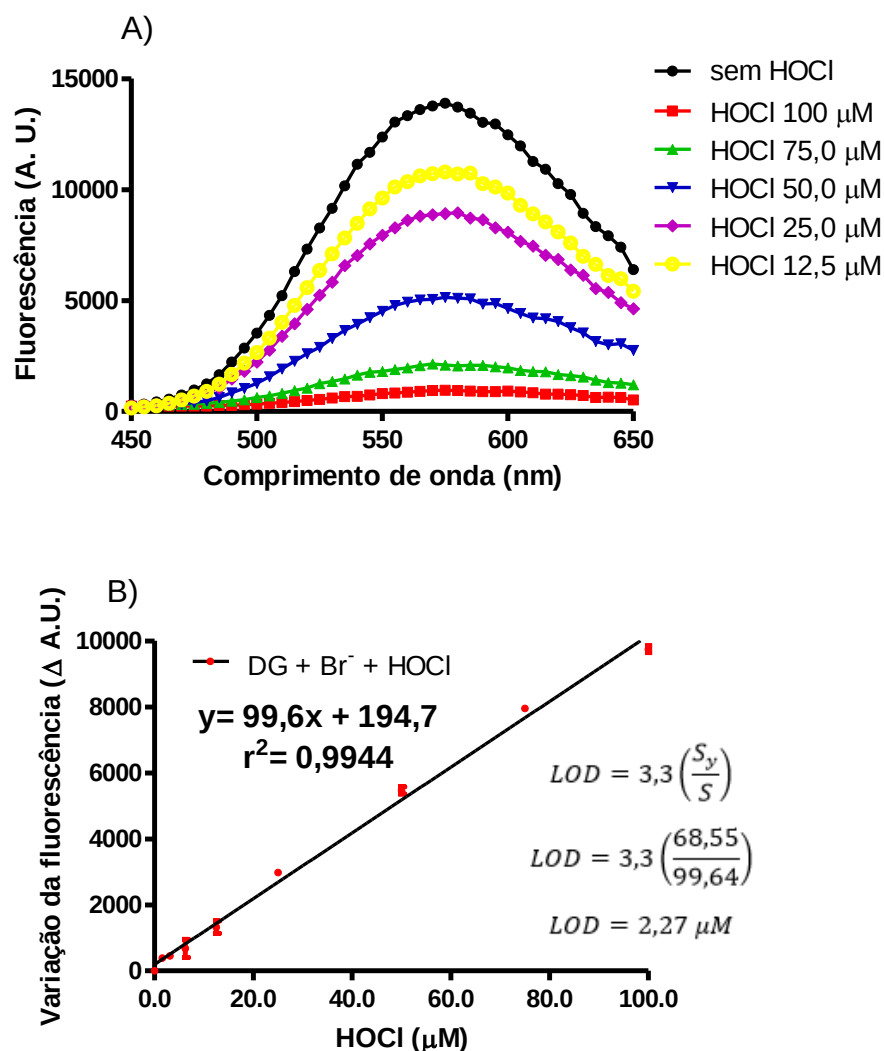


Figura 25. Curva analítica de HOCl obtida pelo fluorímetro.

(A) Espectros de fluorescência da dansilglicina. (B) Curva analítica. DG 50,0 μM , Br^- 1,00 mM e HOCl (12,5-100) μM , em PBS. Excitação em 340 nm, Emissão em 575 nm, 30 minutos de incubação.

A curva analítica obtida e apresentada na Figura 25B é semelhante a obtida quando foi utilizado o HPLC (Figura 24). Da mesma forma que registrado anteriormente, a fluorescência da sonda DG respondeu de forma linear quando foi adicionado diferentes concentrações de HOCl, apresentando um limite de detecção de 2,27 μM .

Utilizando a mesma metodologia e equipamento, realizamos estudos para avaliar se medidas de absorbância também poderiam ser utilizadas para avaliar o consumo de DG. As

condições experimentais foram DG (50,0 μ M), Br^- (1,00 mM) e HOCl (50,0 ou 100 μ M) (Figura 26). Como pode ser analisado, mesmo usando 100 μ M de HOCl não se observa uma queda expressiva do DG, o que pode indicar que o produto da reação possui banda de absorção próxima ao DG. Isso pode ser confirmado quando comparamos os espectros dos picos isolados no HPLC (Figura 27). Em resumo, monitorar a absorbância do DG não parece ser ideal como base da metodologia analítica em desenvolvimento.

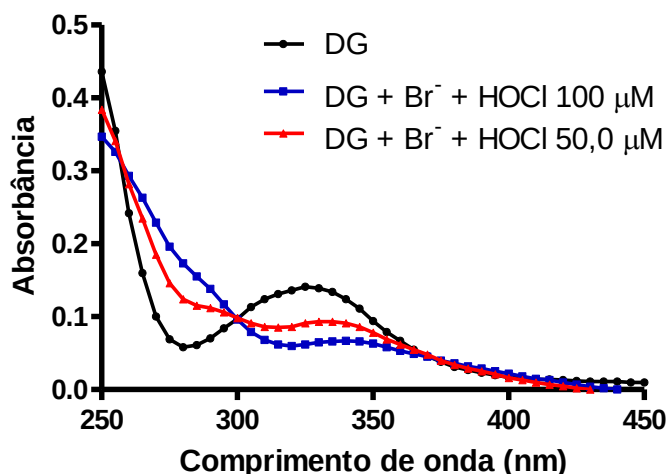


Figura 26. Espectros de absorbância da DG em diferentes condições de reacionais.
DG 50,0 μ M, Br^- 1,00 mM e HOCl 100 e 50,0 μ M em PBS

5.4 – Identificação dos produtos da reação utilizando Cromatografia líquida de alta eficiência/Espectroscopia de massa (HPLC-MS)

Os estudos realizados utilizando o HPLC identificaram dois picos com tempos de retenção maiores que a DG que possivelmente são moléculas que representam os produtos da reação (Figura 22). Desta forma, inicialmente denominamos o composto com tempo de retenção de 8,3 minutos de Produto 1, e o composto com tempo de retenção de 15,3 minutos

de Produto 2. Os diferentes tempos de retenção e os espectros de UV obtidos pelo HPLC (Figura 27) auxiliaram na confirmação de que se tratavam de produtos distintos.

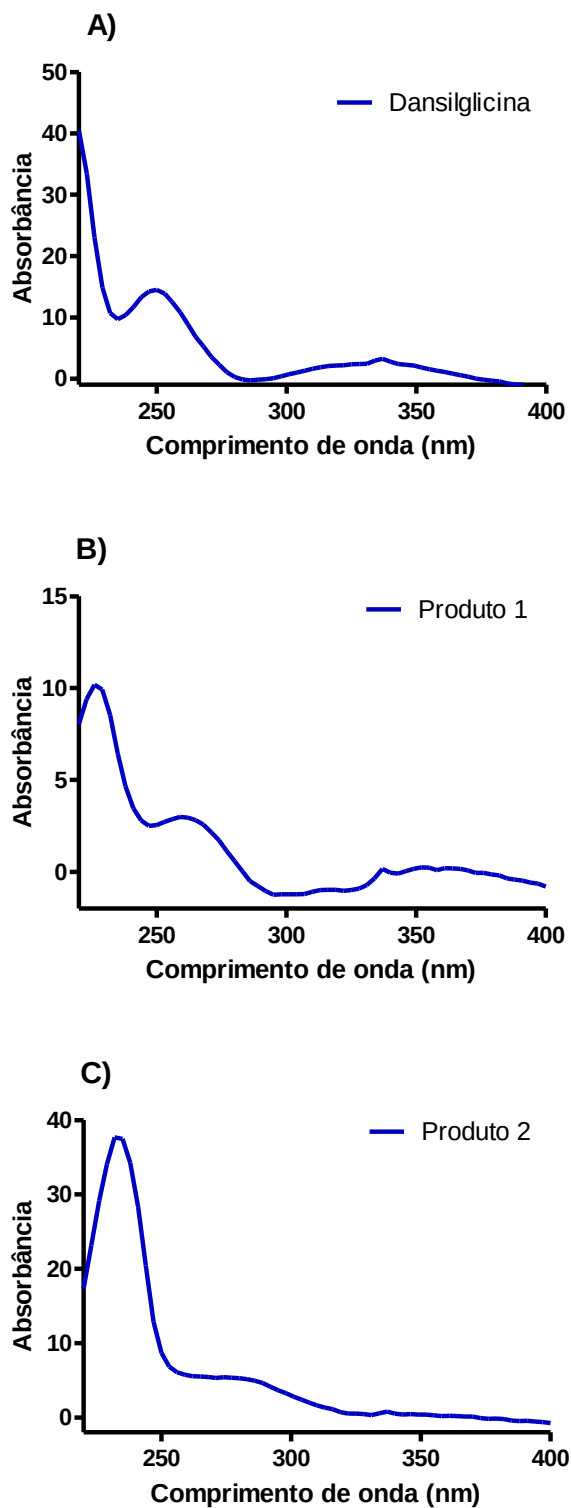


Figura 27. Espectros de absorbância para a DG, Produto 1 e Produto 2 obtidos no HPLC. (A) DG, (B) Produto 1 e (C) Produto 2. DG 50,0 μ M, Br⁻ 1,00 mM e HOCl 100 μ M em PBS

Considerando que quanto maior o tempo de retenção de uma molécula, quando analisada em coluna C18, maior a sua hidrofobicidade (CUNICO; GOODING; WEHR, 1998); e a análise das curvas de correlação obtidas tanto por cromatografia como por fluorimetria mostraram uma relação de 2:1 HOCl:DG, fizeram nos considerar que os possíveis produtos da reação fossem formas mono e di-halogenada de DG, o que explicaria a relação estequiométrica observada e a maior hidrofobicidade. Vale ressaltar que a relação com hidrofobicidade destacada acima ocorre devido a potencial presença de halogênios nos produtos. Estudamos essa hipótese utilizando o software ChemDraw Ultra® 7.0. Por meio dele é possível obter os valores de log P das estruturas, em que P é o coeficiente de partição octanol-água. Sabendo-se que quanto maior o valor de log P, mais hidrofóbica é uma molécula (GHOSH; CRIPPEN, 1987), foi possível verificar se os produtos mono- e di-substituídos poderiam estar relacionados aos Produto 1 e ao Produto 2. A Figura 28 apresenta a estrutura da DG e das demais estruturas mono- e di-substituídas com Cl⁻ e/ou Br⁻, com os respectivos valores de log P, mostrando que qualquer uma das estruturas podem ser os compostos relativos aos produtos.

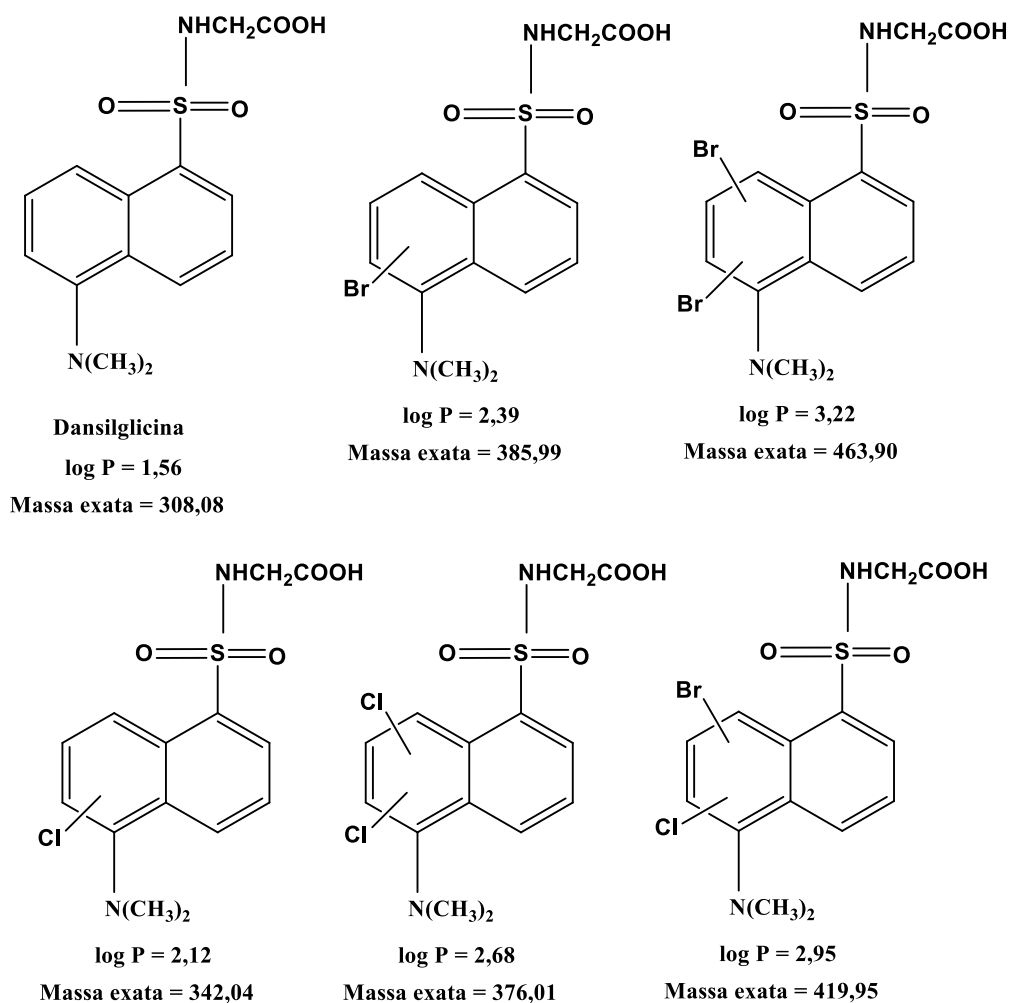


Figura 28. Estrutura da DG e dos possíveis produtos da reação, com os valores de log P e a massa exata.

Assim, a fim de comprovar a nossa hipótese recorreremos à análise dos produtos por espectrometria de massa. O equipamento determina o valor da massa exata da molécula referente ao pico obtido no cromatograma, ou seja, as massas precisas foram calculadas utilizando a massa do isótopo mais comum de cada elemento, e as diferenças entre os valores calculados e as massas obtidas aparecerão na segunda e na terceira casa decimal (PAVIA et al., 2010). As análises no espectrômetro de massas foram realizadas nos modos positivo e no negativo, e as análises de HPLC foram realizadas utilizando a metodologia desenvolvida

anteriormente. Os melhores resultados foram obtidos no modo negativo. Primeiramente, foi obtido o espectro de massas da DG apresentado na Figura 29.

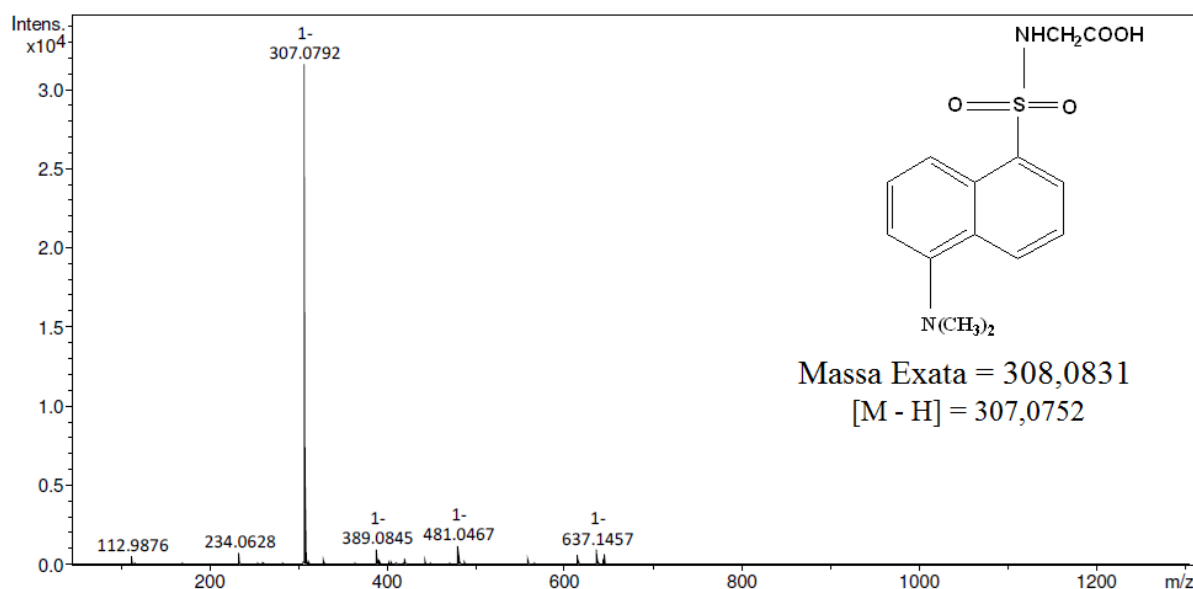


Figura 29. Espectro de massas da dansilglicina.

DG 50,0 μ M em PBS, incubada por 30 minutos à temperatura ambiente.

Posteriormente, foi realizada a reação entre a DG (50,0 μ M), Br⁻ (1,00 mM) e HOCl (100 μ M) e analisada utilizando o HPLC-MS. A Figura 30 ilustra o espectro de massa do produto identificado, o qual corresponde ao composto mono-substituído com bromo. Infelizmente, até o momento não conseguimos identificar o segundo pico, que supomos ser a forma di-halogenada.

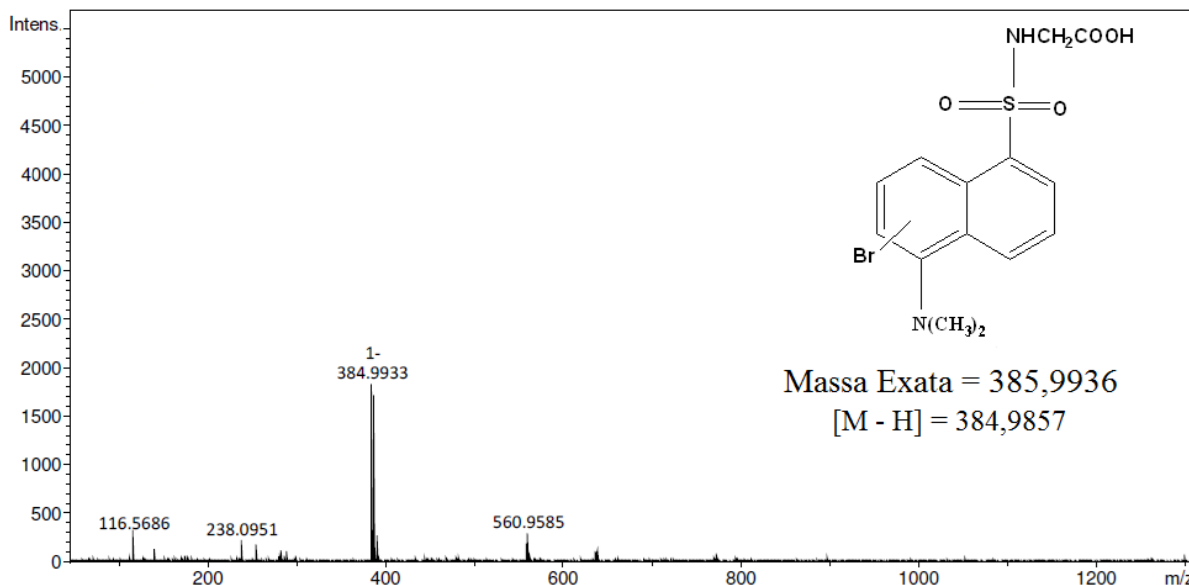


Figura 30. Espectro de massas do produto bromo-substituído (Produto 1).

DG 50,0 μM , Br^- 1,00 mM e HOCl 100 μM em PBS, incubado por 30 minutos à temperatura ambiente.

Como demonstramos anteriormente, a adição de Br^- aumenta a velocidade da reação, mas a reação entre a DG e o HOCl também ocorre sem a presença de Br^- , porém em uma velocidade muito menor e com menor eficiência de consumo de DG. Desta forma, utilizando o HPLC acoplado a espectroscopia de massas, determinou-se também o produto formado quando a reação entre DG e HOCl ocorre na ausência de Br^- . O espectro de massas obtido para o produto está ilustrado na Figura 31 e coincide com o produto mono-substituído por cloro.

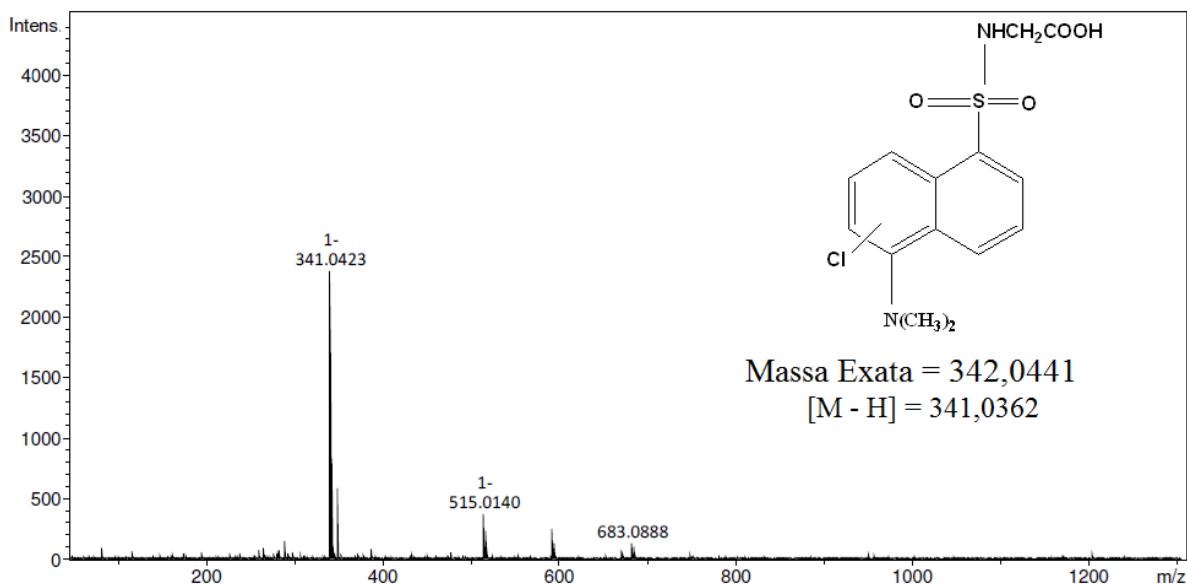
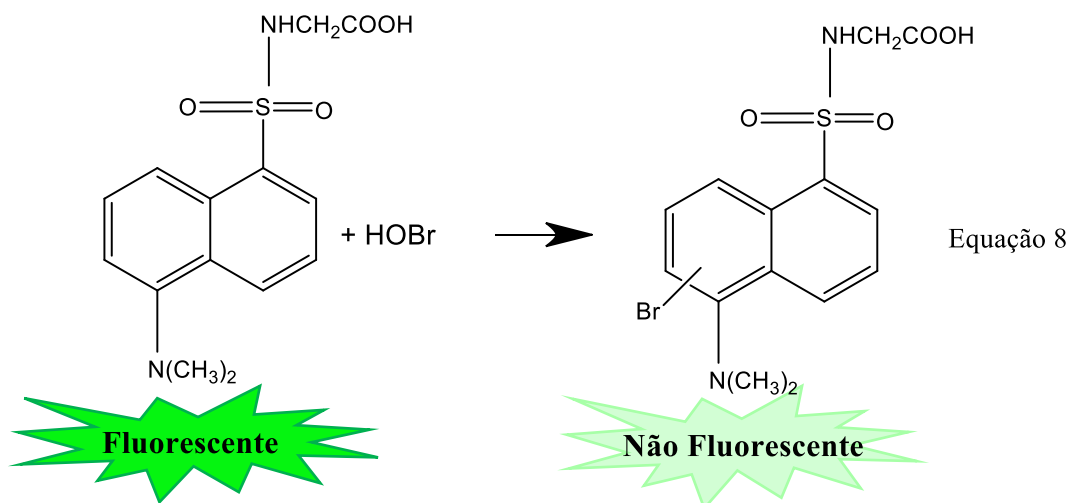


Figura 31. Espectro de massas do produto cloro-substituído.

DG 50,0 μ M e HOCl 100 μ M em PBS, incubado por 30 minutos à temperatura ambiente.

Os espectros de massa mostraram que quando a reação entre a DG e o HOCl ocorre na presença de Br^- , acontece a substituição eletrofílica com bromo. Neste caso, provavelmente acontece a formação do HOBr, que por apresentar um caráter eletrofílico maior que o HOCl (XIMENES; MORGON; SOUZA, 2015), reage mais facilmente, aumentando a eficiência da reação. Estes achados, ou seja, a identificação do produto monobromado e a queda de fluorescência que acompanha a reação, nos permite propor que o HOBr formado por meio das Equações 4, 5, 6 e 7 reage com a DG (Equação 8) formando o produto monosubstituído.



Essa hipótese pôde ser confirmada, visto que, na ausência de Br^- , o produto encontrado é o monosubstituído com cloro. Desta forma, a utilização do HPLC-MS foi útil na identificação do produto não-fluorescente da reação entre a DG, Br^- e HOCl.

5.5 – Estudo da influência do Br^- na velocidade de reação com MPO

Nos estudos realizados até aqui, o HOCl era adicionado ao meio reacional. Porém no meio biológico, o HOCl será produzido a partir da ação catalítica da MPO. Portanto, dando sequência ao desenvolvimento do método, iniciamos os estudos sobre a influência do Br^- quando o HOCl é produzido via MPO/ H_2O_2 . Nesses testes o tampão PBS será utilizado como fonte de Cl^- .

Antes de iniciarmos a apresentação dos resultados obtidos com MPO, vale ressaltar algumas características dessa enzima e do método mais utilizados para detecção de sua atividade halogenante. Uma das dificuldades em determinar a atividade halogenante da MPO é que o HOCl produzido precisa ser capturado por um substrato que possua alguma característica capaz de sofrer alguma mudança como alterações de absorbância, de fluorescência ou de quimiluminescência. Além disso, esse substrato não pode ser oxidado pela MPO pelo mecanismo peroxidásico, senão o resultado obtido estará superestimado.

A metodologia utilizando a taurina e o TMB é mais empregada atualmente para a determinação da atividade halogenante da MPO. A taurina captura o HOCl formando a taurina cloramina que é um composto estável. Na presença de iodeto, a taurina cloramina é capaz de oxidar o TMB, formando um composto de cor azul. Assim, a variação da absorbância do TMB é o parâmetro utilizado para quantificar o mecanismo halogenante da MPO (DYBUKT *et al.*, 2005 e KETTLE *et al.*, 2014). Porém, essa metodologia tem que ser

realizada em duas etapas, pois a MPO é capaz de oxidar o TMB via seu mecanismo peroxidásico, ou seja, o método de determinação da atividade halogenante da MPO utilizando a taurina e o TMB é um método indireto.

Como discutido no parágrafo anterior uma das características da MPO é a sua capacidade de catalisar a oxidação de inúmeros substratos, particularmente aqueles que possuem grupos fenólicos e anilínicos livres via ação peroxidásica. Neste contexto, a escolha de DG como possível substrato para ação específica da atividade halogenante tem como base o fato de não possuir estes grupos, mas ser susceptível a ação eletrofílica do HOCl/HOBr. Assim, nossos passos foram no sentido de avaliar se estas hipóteses se confirmariam.

Inicialmente estudamos a influência do Br^- na velocidade da reação entre DG, mantendo fixa as concentrações de H_2O_2 e MPO. Pelos experimentos realizados anteriormente utilizando HOCl diretamente, observou-se um aumento na eficiência da reação em função da concentração de Br^- (Figura 21). Utilizando o sistema enzimático como fonte de HOCl, o mesmo comportamento foi observado, no entanto, a reação foi mais lenta, visto que um passo reacional foi adicionado ao sistema, ou seja, a formação do HOCl. A Figura 32 mostra o gráfico obtido utilizando os valores de fluorescência no final de 30 minutos de reação, quando as concentrações de DG (50,0 μM), de MPO (20,0 nM) e de H_2O_2 (100 μM) foram mantidas fixas e as concentrações de Br^- (0-10,0 mM) foram variadas.

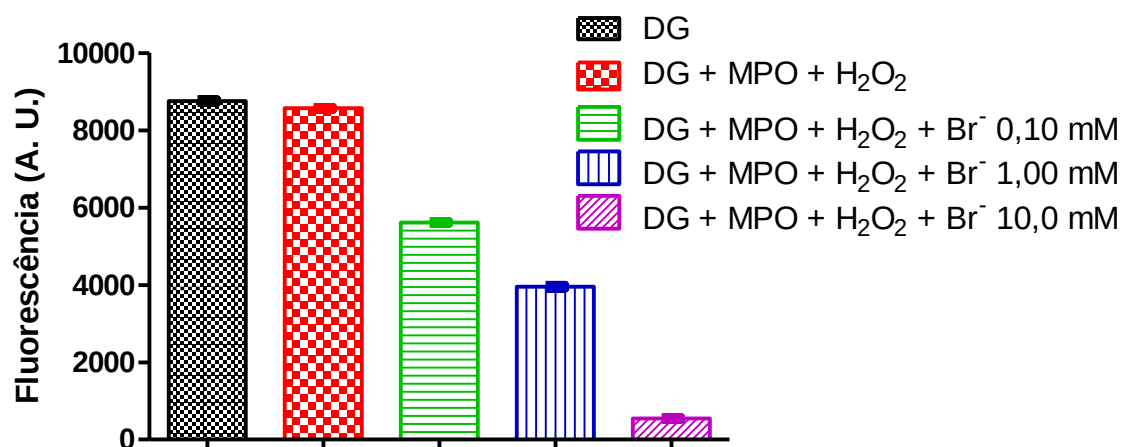


Figura 32. Estudo do Br⁻ como co-catalisador da reação entre a dansilglicina, a MPO e o H₂O₂ em PBS.

Dansilglicina 50,0 μM, MPO 20,0 nM, H₂O₂ 100 μM e Br⁻ (0-10,0) mM em PBS, à 37 °C por 30 minutos de incubação.

A diferença entre o valor absoluto da fluorescência no final dos 30 minutos de reação é grande quando comparado a presença e a ausência de Br⁻ (Figura 32). A adição de Br⁻ aumenta significativamente a velocidade de reação, sendo que à 10,0 mM, o decaimento completo da fluorescência é observado. Por este motivo, esta concentração de Br⁻ foi utilizada nos ensaios posteriores.

Vale ressaltar que utilizando MPO, o Br⁻ pode estar participando do processo de duas maneiras. Uma delas é a mesma descrita acima, ou seja, reagindo com HOCl e formando HOBr. Outra, não menos importante, é via a ação catalítica da MPO, que é capaz de catalisar não só a oxidação do Cl⁻ à HOCl, mas também do Br⁻ à HOBr (Equações 4, 5, 6 e 7) (BOZEMAN; LEARN; THOMAS, 1990).

Estudos mostram que em meio celular, mesmo sendo a concentração de Br⁻ cerca de 1000 vezes menor do que a de Cl⁻, cerca de 25 % do H₂O₂ utilizado pela MPO é para converter o Br⁻ à HOBr, e indicam que o Br⁻ é cerca de 470 vezes mais preferido como substrato para a MPO do que o Cl⁻ (SENTHILMOHAN; KETTLE, 2006). No ensaio em

desenvolvimento, essa diferença é bem menor (Cl^- 140 mM e Br^- 10 mM), o que nos faz supor que a geração de HOBr via ação enzimática da MPO é a principal rota de produção desse ácido (Equações 4 e 6).

5.6 – Estudo da variação de concentração de H_2O_2 na reação entre DG, MPO, e Br^-

Os estudos com diferentes concentrações de HOCl realizados anteriormente mostraram que a intensidade de fluorescência da DG decresce linearmente a medida que a concentração de HOCl aumenta (Figura 25B). Utilizando a enzima MPO como catalisadora da formação de HOCl em um meio com excesso de cloreto (tampão PBS), a concentração de H_2O_2 será determinante na quantidade de HOCl produzido. Deste modo, a Figura 33 apresenta a curva analítica que relaciona a perda da intensidade da sonda DG a medida que a concentração de H_2O_2 (12,5-100 μM) foi variada. Durante esse experimento as concentrações de DG (50,0 μM), de MPO (20,0 nM) e de Br^- (10,0 mM) permaneceram fixas.

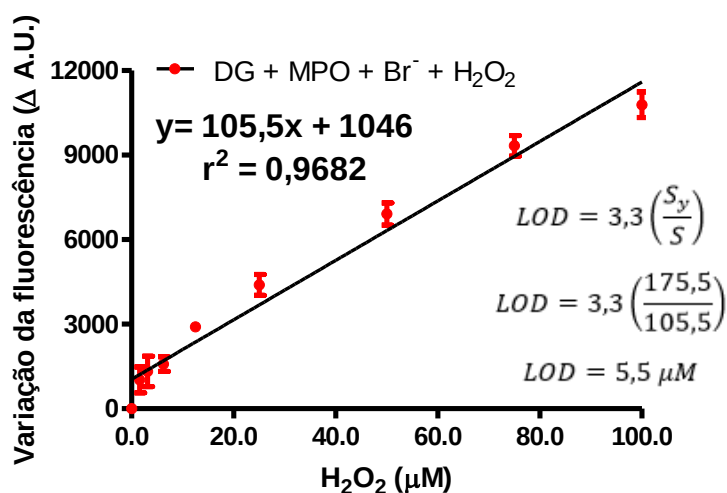


Figura 33. Curva analítica de H_2O_2 para a MPO.

DG 50,0 μM , MPO 20,0 nM, Br^- 10 mM e H_2O_2 (12,5-100) μM em PBS, 30 minutos de incubação à 37°C.

Como pode ser observado, assim como foi obtido para o HOCl puro e adicionado diretamente à DG (Figura 25B), o método em desenvolvimento responde perfeitamente a concentração de H_2O_2 , quando na presença da enzima (Figura 33), apresentando um limite de detecção de 5,5 μM .

5.7 – Aplicação da metodologia utilizando a taurina e o TMB na determinação da atividade halogenante da MPO

A metodologia que aplica a taurina e o TMB é a mais utilizada e bem aceita pela comunidade científica para medição da atividade halogenante da MPO (KETTLE *et al.*, 2014 e DYPBUKT *et al.*, 2005) e, por esta razão, utilizamos esse teste para verificar a produção do HOCl nas mesmas condições usadas na metodologia em desenvolvimento. Como descrito na

seção 4.4.9, este método baseia-se na geração de taurina cloramina pela reação entre taurina e HOCl, gerado via ação da MPO ou adicionado diretamente. Na sequência, a taurina cloramina é mensurada pela adição de TMB (Figura 10).

Primeiramente, foi determinada a curva analítica variando as concentrações de HOCl, da mesma forma como foi realizada quando a DG foi utilizada, e apresentada na Figura 34. Neste experimento foram mantidas fixas as concentrações de taurina (10,0 mM) e de TMB (14,0 mM) e as concentrações de HOCl foram variadas (0-100 μ M).

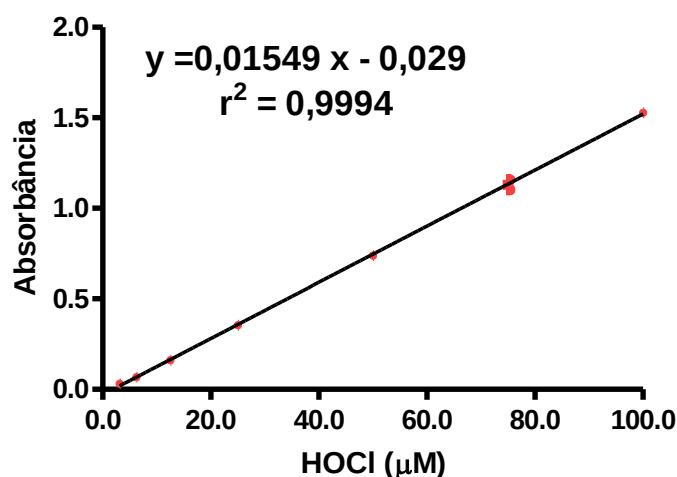


Figura 34. Curva analítica de HOCl utilizando a técnica da taurina /TMB.
Taurina 10,0 mM, TMB 14,0 mM e HOCl (0-100) μ M em solução tampão PBS/taurina.

A absorbância do TMB responde linearmente a adição de diferentes concentrações de HOCl, da mesma maneira como ocorreu quando foi utilizada à DG (Figura 25B). Na sequência, a curva analítica variando a concentração de H_2O_2 na presença de MPO foi determinada (Figura 35). Neste experimento as concentrações de taurina (10,0 mM), de MPO (20,0 nM) e de TMB (14,0 mM) foram mantidas fixas e a concentração de H_2O_2 foi variada (0-100 μ M).

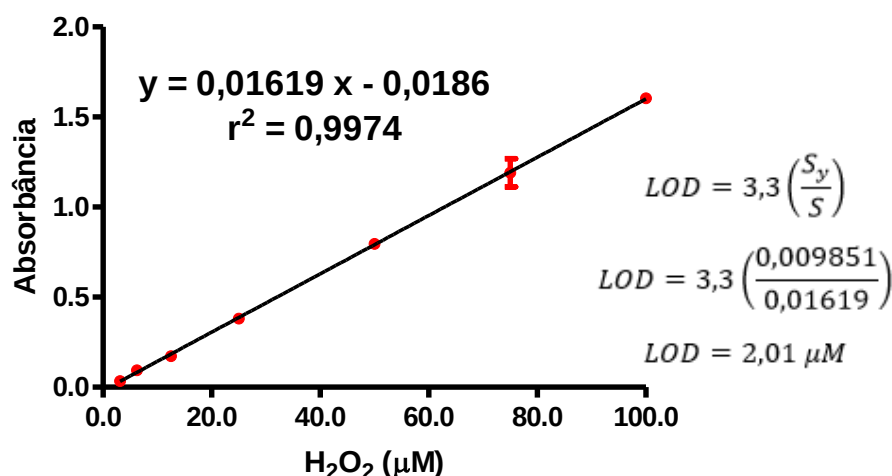


Figura 35. Curva analítica da metodologia utilizando a técnica da taurina/TMB.
Taurina 10,0 mM, TMB 14,0 mM e HOCl (0-100) μM em solução tampão PBS/taurina.

De forma semelhante ao observado para a DG, o método utilizando a taurina e o TMB responde linearmente a variação da concentração de H_2O_2 , sendo que para essa metodologia o limite de detecção foi inferior (2,01 μM) ao obtido para a metodologia da DG (5,5 μM) (Figura 35).

Os resultados mostraram que apesar de ser uma metodologia em duas etapas, a utilização da taurina/TMB é mais vantajosa comparada a metodologia em desenvolvimento, quando se confronta o limite de detecção do ensaio.

5.8 – Estudo cinético utilizando MPO

Para os estudos realizados anteriormente envolvendo a MPO, a concentração de enzima utilizada foi de 20,0 nM. A fim de analisar a influência da concentração da enzima no ensaio, realizamos estudos de cinética utilizando o fluorímetro para diferentes concentrações

de MPO. Nestes ensaios as concentrações de DG (50,0 μ M), Br⁻ (10,0 mM) e H₂O₂ (100 μ M) foram mantidas fixas e a concentração de MPO (4,00-20,0 nM) foi variada (Figura 36).

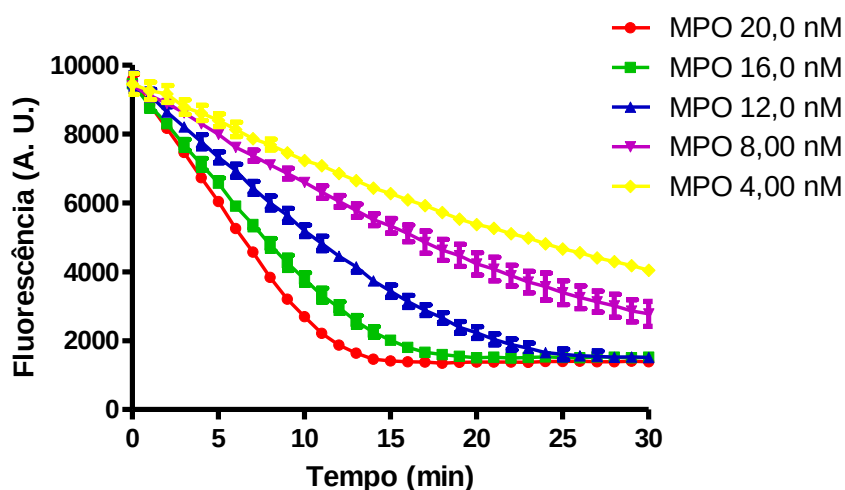


Figura 36. Estudo cinético para diferentes concentrações de MPO.

Dansilglicina 50,0 μ M, Br⁻ 10,0 mM, H₂O₂ 100 μ M e MPO (4,00-20,0) nM, em PBS, à 37 °C por 30 minutos.

A partir do gráfico obtido na Figura 36 foi possível calcular a velocidade relativa da reação, ou seja, variação de fluorescência por minuto. Vale notar que a medida foi realizada na parte linear do decaimento. O gráfico apresentado na Figura 37 foi construído a partir dos valores de velocidade relativa de reação e mostram uma ótima correlação entre a velocidade relativa de decaimento da fluorescência do DG e a concentração da MPO. Em resumo, estes resultados mostram que a metodologia em desenvolvimento tem potencial de aplicação não só para medir a produção de HOCl em uma concentração fixa de MPO, mas também para avaliar a atividade da enzima, quando as demais condições são fixadas.

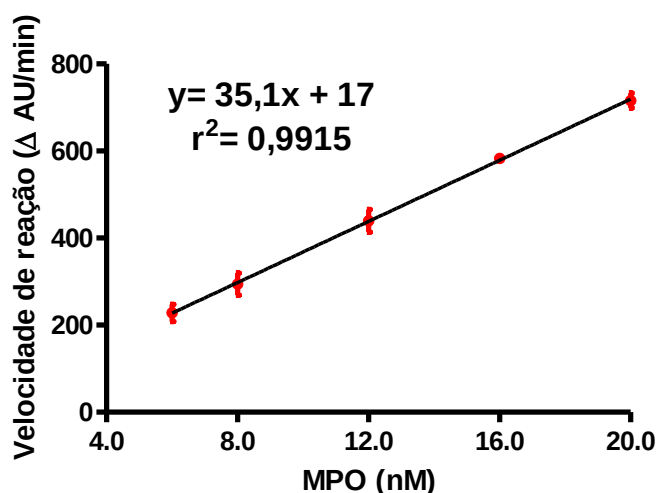


Figura 37. Velocidade de reação obtida a partir da variação da concentração de MPO.
 Dansilglicina 50,0 μ M, Br⁻ 10,0 mM, H₂O₂ 100 μ M e MPO (4,00-20,0) nM.

5.9 – Comparação da metodologia taurina/TMB com a metodologia da Dansilglicina

Por se tratar de um método direto, a metodologia da DG já apresenta uma vantagem sobre o método da taurina/TMB. Além disso, os experimentos realizados anteriormente mostraram que é possível determinar a atividade halogenante quando são utilizadas diferentes concentrações de MPO (seção 5.8), e, essa propriedade, não foi observada para a metodologia da taurina/TMB. Desta maneira, a fim de analisar e comparar a capacidade dos dois métodos de detectar a produção de HOCl, realizamos um experimento em que utilizamos uma concentração inferior de MPO (5,00 nM) comparada aos outros ensaios (20,0 nM) já realizados.

Estes ensaios foram realizados, tanto para a metodologia da taurina/TMB quanto para a metodologia da DG, utilizando condições reacionais semelhantes, ou seja, a concentração de MPO foi mantida fixa (5,00 nM), assim como as concentrações de taurina (10,0 mM) e TBM (14,0 mM) para a metodologia da taurina/TMB e as concentrações de DG (50,0 μ M) e Br⁻

(10,0 mM) para a metodologia da DG. A comparação entre as duas técnicas foram realizadas a partir da variação da concentração do H_2O_2 (0-100 μM) (Figura 38).

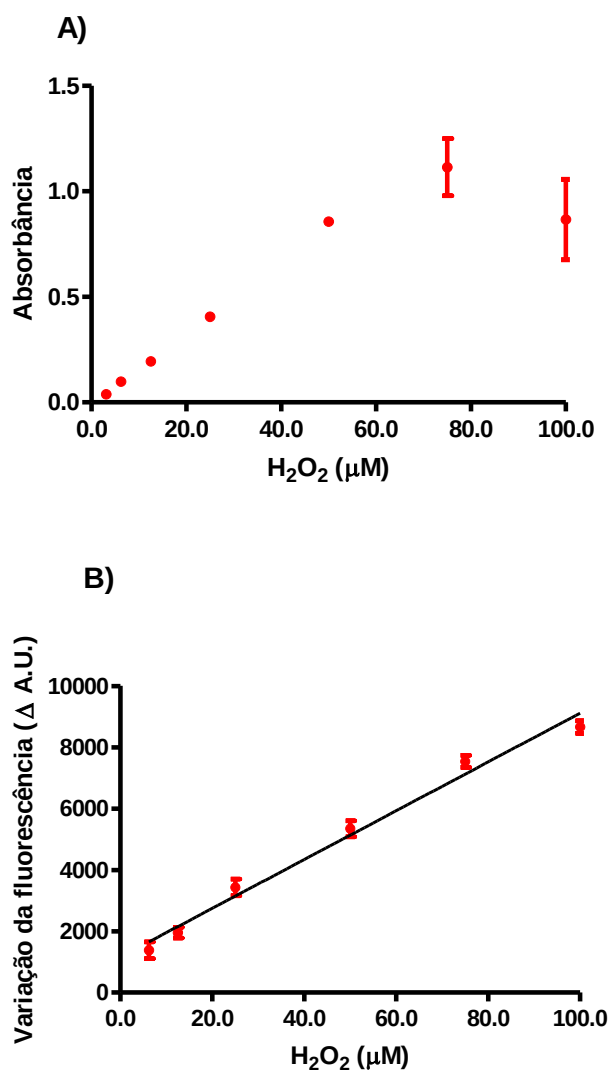


Figura 38. Comparação da metodologia da taurina/TMB com a metodologia da DG considerando a curva analítica de H_2O_2 .

(A) Metodologia da taurina/TMB. (B) Metodologia da DG. MPO 5,00 nM, taurina 10,0 mM, TMB 14,0 mM, DG 50,0 μM , Br⁻ 10,0 mM e H_2O_2 (0-100) μM . Incubados a 37°C por 30 minutos.

Os resultados apresentados na Figura 38A mostram que a metodologia da taurina/TMB não responde linearmente a variação da concentração de H_2O_2 quando a concentração de MPO é de 5,00 nM, diferentemente do observado para a metodologia da DG.

Por se tratar de uma metodologia em duas etapas, ou seja, primeiro acumular o HOCl na forma de taurina cloramina para que em uma segunda etapa ela seja relevada a partir da adição do TMB, pode ser uma das razões para a falta de linearidade observada para a metodologia da taurina/TMB. Isso acontece, porque, a taurina cloramina formada em grande quantidade (altas concentrações de H_2O_2) e acumulada no meio reacional, pode reagir e inativar a MPO, que por estar presente em menor concentração, afeta a capacidade de detecção do método, uma vez que será produzido menos HOCl, já que parte da enzima foi perdida. Desta maneira, a presença de duas etapas da metodologia da taurina/TMB, sinaliza uma tendência maior de degradação da MPO.

Os resultados utilizando a metodologia da DG (Figura 38B) mostram comportamento inverso se comparado a metodologia taurina/TMB (Figura 38A), respondendo linearmente a variação da concentração de H_2O_2 . Diferentemente da metodologia da taurina/TMB, a metodologia da DG por se tratar de um método direto, evita a acumulação de algum composto que seja capaz de degradar a MPO. Desta forma, mesmo em concentrações inferiores de enzima, é capaz de detectar o HOCl produzido.

Assim, esse experimento e os demais já realizados nos permite destacar vantagens da metodologia que utiliza a DG, dentre elas:

- Permite detectar diretamente a produção de HOCl a partir de medidas de cinética;
- Permite determinar a atividade halogenante em diferentes concentrações de MPO;
- Se mostra mais estável quanto a degradação da MPO pelo H_2O_2 ;
- Poderia ser aplicada em estudos *in situ*.

5.10 – Estudo da especificidade da metodologia

A utilização da DG como sonda para o monitoramento da atividade halogenante da MPO foi proposta visto que ela possui uma propriedade mensurável (decaimento de fluorescência), reage prontamente com HOCl/Br⁻ e não atuaria como substrato direto para a MPO. Em outras palavras, seria um substrato específico para a atividade halogenante da MPO. Neste sentido, nesta seção estudamos esta potencial especificidade, comparando a eficiência de consumo do DG na presença ou ausência de cada um dos componentes da reação.

Foram realizados testes em que cada um dos compostos do sistema, DG, MPO, Cl⁻, Br⁻ e H₂O₂, foram retirados. As análises foram realizadas utilizando dois diferentes valores de concentrações de H₂O₂ (Tabelas 1 e 2). Para o cálculo da eficiência relativa da reação, a condição controle foi estabelecida como DG 50,0 µM, MPO 20,0 nM, Br⁻ 10,0 mM e H₂O₂ 100 µM em tampão PBS (Cl⁻ 140 mM) e estão apresentados na Tabela 1. Os valores nas tabelas foram calculados a partir dos valores de fluorescência adquiridos, considerando que o máximo de fluorescência acontece quando no meio reacional está presente somente a DG.

Tabela 1. Consumo da DG utilizando diferentes condições reacionais para MPO e H₂O₂ 100 µM

Meio reacional	Concentração de DG consumida (µM)	Porcentagem de DG consumida (%)
DG	0	0
Sistema Completo*	45,9 ± 0,7	91,8 ± 1,4
Sem Br ⁻ **	2,90 ± 2,2	5,80 ± 4,4
Sem MPO **	3,00 ± 2,6	6,00 ± 5,2
Sem H ₂ O ₂ **	3,80 ± 2,6	7,60 ± 5,2

* DG 50,0 µM, MPO 20,0 nM, Br⁻ 10,0 mM e H₂O₂ 100 µM. Reação conduzida por 30 minutos em PBS.

** valor significativamente menor quando comparado ao Sistema Completo (p < 0,0001) (One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey).

A Tabela 1 mostra que a reação entre a DG, a MPO, o Br^- e o H_2O_2 em PBS só ocorreu com eficiência quando todos os componentes estão presentes no meio reacional, o que foi comprovado por meio dos valores baixos de consumo na ausência de cada um deles. Esses resultados foram confirmados quando a concentração do H_2O_2 foi reduzida à metade, ou seja, as análises mantinham as concentrações fixas de DG 50,0 μM , de MPO 20,0 nM, de Br^- 10,0 mM e de H_2O_2 50,0 μM (Tabela 2). Obviamente o consumo do sistema completo cai à metade, mas as proporções relativas na ausência dos componentes seguem a mesma tendência.

Tabela 2. Consumo da DG utilizando diferentes condições reacionais para a MPO e H_2O_2 50,0 μM .

Meio reacional	Concentração de DG consumida (μM)	Porcentagem de DG consumida (%)
DG	0	0
Sistema Completo*	$27,9 \pm 0,9$	$55,8 \pm 1,8$
Sem Br^- **	$0,70 \pm 0,3$	$1,40 \pm 0,6$
Sem MPO **	$0,90 \pm 0,1$	$1,80 \pm 0,1$
Sem H_2O_2 **	$1,70 \pm 0,8$	$3,40 \pm 1,6$

* DG 50,0 μM , MPO 20,0 nM, Br^- 10,0 mM e H_2O_2 50,0 μM . Reação conduzida por 30 minutos em PBS.

** valor significativamente menor quando comparado ao Sistema Completo ($p < 0,0001$) (One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey).

Em todas análises realizadas, o Cl^- estava presente no meio reacional, por meio da utilização do tampão PBS. Assim, o próximo passo foi remover o mesmo do meio, o que foi conseguido trocando o tampão PBS por tampão fosfato 10,0 mM, pH 7,5. Vale lembrar que PBS é também tampão fosfato 10,0 mM, mas acrescido de 140 mM NaCl. Os resultados

apresentados na Tabela 3 mostram que sem Cl^- , mas com Br^- , a reação ocorre normalmente, o que seria esperado, pois este último é substrato da MPO. Os valores das constantes de velocidade entre o Composto-I/ Cl^- $[(2,5 \pm 0,3) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$ e o Composto-I/ Br^- $[(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$ confirmam que a oxidação do Br^- catalisada pela MPO é mais favorável do que a oxidação do Cl^- (FURTMÜLLER; BURNER; OBINGER, 1998).

No entanto, sem a presença de Cl^- e Br^- nada ocorreu, e este é um dos pontos mais relevante do método, pois indica claramente que a DG não pode ser oxidada via atividade peroxidásica da MPO, o que comprova a especificidade desse substrato para a atividade halogenante na MPO.

Tabela 3. Consumo da DG na ausência de Cl^- e Br^- para a MPO e H_2O_2 100 μM .

Meio reacional	Concentração de DG consumida (μM)	Porcentagem de DG consumida (%)
DG	0	0
Sem Cl^-	$49,7 \pm 0,3$	$99,4 \pm 0,6$
Sem Cl^- e Sem Br^- *	$1,7 \pm 0,9$	$3,4 \pm 1,8$

Dansilglicina 50,0 μM , MPO 20,0 nM, Br^- 10,0 mM e H_2O_2 100 μM . Reação conduzida por 30 minutos em tampão fosfato 10,0 mM, pH=7,5.

* valor significativamente menor quando comparado ao meio reacional Sem Cl^- ($p < 0,0001$) (Teste t).

Da mesma maneira que foi realizado quando foi estudado a alteração na fluorescência da sonda na ausência de MPO ou Br^- ou H_2O_2 , a análise do consumo de DG na ausência dos íons Cl^- e/ou Br^- também foi realizada utilizando uma concentração diferente de H_2O_2 , ou seja, foram mantidas fixas as concentrações de DG 50,0 μM , de MPO 20,0 nM, de Br^- 10,0 mM e de H_2O_2 50,0 μM . Os resultados obtidos estão listados na Tabela 4.

Tabela 4. Consumo da DG na ausência de Cl^- e Br^- para a MPO e H_2O_2 50 μM .

Meio reacional	Concentração de DG consumida (μM)	Porcentagem de DG consumida (%)
DG	0	0
Sem Cl^-	$31,5 \pm 0,7$	$63 \pm 1,2$
Sem Cl^- e Sem Br^- *	$0,9 \pm 0,7$	$1,8 \pm 1,4$

Dansilglicina 50,0 μM , MPO 20,0 nM, Br^- 10,0 mM e H_2O_2 50,0 μM . Reação conduzida por 30 minutos em tampão fosfato 10,0 mM, pH=7,5.

* valor significativamente menor quando comparado ao meio reacional Sem Cl^- ($p < 0,0001$) (Teste t).

Os experimentos realizados até o momento comprovaram a especificidade na metodologia em desenvolvimento, uma vez que é necessário que todos os compostos do sistema (Cl^- , MPO, Br^- e H_2O_2) estejam presentes para que ocorra alteração na fluorescência da DG, ou seja, para que aconteça o mecanismo halogenante da MPO, que irá produzir HOCl e/ou HOBr capazes de reagir com a sonda. Outra maneira de comprovar a especificidade desse substrato para a atividade halogenante da MPO é trocando esta enzima por peroxidase de raiz forte (*horseradish peroxidase*, HRP), a qual não é capaz de oxidar haletos. Em outras palavras, trata-se de uma enzima que atua somente pelo mecanismo peroxidásico e isso ocorre devido ao seu baixo potencial redox, 0,883 V (JANTSCHKO *et al.*, 2005). Posteriormente, pretende-se utilizar a peroxidase de eosinófilos, EPO, que é da mesma classe que a MPO, e que em proporções menores consegue oxidar o Cl^- , além do Br^- (FURTMÜLLER *et al.*, 2000a). Desta forma, na primeira análise foram mantidas fixas as concentrações de DG 50,0 μM , de MPO ou HRP 20,0 nM, de Br^- 10,0 mM e de H_2O_2 100 μM e os resultados obtidos estão listados na Tabela 5.

Tabela 5. Consumo da DG na reação com HRP ou MPO e H₂O₂ 100 µM.

Meio reacional	Concentração de DG consumida (µM)	Porcentagem de DG consumida (%)
DG	0	0
Com MPO	47,0 ± 0,4	94 ± 0,8
Com HRP *	1,3 ± 1,2	2,6 ± 2,4

Dansilglicina 50 µM, de MPO ou HRP 20 nM, Br⁻ 10 mM e H₂O₂ 100 µM. Reação conduzida por 30 minutos em PBS.

* valor significativamente menor quando comparado ao meio reacional Com MPO (p < 0,0001) (Teste t).

Como pode ser observado, diferente da MPO, a HRP não foi capaz de promover o consumo do DG, mesmo na presença de Cl⁻ e Br⁻, visto que não é capaz de promover a formação de HOCl e/ou HOBr.

As análises foram repetidas utilizando o H₂O₂ na concentração de 50,0 µM, ou seja, foram mantidas fixas as concentrações de DG 50,0 µM, de MPO ou HRP 20,0 nM, de Br⁻ 10,0 mM e de H₂O₂ 50,0 µM e os resultados obtidos confirmam os anteriores e estão listados na Tabela 6.

Tabela 6. Consumo da DG na reação com HRP ou MPO e H₂O₂ 50,0 µM.

Meio reacional	Concentração de DG consumida (µM)	Porcentagem de DG consumida (%)
DG	0	0
Com MPO	29,3 ± 0,3	58,6 ± 0,6
Com HRP	1,7 ± 1,2	3,4 ± 2,4

Dansilglicina 50,0 µM, MPO ou HRP 20,0 nM, Br⁻ 10,0 mM e H₂O₂ 50 µM. Reação conduzida por 30 minutos em PBS.

* valor significativamente menor quando comparado ao meio reacional Com MPO (p < 0,0001) (Teste t).

Assim, todas as análises realizadas confirmaram a especificidade da metodologia ao utilizar a DG para o monitoramento direto da atividade halogenante da MPO.

5. 11 – Monitoramento do consumo de H₂O₂

A diminuição na intensidade de fluorescência da DG ocorre devido a sua reação com o HOCl e/ou HOBr e a formação de um produto não-fluorescente, como foi demonstrado anteriormente. Estes por sua vez são formados via ação catalítica da MPO utilizando como oxidante o H₂O₂. O monitoramento do consumo de H₂O₂ é uma maneira adicional de observar o mecanismo halogenante da MPO. Por isso, estudamos a reação entre DG, MPO, Br⁻ e H₂O₂ utilizando um detector eletroquímico que é capaz de monitorar de modo específico a variação da concentração de H₂O₂ com o tempo, por meio da reação de oxi-redução (Equação 9)



O primeiro passo foi nos assegurar que o detector respondia a presença de diferentes concentrações de H₂O₂. Isso foi confirmado quando adicionamos concentrações crescentes de H₂O₂ e obtivemos um aumento progressivo na corrente em microA. Na Figura 39, cada degrau corresponde à adição de 20,0 µM de H₂O₂. Outra evidência da resposta do eletrodo pôde ser observada quando foi adicionado a enzima catalase, a qual provocou imediato consumo de H₂O₂ e queda do sinal.

Assim, sabendo-se que uma determinada concentração de H₂O₂ corresponde a um determinado valor de corrente no detector eletroquímico, foi determinada uma curva de analítica variando-se a concentração de H₂O₂ (20,0-120 µM) e medindo as intensidades de corrente (Figura 40).

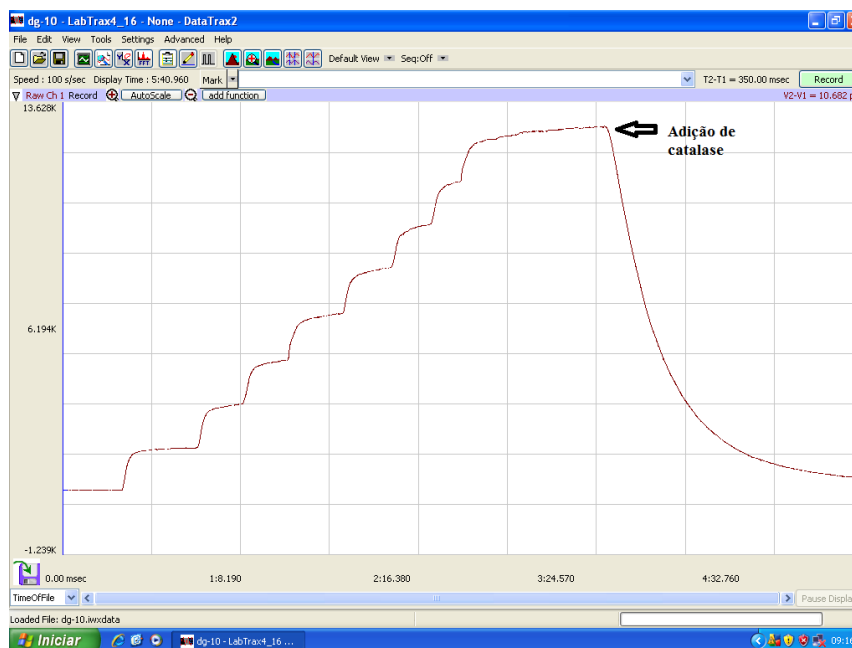


Figura 39. Coleta de dados no detector eletroquímico de H_2O_2 .

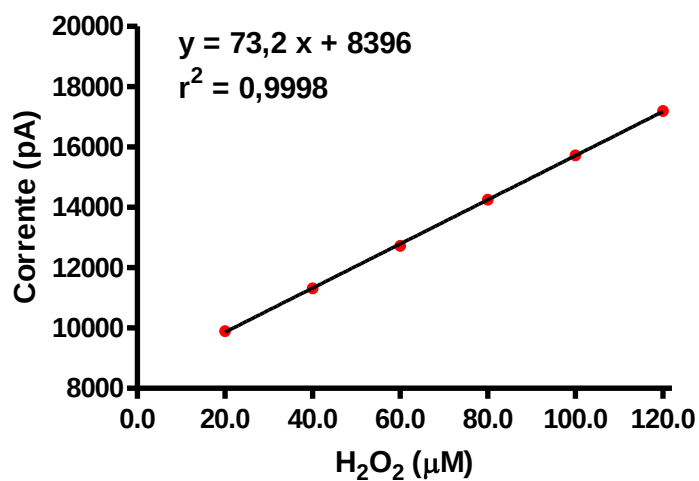


Figura 40. Curva analítica de H_2O_2 utilizando o detector eletroquímico de H_2O_2 . H_2O_2 (20,0-120) μM em PBS.

Primeiramente, analisamos o efeito da adição de Br^- , ou seja, a ausência de Br^- , comparado ao sistema completo. Durante as análises foram mantidas fixas as concentrações

de DG 50,0 μM , de MPO 20,0 nM, de Br^- 10,0 mM e de H_2O_2 100 μM . O gráfico obtido pelo detector correlaciona o valor da corrente com o tempo de reação e a partir dele e utilizando a equação da reta (Figura 40) é possível obter os valores de concentração de H_2O_2 durante a reação. Desta forma, a Figura 41A mostra a correlação entre os valores de corrente em função do tempo à medida que a reação procede. Já a Figura 41B correlaciona os valores de concentração de H_2O_2 com o tempo de reação.

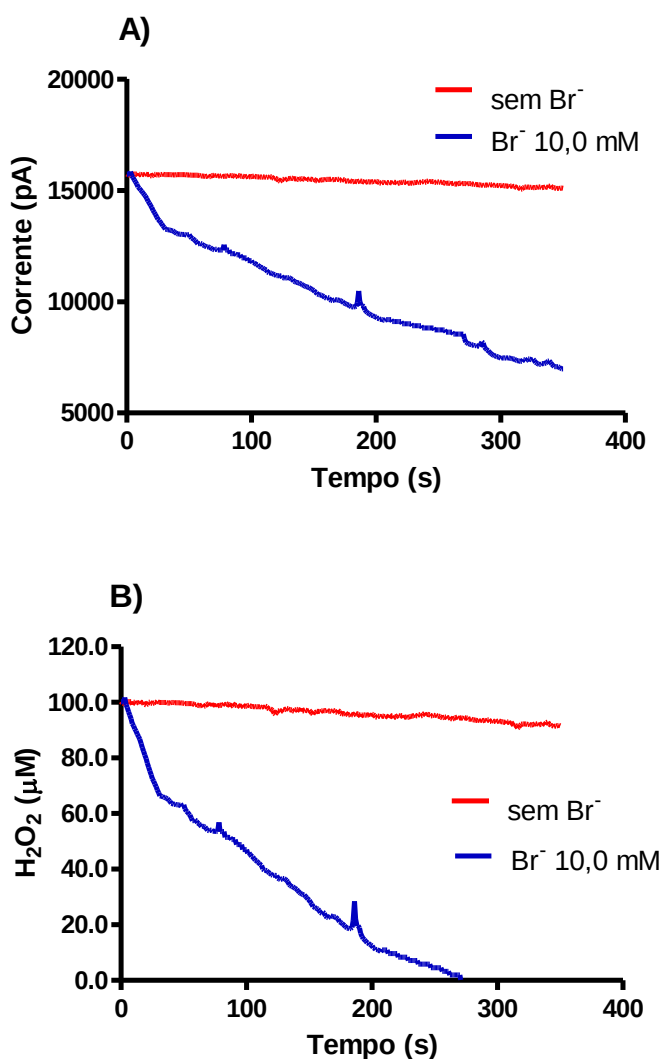


Figura 41. Análise no detector de H_2O_2 : ausência ou presença de Br^- .

(A) gráfico de corrente em função do tempo obtido diretamente do equipamento. (B) gráfico obtido a partir da curva analítica de H_2O_2 . DG 50,0 μM , MPO 20,0 nM, Br^- 10,0 mM e H_2O_2 100 μM em PBS.

O monitoramento do consumo de H_2O_2 mostrou que a presença de Br^- provocou um aumento significativo na velocidade da reação, o que pode ser comprovado pelo consumo rápido de H_2O_2 quando comparado ao obtido quando o meio reacional está ausente de Br^- . Isso comprova a ineficiência da MPO, mesmo na presença de Cl^- e H_2O_2 em oxidar a DG. Obviamente, HOCl está se formando, mas o mesmo não é suficientemente eletrofílico para reagir com DG. Assim, mais uma vez fica demonstrado o papel essencial do Br^- na metodologia.

O mesmo estudo foi realizado substituindo o tampão PBS pelo tampão fosfato. Durante as análises foram mantidas fixas as concentrações de DG 50,0 μM , de MPO 20,0 nM, de Br^- 10,0 mM e de H_2O_2 100 μM . A Figura 42 mostra os dois gráficos: um que correlaciona os valores de corrente com o tempo (Figura 42A) e o outro que correlaciona os valores de concentração de H_2O_2 com o tempo (Figura 42B).

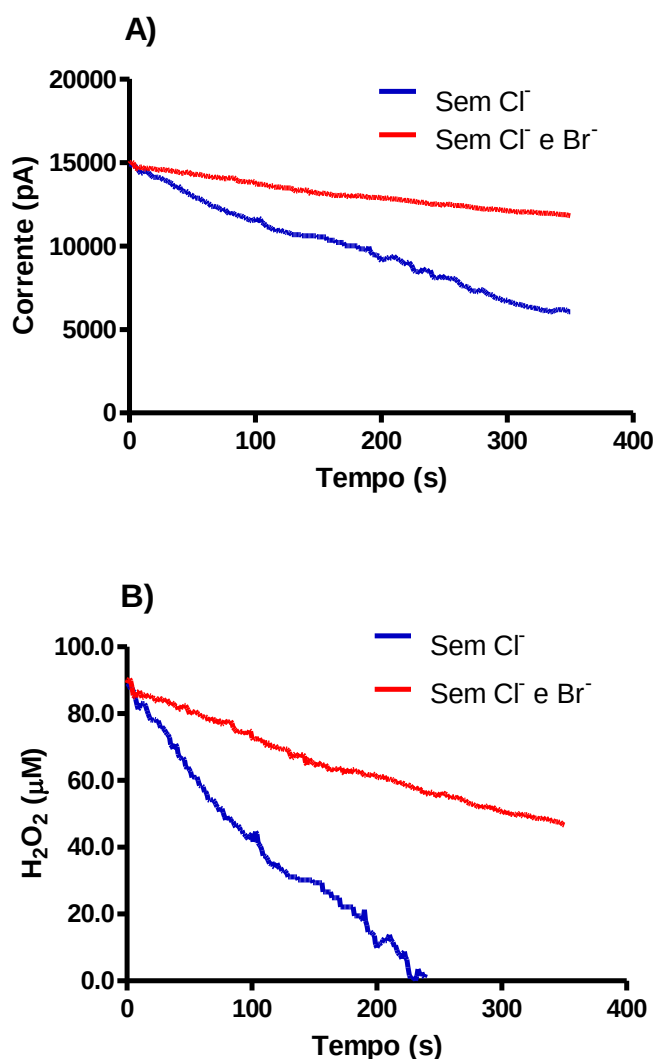


Figura 42. Análise no detector de H₂O₂: ausência de Br⁻ e ausência de Cl⁻ e Br⁻.

(A) gráfico de corrente em função do tempo obtido diretamente do equipamento. (B) gráfico obtido a partir da curva analítica de H₂O₂. Dansilglicina 50 μM, MPO 20 nM, Br⁻ 10 mM e H₂O₂ 100 μM em tampão fosfato 10 mM, pH=7,5.

O consumo de H₂O₂ acontece quando no meio reacional está presente somente o Br⁻ já que a MPO é capaz de oxidá-lo formando o HOBr, como ilustra os gráficos obtidos na Figura 44. Porém, também ocorre o consumo de H₂O₂ quando no meio não estão presentes o Cl⁻ e o Br⁻. Isso acontece porque, a MPO é capaz de degradar o H₂O₂ em oxigênio e água, assim como a catalase. Essa função da MPO é conhecida como atividade catalásica e ocorre quando o H₂O₂ está em excesso e o meio reacional está isento de substrato (KETTLE;

WINTERBOURN, 2001 e PAUMANN-PAGE *et al.*, 2013). O mecanismo catalásico da MPO que está representado na Figura 6, será utilizado para decompor o H_2O_2 quando o meio reacional estiver ausente de substrato.

Os resultados apresentados na Figura 41 mostraram que ocorre rapidamente o consumo do H_2O_2 quando utilizamos a metodologia com a DG. Desta maneira, comparamos a metodologia em desenvolvimento com a metodologia que utiliza a taurina, considerando o consumo de H_2O_2 . Neste experimento as concentrações de DG (50,0 μM), MPO (20,0 nM), Br^- (10,0 mM), H_2O_2 (100 μM) e taurina (10,0 mM) foram semelhantes às utilizadas nos demais ensaios, e as reações foram realizadas em tampão PBS. A Figura 43 apresenta o gráfico obtido diretamente do sensor amperométrico, que correlaciona a corrente com o tempo. Assim, quanto menor a corrente, menor é a concentração de H_2O_2 presente no meio reacional. Desta maneira, é possível concluir que na reação envolvendo a presença de DG, o consumo de H_2O_2 ocorre mais rapidamente do que quando a taurina é utilizada.

Entretanto, é necessário considerar que a metodologia que utiliza a DG como sonda na identificação da atividade halogenante da MPO utiliza íons Br^- que como demonstrado anteriormente (Figura 41) aumenta significativamente a velocidade da reação, ou seja o consumo de H_2O_2 . A Figura 43 também compara a metodologia que utiliza a taurina, com a metodologia que faz uso da DG, porém na ausência de Br^- . Os resultados mostraram que neste caso, o consumo do H_2O_2 ocorre de maneira mais efetiva na metodologia que utiliza a taurina, e confirma que a reação na ausência de Br^- ocorre lentamente, quando a método da DG é empregado.

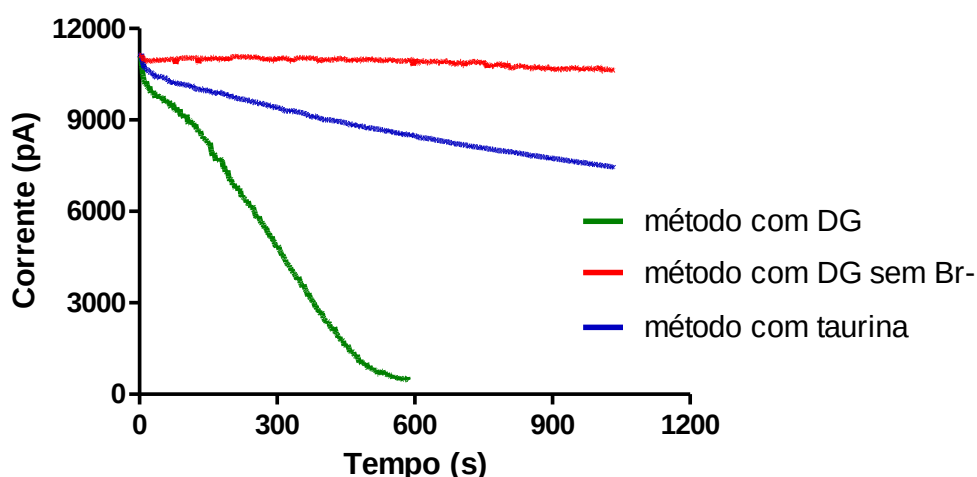


Figura 43. Análise no detector de H_2O_2 : metodologia da DG com e sem Br^- e metodologia da taurina.

DG 50,0 μM , MPO 20,0 nM, Br^- 10,0 mM, H_2O_2 100 μM e taurina 10,0 mM em tampão PBS.

Os resultados obtidos quando foi utilizado o detector eletroquímico de H_2O_2 complementaram as análises realizadas utilizando o fluorímetro de microplacas, ou seja, mostraram que a metodologia de determinação da atividade halogenante da MPO é específica quando se utiliza a DG como sonda fluorescente.

5.12 – Estudo com os inibidores para MPO – 5-fluortriptamina e hidrazida do ácido 4-aminobenzóico

O composto 5-fluortriptamina desvia o ciclo halogenante da MPO, acumulando o composto II, e desta forma ele é considerado um inibidor para a atividade halogenante desta enzima (Figura 7) (JANTSCHKO *et al.*, 2005). Já o composto hidrazida do ácido 4-aminobenzóico (4-ABAH) é conhecido como um inibidor suicida para a MPO, uma vez que foi constatado por Huang *et al.* (2015) que na presença de H_2O_2 , a hidrazida do ácido

benzóico provoca uma ruptura na estrutura das ligações entre o heme b e as subunidades heterodiméricas da MPO (Figura 9). Desta forma, neste estudo utilizamos dois inibidores que agem por meio de mecanismos diferentes.

Inicialmente, realizamos o teste de inibição utilizando a 5-fluortriptamina e a metodologia baseada em alterações de fluorescência da DG. Neste estudo, foram realizados ensaios utilizando a ferramenta de cinética do fluorímetro, com a DG. Desta maneira é possível acompanhar as variações de fluorescência durante os 30 minutos de reação. Para acompanhar a reação desde o início, a concentração de MPO foi reduzida para 16,0 nM, diminuindo a velocidade da reação. Neste experimento as concentrações de DG (50,0 μ M), Br^- (10,0 mM), MPO (16,0 nM) e H_2O_2 (100 μ M) foram mantidas fixas, enquanto a concentração de 5-fluortriptamina foi variada (0-20,0 μ M) (Figura 44).

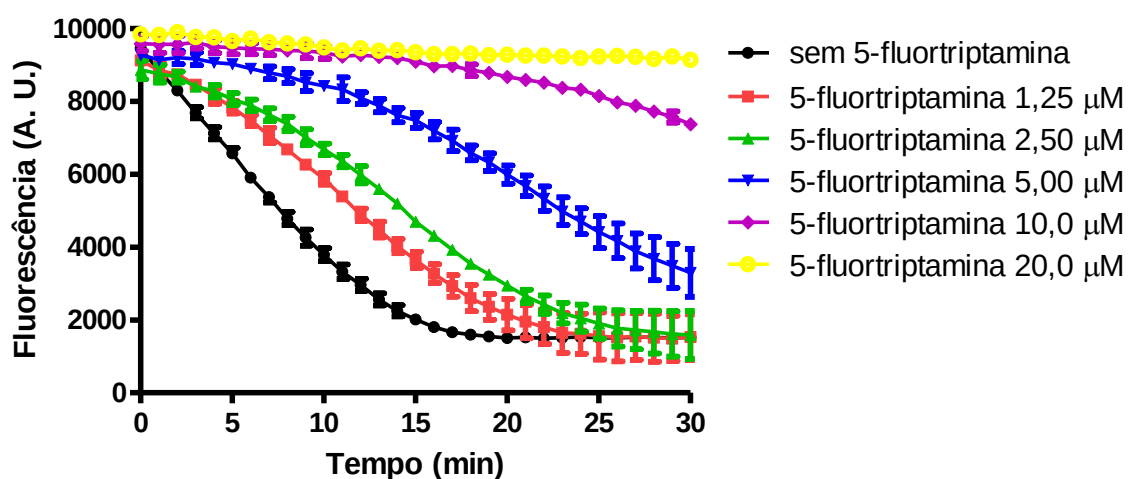


Figura 44. Gráfico de cinética utilizando 5-fluortriptamina e a metodologia da DG para a MPO. DG 50 μ M, MPO 16 nM, H_2O_2 100 μ M e 5-fluortriptamina (0-20) μ M em PBS, 30 minutos à 37°C.

Analisando o perfil do gráfico da Figura 44 é possível verificar que a inibição acontece nos primeiros minutos da reação, porém, ao final de 30 minutos a reação de formação do HOCl e/ou HOBr acaba ocorrendo. No início a concentração de 5-fluortriptamina é suficiente para competir com os íons Cl^- e Br^- desviando o ciclo catalítico da MPO para a formação do composto II. A medida que o 5-fluortriptamina é consumido, a MPO catalisa a formação do HOCl e/ou HOBr, o que é comprovado pelo decaimento da intensidade da fluorescência da DG.

Os estudos de Lu *et al.* (2008) nos ajudaram a confirmar essa hipótese. Eles estudaram a inibição da EPO pela melatonina utilizando o detector para monitorar o consumo de H_2O_2 e os resultados apresentados em seu trabalho possuem gráficos com perfil semelhante ao adquirido utilizando a sonda DG para a MPO e apresentado na Figura 44.

Lu *et al.* (2008) defendem que a melatonina inibe o mecanismo halogenante da EPO no início da reação, desviando seu ciclo catalítico para a formação do composto II. A medida que ela é consumida, o mecanismo halogenante é reestabelecido e o consumo de H_2O_2 ocorre rapidamente.

O gráfico da Figura 45A foi obtido a partir do gráfico da Figura 44, em que a velocidade relativa da reação foi calculada utilizando a parte linear do decaimento de cada curva. Este gráfico comprova que a velocidade da reação diminui à medida que a concentração de 5-fluortriptamina aumenta, porém isso não acontece de maneira linear. O gráfico da Figura 45B mostra a porcentagem de inibição da reação calculada a partir das análises da velocidade da reação. Neste caso, menos de $2,00 \mu\text{M}$ de 5-fluortriptamina são necessários para que a velocidade relativa da reação seja inibida à metade.

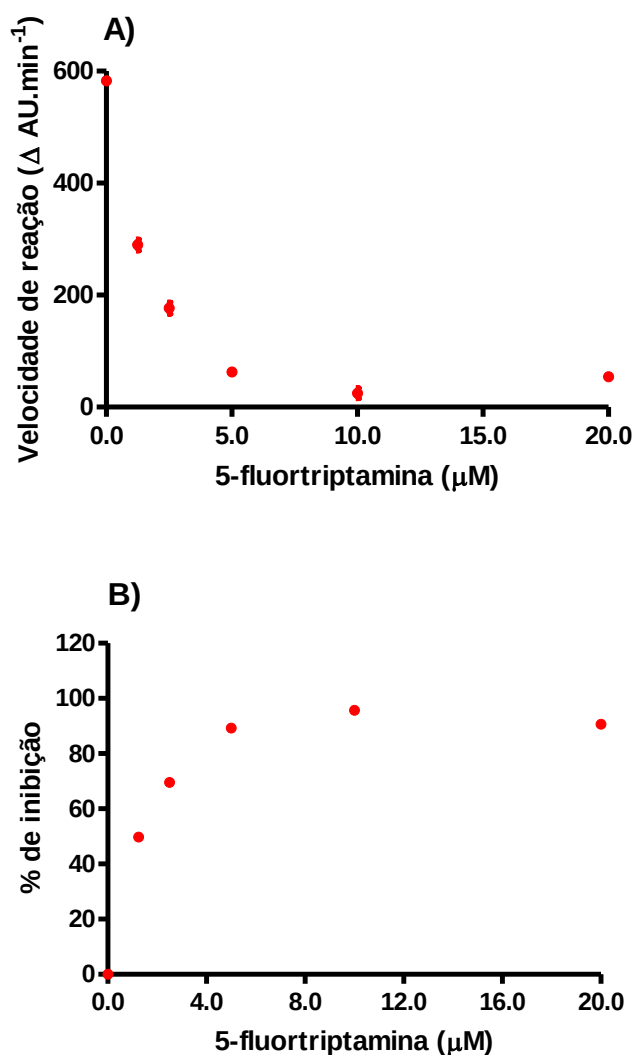


Figura 45. Velocidade de reação e porcentagem de inibição na presença de 5-fluortriptamina para a MPO.

(A) Velocidade da reação ($\Delta \text{AU} \cdot \text{min}^{-1}$); (B) Porcentagem de inibição a partir da velocidade de reação. Dansilglicina 50,0 μM , MPO 16,0 nM, Br⁻ 10,0 mM, H₂O₂ 100 μM e 5-fluortriptamina (0-20,0) μM em PBS.

As análises com o 5-fluortriptamina permitiram avaliar a capacidade da metodologia que utiliza a DG na determinação da porcentagem de inibição. Desta maneira, estudamos o efeito na reação com a adição da 4-ABAH, um inibidor suicida, ou seja, ele inibe a MPO, utilizando um mecanismo diferente da 5-fluortriptamina. Neste experimento, as análises também foram realizadas utilizando a ferramenta de cinética do fluorímetro e, desta forma, as

concentrações de DG (50,0 μM), MPO (16,0 nM), Br^- (10,0 mM) e H_2O_2 (100 μM) foram mantidas fixas e a concentração de 4-ABAH foi variada (0-3,00 μM) (Figura 46).

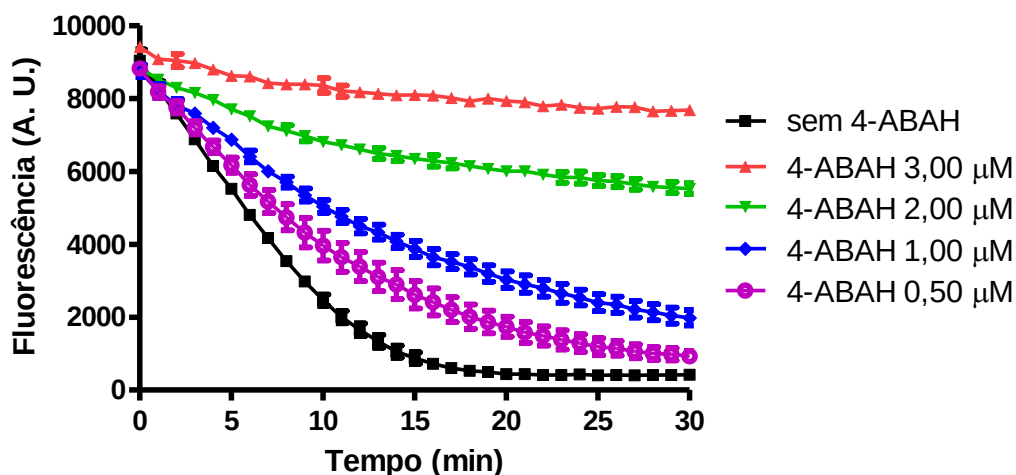


Figura 46. Gráfico de cinética utilizando 4-ABAH e a metodologia da DG para a MPO. DG 50,0 μM , MPO 16,0 nM, H_2O_2 100 μM e 4-ABAH (0-3,00) μM em PBS, 30 minutos à 37 °C.

Analisando as curvas do gráfico da Figura 46 é possível verificar que o comportamento da reação, ou seja, a maneira como a fluorescência foi perdendo intensidade durante os 30 minutos é diferente da reação na presença da 5-fluortriptamina. A 4-ABAH inibe a velocidade da reação, interferindo no valor absoluto da fluorescência no final dos 30 minutos. A partir do gráfico da Figura 46, a velocidade relativa da reação foi calculada utilizando a parte linear do decaimento de cada curva (Figura 47A). O gráfico de porcentagem de inibição da Figura 47B foi obtido a partir dos valores da velocidade relativa da reação, sendo que para os cálculos, a reação na ausência da 4-ABAH, foi considerada 0% de inibição.

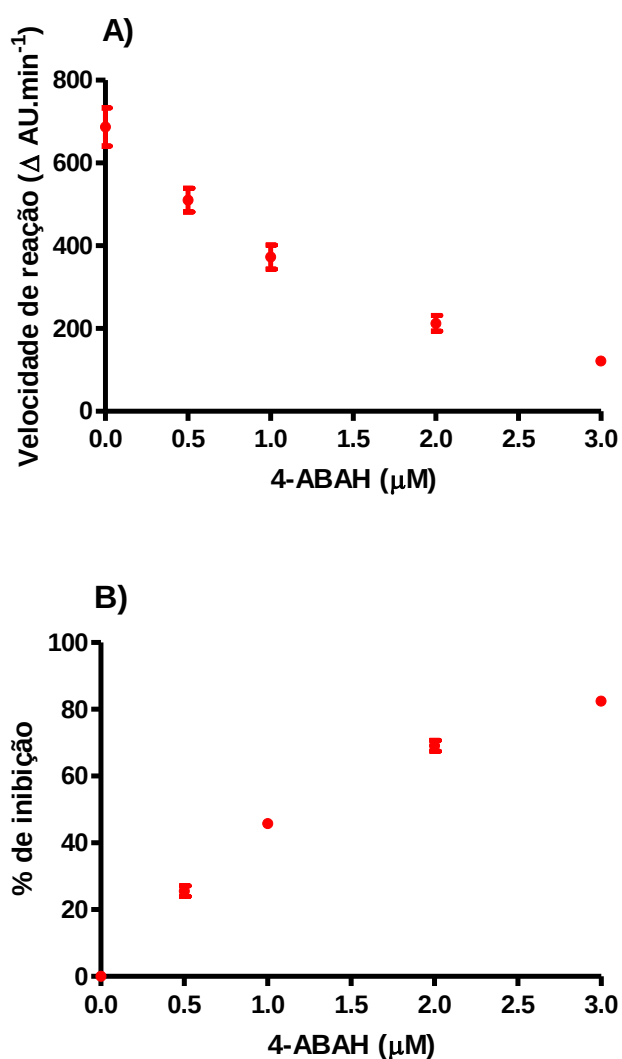


Figura 47. Velocidade de reação e porcentagem de inibição na presença de 4-ABAH para a MPO.

(A) Velocidade da reação (Δ AU.min⁻¹); (B) Porcentagem de inibição a partir da velocidade de reação. DG 50,0 μ M, MPO 16,0 nM, Br⁻ 10,0 mM, H₂O₂ 100 μ M e 4-ABAH (0-3,00) μ M em PBS, 30 minutos à 37°C.

A Figura 47A mostra que a velocidade da reação diminui à medida que aumenta a concentração de 4-ABAH de maneira mais linear quando comparada a presença de 5-fluortriptamina. Além disso, a partir da Figura 47B é possível determinar que menos de 2,00 μ M de 4-ABAH são necessários para inibir 50 % da reação. Esse resultado é semelhante ao

encontrado para a 5-fluortriptamina, apesar desses compostos apresentarem mecanismo de inibição distintos.

Diferentemente da técnica que utiliza a taurina e o TMB, a metodologia baseada nas medidas de fluorescência da DG, permite que a porcentagem de inibição seja determinada a partir de medidas de cinética enzimática.

5.13 – Estudo da variação de concentração de H_2O_2 na reação entre DG, EPO, e Br^-

A MPO não é a única capaz de catalisar a oxidação dos íons Cl^- , a peroxidase de eosinófilos (EPO) também consegue desempenhar esta função, porém em menor proporção, pois, enquanto o par composto I/MPO possui um potencial de redução de 1,16 V, o par composto I/EPO possui um potencial de redução de 1,10 V (JANTSCHKO *et al.*, 2005). Entretanto, a EPO é capaz de catalisar a oxidação do Br^- à HOBr de maneira mais efetiva que a MPO, o que pode ser comprovado considerando as constantes de velocidade entre o composto I e os haletos em ambos os casos (Tabela 7 e 8).

Tabela 7. Constantes de velocidade da reação da mieloperoxidase.

Haletos	$k_{\text{app}} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$
Cloreto	$(2,5 \pm 0,3) \cdot 10^4$
Brometo	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^6$

* Constante de velocidade entre a reação do composto I com Cl^- ou Br^- em pH 7. Adaptado de Furtmuller; Burner; Obinger (1998).

Tabela 8. Constantes de velocidade da reação da peroxidase de eosinófilos

Haletos	k_{app} ($M^{-1}s^{-1}$)
Cloreto	$(3,1 \pm 0,3) \cdot 10^3$
Brometo	$(1,9 \pm 0,1) \cdot 10^7$

* Constante de velocidade entre a reação do composto I com Cl^- ou Br^- em pH 7. Adaptado de Furtmuller *et al.* (2000b).

Diante das semelhanças apresentadas entre a MPO e a EPO, como a capacidade de catalisar a oxidação do Cl^- e do Br^- , mesmo que em proporções diferentes, procedemos os estudos com a EPO. Inicialmente, determinamos a curva analítica que relaciona a variação da intensidade da sonda DG a medida que a concentração de H_2O_2 (0-100 μM) foi variada. Durante esse experimento as concentrações de DG (50,0 μM), de EPO (20,0 nM) e de Br^- (10,0 mM) permaneceram fixas (Figura 48).

Utilizando a enzima EPO para catalisar a formação de HOCl e/ ou HOBr em um meio com excesso de cloreto (tampão PBS) e Br^- , a concentração de H_2O_2 será determinante na quantidade de HOCl e/ou HOBr produzido.

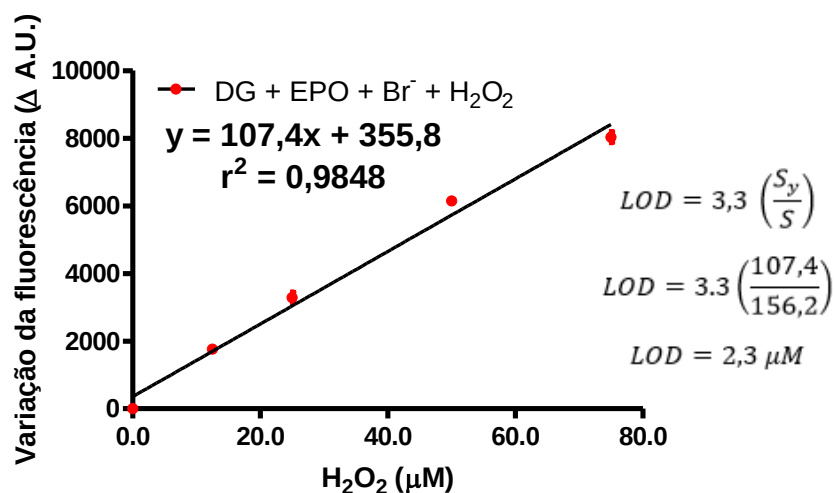


Figura 48. Curva analítica de H_2O_2 para EPO.

DG 50,0 μM , EPO 20,0 nM, Br^- 10,0 mM e H_2O_2 (0-100) μM em PBS, incubado a 37°C por 30 minutos.

A curva analítica apresentada na Figura 48 mostra que a variação da fluorescência da DG corresponde linearmente a diferentes concentrações de H_2O_2 . Esse resultado foi semelhante ao obtido para a MPO.

5.14 – Estudo cinético utilizando a EPO

De maneira semelhante ao realizado para a MPO, estudamos a influência na variação da concentração de EPO na metodologia utilizando a DG. Neste ensaio as concentrações de DG (50,0 μM), Br^- (10,0 mM) e H_2O_2 (100 μM) foram mantidas fixas e a concentração de EPO (0,40-1,20 nM) foi variada (Figura 49). É importante ressaltar que as concentrações de EPO utilizadas neste experimento são menores do que a utilizada nos demais ensaios, pois como a reação ocorre rapidamente, o ensaio de cinética seria inviável.

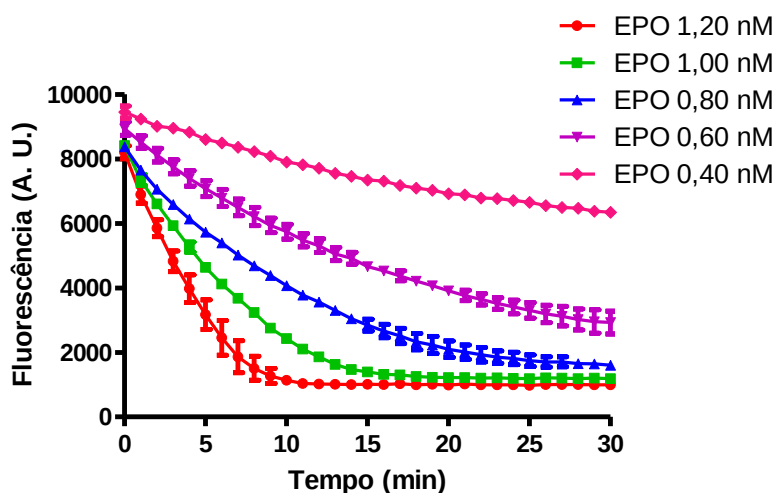


Figura 49. Estudo cinético realizado para a EPO.

DG 50,0 μ M, Br⁻ 10,0 mM, H₂O₂ 100 μ M e EPO (0,40-1,20) nM em PBS, realizada por 30 minutos.

O gráfico da Figura 49 mostra que a reação ocorre completamente quando a EPO está na concentração de 1,20 nM, ou seja, a concentração utilizada nos demais ensaios (0,40 nM) é suficiente para que a fluorescência da DG decaia completamente. A partir do gráfico obtido na Figura 49 foi possível calcular a velocidade relativa da reação, ou seja, variação de fluorescência por minuto. É importante ressaltar que a medida foi realizada na parte linear do decaimento. O gráfico apresentado na Figura 50 foi construído a partir dos valores de velocidade relativa de reação e mostra uma ótima correlação entre a velocidade relativa de decaimento da fluorescência da DG e a concentração da EPO.

Em resumo, estes resultados mostram que a metodologia em desenvolvimento tem potencial de aplicação não só para medir a produção de HOCl em uma concentração fixa de EPO, mas também para avaliar a atividade da enzima, quando as demais condições são fixadas.

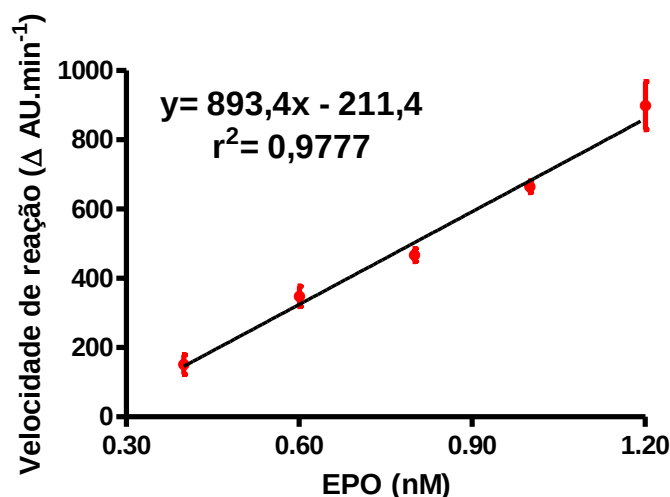


Figura 50: Velocidade de reação determinada a partir de diferentes concentrações de EPO.
 DG 50,0 μM , Br^- 10,0 mM, H_2O_2 100 μM e EPO (0,40-1,20) nM.

O experimento semelhante para a MPO, mostrou que é necessária uma concentração maior de enzima quando comparado à EPO. A constante da velocidade de reação entre o composto I e o Br^- para a EPO $[(1,9 \pm 0,1) \cdot 10^7]$ é 10 vezes maior do que a da MPO $[(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^6]$, ou seja, a conversão do Br^- à HOBr acontece mais rapidamente na presença de EPO. Essa pode ser uma das explicações para que seja necessária uma concentração menor de EPO para que a reação se complete quando comparada a MPO. Além disso, é bem aceito pela literatura que a MPO pode ser degradada na presença de excesso de H_2O_2 ou HOCl (PAUMANN-PAGE *et al.*, 2013). Essa pode ser outra explicação para que as concentrações de MPO nos estudos de cinética sejam superiores as da EPO.

5.15 – Estudo da especificidade da metodologia com EPO

Os estudos envolvendo a MPO mostraram que a metodologia baseada em medidas de fluorescência da DG é específica e sensível a atividade halogenante da enzima. Experimentos semelhantes foram realizados utilizando a EPO. Inicialmente, foram realizados os testes em que cada um dos compostos do sistema, DG, EPO, Cl^- , Br^- e H_2O_2 , foram retirados. As análises foram realizadas utilizando dois diferentes valores de concentrações de H_2O_2 (Tabelas 9 e 10). Para o cálculo da eficiência relativa da reação, a condição controle foi estabelecida como DG 50,0 μM , EPO 20,0 nM, Br^- 10,0 mM e H_2O_2 100 μM ou 50,0 μM em tampão PBS (Cl^- 140 mM). Os valores nas tabelas foram calculados a partir dos valores de fluorescência adquiridos, considerando que o máximo de fluorescência acontece quando no meio reacional está presente somente a DG.

Tabela 9. Consumo da DG utilizando diferentes condições reacionais para a EPO e H_2O_2 100 μM .

Meio reacional	Concentração de DG consumida (μM)	Porcentagem de DG consumida (%)
DG	0	0
Sistema Completo*	$47 \pm 0,1$	$95 \pm 0,2$
Sem Br^- **	$1,1 \pm 0,4$	$2,2 \pm 0,8$
Sem EPO **	$1,0 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,6$
Sem H_2O_2 **	$1,4 \pm 1,4$	$2,8 \pm 2,8$

* DG 50,0 μM , EPO 20,0 nM, Br^- 10,0 mM e H_2O_2 100 μM . Reação conduzida por 30 minutos em PBS.

** valor significativamente menor quando comparado ao Sistema Completo ($p < 0,0001$) (One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey).

Os valores absolutos baixos de consumo de DG (Tabela 9) relatam que a reação não ocorre quando algum dos componentes do sistema (DG, EPO, Cl^- , Br^- e H_2O_2) não está presente no meio reacional. Desta maneira, essas análises comprovaram que a metodologia baseada nas alterações de fluorescência da DG é, também, específica para a atividade halogenante da EPO. Esses resultados foram confirmados quando a concentração do H_2O_2 foi reduzida à metade, ou seja, as análises mantinham as concentrações fixas de DG 50,0 μM , de EPO 20,0 nM, de Br^- 10,0 mM e de H_2O_2 50,0 μM (Tabela 10). Obviamente o consumo do sistema completo cai à metade, mas as proporções relativas na ausência dos componentes seguem a mesma tendência.

Tabela 10. Consumo da DG utilizando diferentes condições reacionais para EPO e H_2O_2 50 μM .

Meio reacional	Concentração de DG consumida (μM)	Porcentagem de DG consumida (%)
DG	0	0
Sistema Completo *	$34 \pm 1,1$	$67 \pm 2,2$
Sem Br^- **	$2,6 \pm 1,6$	$5,1 \pm 3,1$
Sem EPO **	$1,3 \pm 0,3$	$2,7 \pm 0,5$
Sem H_2O_2 **	$1,8 \pm 0,6$	$3,4 \pm 1,6$

* DG 50,0 μM , EPO 20,0 nM, Br^- 10,0 mM e H_2O_2 50,0 μM . Reação conduzida por 30 minutos em PBS.

** valor significativamente menor quando comparado ao Sistema Completo ($p < 0,0001$) (One-way Anova e teste de comparação múltipla de Tukey).

Nas análises realizadas até o momento, o Cl^- estava presente no meio reacional, por meio da utilização do tampão PBS. Assim, o próximo passo foi remover o mesmo do meio, o que foi conseguido trocando o tampão PBS por tampão fosfato 10,0 mM, pH = 7,5. Vale

lembrar que PBS é também tampão fosfato 10,0 mM, mas acrescido de 140 mM de NaCl. Os resultados apresentados na Tabela 11 mostram que a reação não ocorre na ausência de Cl^- e Br^- , indicando claramente que a DG não pode ser oxidada via atividade peroxidásica da EPO. Já na ausência de somente Cl^- a reação ocorre normalmente, pois, como discutido anteriormente a EPO é capaz de catalisar a oxidação do Br^- .

Tabela 11. Consumo da DG na ausência de Cl^- e Br^- para a EPO e H_2O_2 100 μM .

Meio reacional	Concentração de DG consumida (μM)	Porcentagem de DG consumida (%)
DG 50	0	0
Sem Cl^-	$49,7 \pm 0,3$	$99,3 \pm 0,6$
Sem Cl^- e Sem Br^- *	$0,9 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,4$

DG 50,0 μM , EPO 20,0 nM, Br^- 10,0 mM e H_2O_2 100 μM . Reação conduzida por 30 minutos em tampão fosfato 10 mM, pH= 7,5.

* valor significativamente menor quando comparado ao meio reacional Sem Cl^- ($p < 0,0001$) (Teste t).

Novamente, as análises na ausência de Cl^- e/ou Br^- foram repetidas utilizando uma concentração diferente de H_2O_2 , ou seja, foram mantidas fixas as concentrações de DG 50 μM , EPO 20 nM, Br^- 10 mM e H_2O_2 50 μM . Os resultados obtidos confirmam os dados anteriores e estão listados na Tabela 12.

Tabela 12. Consumo da DG na ausência de Cl^- e Br^- para a EPO e H_2O_2 50 μM .

Meio reacional	Concentração de DG consumida (μM)	Porcentagem de DG consumida (%)
DG 50 μM	0	0
Sem Cl^-	$36,5 \pm 0,2$	$73,0 \pm 0,4$
Sem Cl^- e Sem Br^- *	$1,3 \pm 0,8$	$2,6 \pm 1,6$

DG 50 μM , EPO 20 nM, Br^- 10 mM e H_2O_2 50 μM . Reação conduzida por 30 minutos em tampão fosfato 10 mM, pH= 7,5.

* valor significativamente menor quando comparado ao meio reacional Sem Cl^- ($p < 0,0001$) (Teste t).

Os experimentos realizados até o momento comprovaram a especificidade na metodologia em desenvolvimento também para a EPO, ou seja, a alteração na fluorescência da DG só ocorre se todos os compostos do sistema (Cl^- , EPO, Br^- e H_2O_2) estiverem presentes no meio reacional.

5.16 – Estudo com os inibidores para EPO – 5-fluortriptamina e hidrazida do ácido 4-aminobenzóico

De maneira semelhante às análises que foram realizadas com a MPO, utilizamos os dois compostos 5-fluortriptamina e hidrazida do ácido 4-aminobenzóico (4-ABAH), inibidores já conhecidos para MPO, para estudar a inibição na reação com a EPO. Os estudos envolvendo a EPO foram realizados utilizando a ferramenta de cinética do fluorímetro. Baseado no gráfico da Figura 49, determinamos a concentração de EPO utilizada neste experimento. Desta maneira, neste experimento as concentrações de DG (50,0 μM), Br^- (10,0 mM), EPO (1,20 nM) e H_2O_2 (100 μM) foram mantidas fixas, enquanto a concentração de 5-fluortriptamina foi variada (0-10,0 μM) (Figura 51).

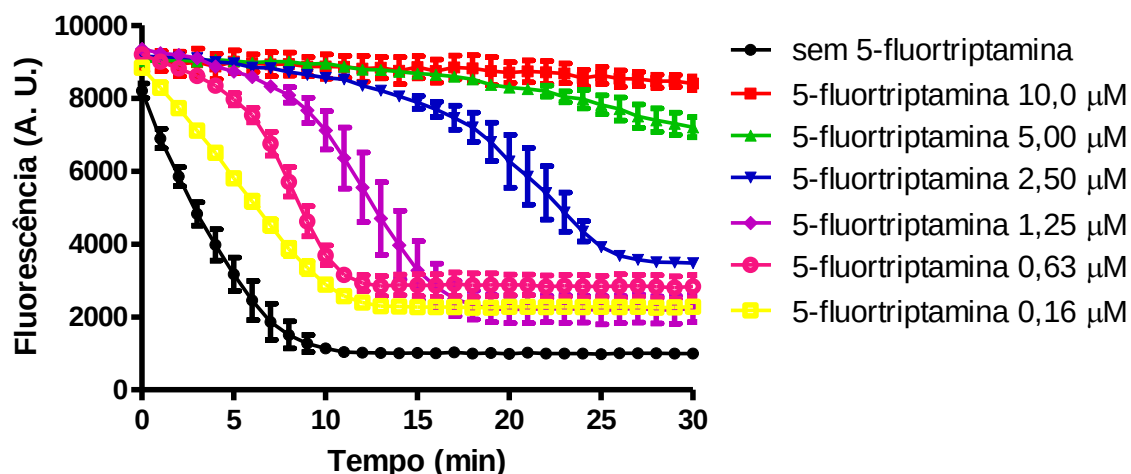


Figura 51. Gráfico de cinética utilizando 5-fluortriptamina e a metodologia da dansilglicina para a EPO.

DG 50,0 μM, EPO 1,20 nM, H₂O₂ 100 μM e 5-fluortriptamina (0-10,0) μM em PBS, a 37°C por 30 minutos.

Ao comparar as curvas de cinética obtidas no gráfico da Figura 51 é possível compreender que a 5-fluortriptamina inibe a reação de formação do HOCl e/ou HOBr durante os primeiros minutos, mas ao final de 30 minutos a reação acaba ocorrendo, semelhante ao que ocorreu para a MPO (Figura 44). O gráfico da Figura 52A foi obtido a partir do gráfico da Figura 51, em que a velocidade relativa da reação foi calculada utilizando a parte linear do decaimento de cada curva. Este gráfico comprova que a velocidade da reação diminui à medida que a concentração de 5-fluortriptamina aumenta. O gráfico da Figura 52B mostra a porcentagem de inibição da reação calculada a partir das análises da velocidade da reação. Neste caso, menos de 1,00 μM de 5-fluortriptamina são necessários para que a velocidade relativa da reação seja reduzida à metade.

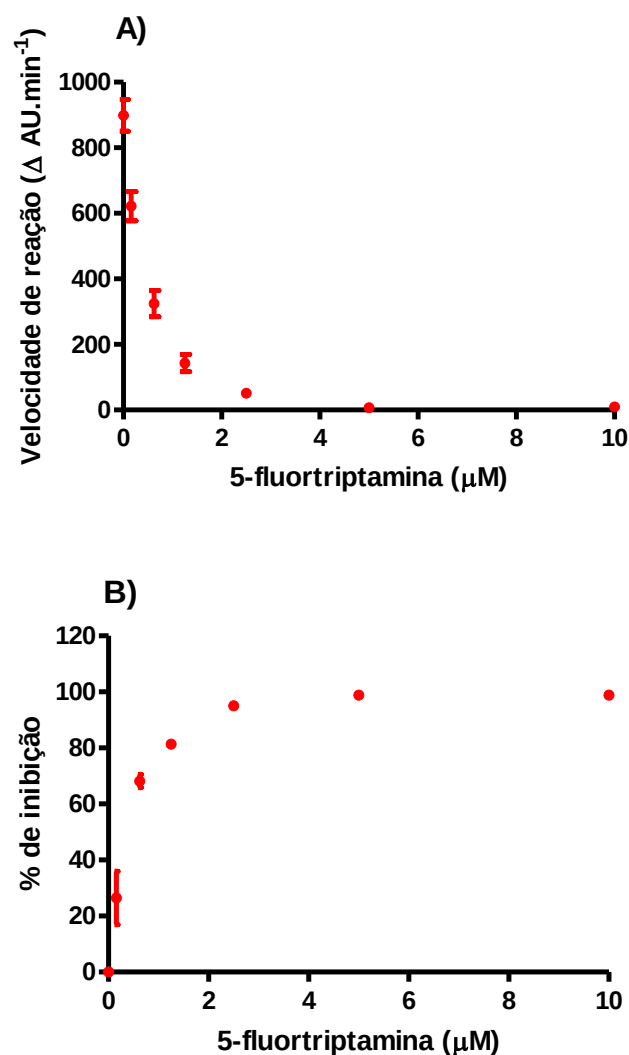


Figura 52. Velocidade e porcentagem de inibição de reação na presença de 5-fluortriptamina para a EPO.

(A) Velocidade da reação ($\Delta \text{AU} \cdot \text{min}^{-1}$); (B) Porcentagem de inibição a partir da velocidade de reação. Dansilglicina 50 μM , EPO 1,2 nM, Br⁻ 10 mM, H₂O₂ 100 μM e 5-fluortriptamina (0-10) μM .

As concentrações de 5-fluortriptamina para inibir 50 % da velocidade da reação foram semelhantes tanto para a MPO, quanto para a EPO. Porém, as concentrações de MPO e EPO utilizadas nos experimentos foram bem distintas. Isso pode ser explicado, uma vez que, a MPO parece ser mais susceptível a uma degradação do que a EPO. A degradação da MPO, tanto pela ação de HOCl ou H₂O₂ em excesso já foi detalhada em outros estudos, como por

exemplo, no trabalho de PAUMANN-PAGE *et al.* (2013) em que é relatado a sua desativação.

De maneira semelhante que foi realizado para a MPO, analisamos também a capacidade de inibição do 4-ABAH na reação com a EPO. Assim, neste experimento, as concentrações de DG (50,0 μM), EPO (1,20 nM), Br^- (10,0 mM) e H_2O_2 (100 μM) foram mantidas fixas e a concentração de 4-ABAH foi variada (0-3,00 μM) (Figura 53).

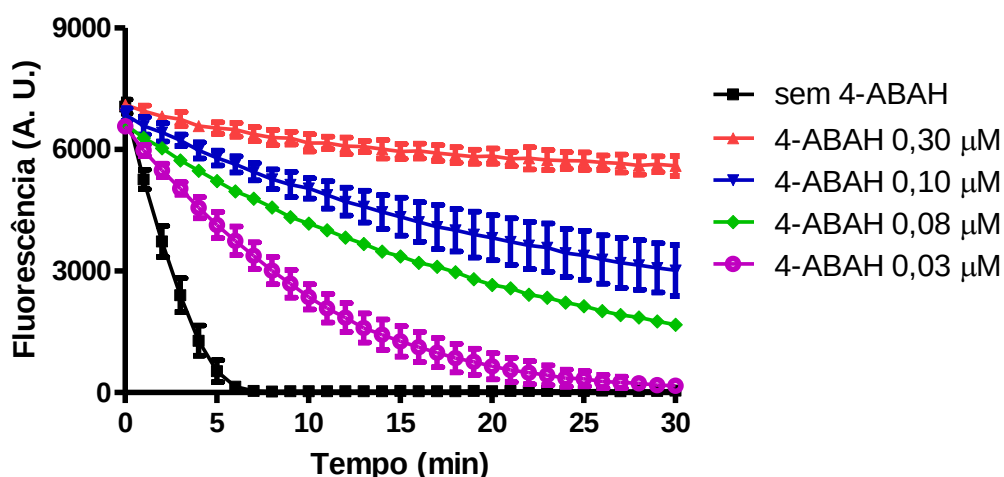


Figura 53. Gráfico de cinética utilizando 4-ABAH e a metodologia da DG para a EPO.

DG 50,0 μM , EPO 16,0 nM, H_2O_2 100 μM e 4-hidroxibenzilhidrazida (0-3,00) μM em PBS, a 37°C por 30 minutos.

Analisando as curvas do gráfico da Figura 53 é possível verificar que a 4-ABAH inibe a velocidade da reação, interferindo no valor absoluto da fluorescência no final dos 30 minutos, de maneira distinta ao observado quando utilizado a 5-fluortriptamina, ou seja, o comportamento da diminuição da intensidade de fluorescência é diferente durante os 30 minutos, semelhantemente ao observado quando utilizamos a MPO.

A partir do gráfico da Figura 53, a velocidade relativa da reação foi calculada utilizando a parte linear do decaimento de cada curva (Figura 54A). O gráfico de porcentagem de inibição da Figura 54B foi obtido a partir dos valores da velocidade relativa da reação, sendo que para os cálculos, a reação na ausência da 4-ABAH, foi considerada 0% de inibição.

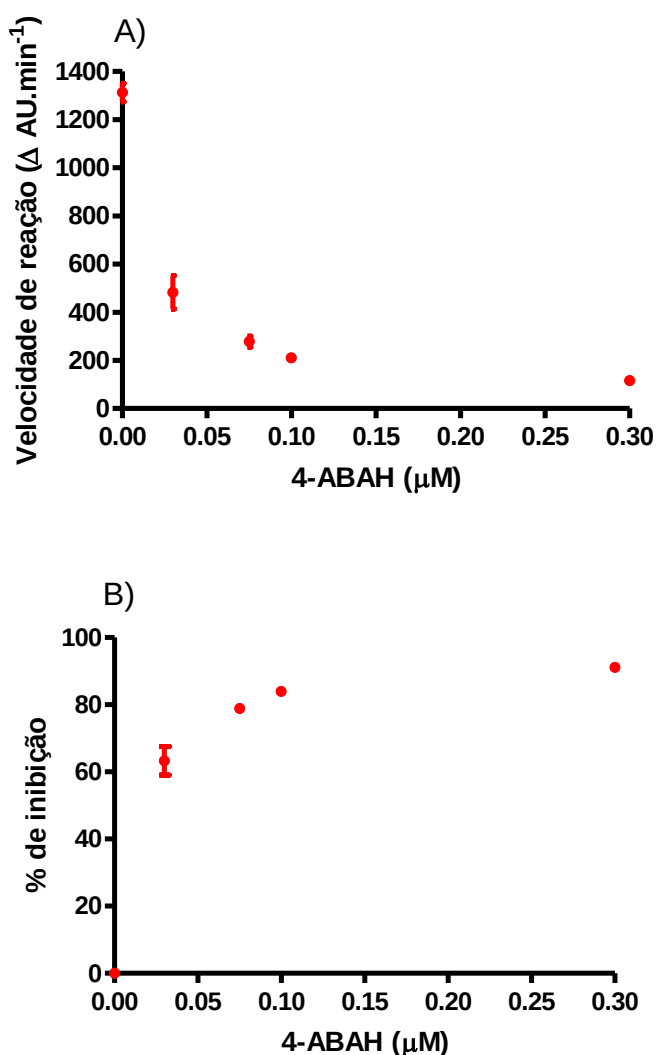


Figura 54. Velocidade e porcentagem de inibição da reação na presença de 4-ABAH para a EPO.

(A) Velocidade da reação (Δ AU.min⁻¹); (B) Porcentagem de inibição a partir da velocidade de reação. Dansilglicina 50,0 μM, EPO 1,20 nM, Br⁻ 10,0 mM, H₂O₂ 100 μM e 4-ABAH (0-0,300) μM, a 37°C por 30 minutos.

A Figura 54B mostra que nessas condições de reação para a EPO, é necessário menos de 0,05 μM de 4-ABAH para inibir 50 % da velocidade da reação. Neste caso, a concentração de 4-ABAH para inibir a metade da velocidade da reação é menor do que a encontrada para a 5-fluortriptamina. Contudo, também foi possível determinar a porcentagem de inibição utilizando medidas de cinética enzimática para a EPO.

5.17 – Estudo da variação do pH na reação de formação de HOCl e/ou HOBr para a MPO e EPO

FURTMÜLLER; BURNER; OBINGER (1998) e FURTMÜLLER *et al.* (2000a) mostraram que a velocidade da reação entre o Composto I tanto da MPO, como da EPO, com o substrato (Cl^- ou Br^-), altera com a variação do pH. Eles demonstraram que em $\text{pH}=5$, a constante de velocidade dessas reações aumentam. Além disso, a EPO é capaz de oxidar os íons Cl^- em um pH ácido.

Na oxidação do Cl^- pela MPO, os íons Cl^- competem com o H_2O_2 , uma vez que, o halogênio liga-se de forma reversível a enzima, de forma semelhante ao H_2O_2 . Essa ligação é dependente do pH. Enquanto o H_2O_2 liga-se a histidina desprotonada, presente no sítio catalítico, o Cl^- prefere ligar-se a histidina protonada. Desta maneira, a diminuição do pH favorece a protonação da histidina, aumentando a velocidade de reação entre o Cl^- e a MPO (ANDREW; KRINSKY, 1982 e FURTMÜLLER; BURNER; OBINGER, 1998). As Tabelas 13 e 14 ilustram os valores dessas constantes de velocidade da reação entre Cl^- ou Br^- e composto I/MPO ou composto I/EPO.

Tabela 13. Constante de velocidade da reação da MPO em pH=5 e pH=7.

Haletos	$k_{app} (M^{-1}.s^{-1})$	
	pH 7	pH 5
Cloreto	$(2,5 \pm 0,3).10^4$	$(3,9 \pm 0,4).10^6$
Brometo	$(1,1 \pm 0,1).10^6$	$(3,0 \pm 0,2).10^7$

* Constante de velocidade entre a reação do composto I com Cl^- ou Br^- em pH 7. Adaptado de Furtmuller; Burner; Obinger (1998).

Tabela 14. Constante de velocidade da reação da EPO em pH=5 e pH=7.

Haletos	$k_{app} (M^{-1}.s^{-1})$	
	pH 7	pH 5
Cloreto	$(3,1 \pm 0,3).10^3$	$(2,6 \pm 0,7).10^4$
Brometo	$(1,9 \pm 0,1).10^7$	$(1,1 \pm 0,2).10^8$

* Constante de velocidade entre a reação do composto I com Cl^- ou Br^- em pH 7. Adaptado de Furtmuller; *et al.* (2000b).

Os valores da Tabela 13 mostram que a velocidade da reação da oxidação do Cl^- via atividade halogenante da MPO aumenta na ordem de 100 vezes quando o pH é mais ácido (pH=5). De forma semelhante, o pH mais ácido aumenta na ordem de 10 vezes todas as demais constantes de velocidade (Tabelas 13 e 14).

Desta forma, estudamos o comportamento da reação utilizando a MPO e a EPO em um pH mais ácido. A mudança no pH foi realizada alterando o tampão PBS (pH=7,4) para tampão fosfato 100 mM, pH=5. Para garantir a presença de íons Cl^- adicionou-se ao tampão

NaCl 100 mM. As reações foram realizadas sem a adição de Br^- , ou seja, nos ensaios as concentrações de DG (50,0 μM), MPO ou EPO (20,0 nM) e H_2O_2 (100 μM) foram mantidas fixas. Os experimentos foram realizados tanto em pH 7,4 (PBS), quanto em pH 5,0 (tampão fosfato) e estão apresentados na Figura 55.

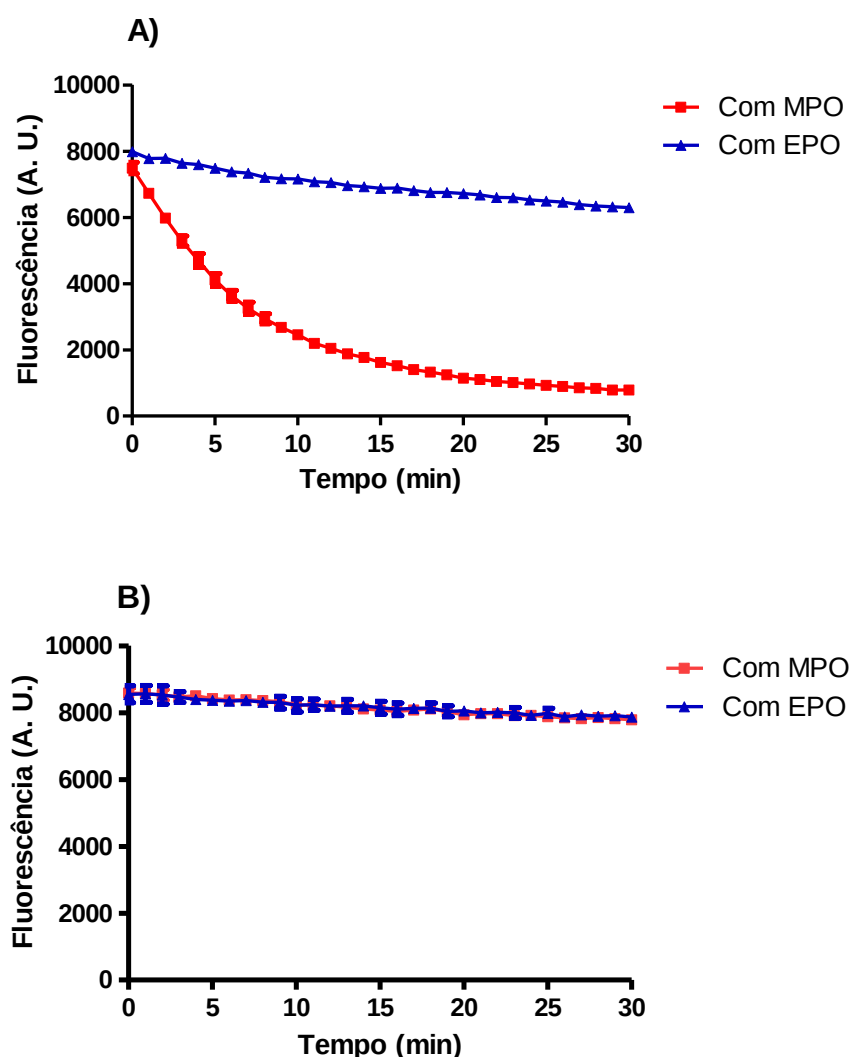


Figura 55. Gráfico de cinética obtido para em pH =5 e pH=7,4 para a MPO e para a EPO na ausência de Br^- .

(A) pH 5 (B) pH 7,4. DG 50,0 μM , MPO ou EPO 20,0 nM e H_2O_2 100 μM em tampão fosfato 100 mM pH=5, acrescido de NaCl 100 mM ou PBS, a 37°C por 30 minutos.

O gráfico na Figura 55A mostra claramente a diferença entre as enzimas MPO e EPO no pH=5, diferentemente do que ocorre no pH=7,4 (Figura 55B). Realmente, em pH=5 a constante de velocidade da reação entre o composto I e a MPO é da ordem de 100 vezes maior do que a da constante de velocidade da reação entre o composto I e a EPO. Desta maneira, em pH mais ácido é possível diferenciar a MPO e a EPO considerando as suas atividades halogenantes.

Ao adicionar íons Br^- no meio reacional, não foi possível identificar essa diferença entre as atividades halogenantes da MPO e da EPO (Figura 56), pois os valores das constantes de velocidade (Tabelas 13 e 14) entre o composto I e o Br^- tanto para a MPO quanto para a EPO aumenta proporcionalmente, na ordem de 10 vezes. Neste experimento, as concentrações de DG (50,0 μM), MPO ou EPO (20,0 nM), Br^- (10,0 mM) e H_2O_2 (100 μM) foram mantidas fixas.

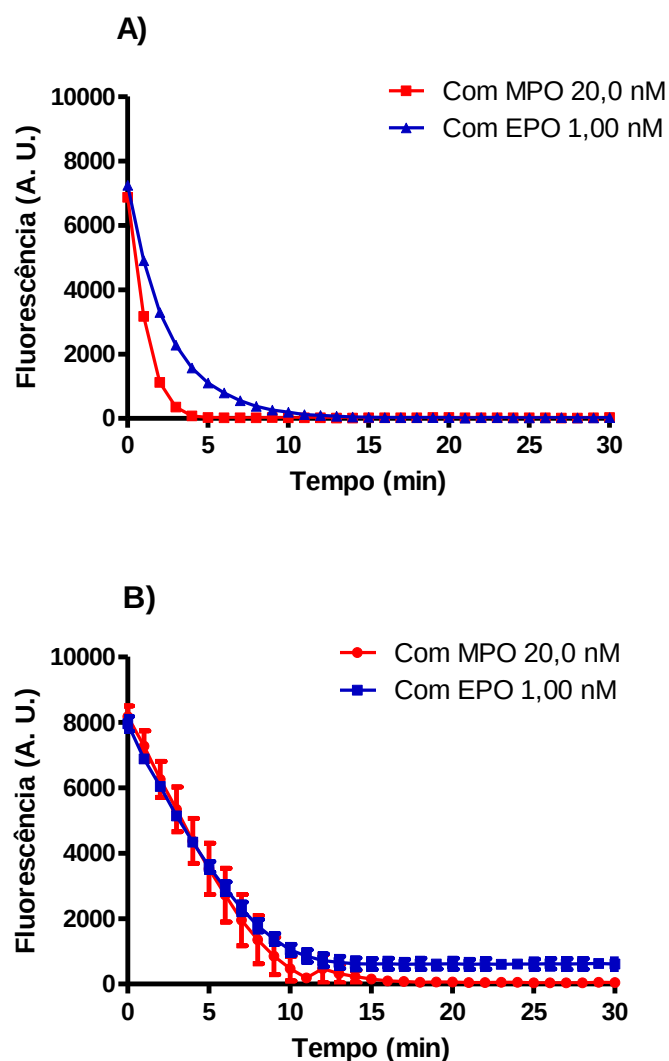


Figura 56. Gráfico de cinética obtido para em pH =5 e pH=7 para a MPO e para a EPO na presença de Br⁻.

DG 50,0 μ M, MPO ou EPO 20,0 nM, Br⁻ 10,0 mM e H₂O₂ 100 μ M em tampão fosfato 100 mM pH=5, acrescido de NaCl 100 mM ou PBS, a 37°C por 30 minutos.

De fato, a alteração no pH possibilitou diferenciar a MPO e a EPO utilizando a metodologia da DG, já que, em pH ácido a velocidade da reação entre o composto I/MPO e Cl⁻ aumenta significativamente.

6 – CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a DG pode ser utilizada como sonda fluorescente na detecção específica da atividade halogenante tanto da MPO como da EPO. Além disso, a metodologia baseada na fluorescência da DG possibilitou que medidas velocidade relativa de formação de HOCl fossem realizadas.

Trata-se do primeiro método para determinação de atividade halogenante de MPO e EPO que tem como princípio a alta eletrofilicidade do HOBr.

A aplicação da metodologia utilizando a DG nos estudos com inibidores confirmaram que, por meio de consumo de DG, foi possível verificar e compreender o mecanismo de inibidores para as enzimas MPO e EPO, podendo diferenciar a ação de inibidores reversíveis e irreversíveis.

A alteração no pH do meio reacional possibilitou que a metodologia baseada em alterações de fluorescência da DG fosse utilizada para diferenciar a MPO da EPO na ausência de íons Br⁻.

Referências Bibliográficas

AGNER, K. Verdoperoxidase: a fermente isolated from leukocytes. **Acta Physiol Scand**, v. 2, p. 1-62, 1941.

AGNER, K. Biological effects of hypochlorous acid formed by “MPO” – peroxidation in the presence of chloride ions. p. 329-335. In: AKESON, A.; EHRENBURG, A.. **Structure and function of oxidation-reduction enzymes**. Oxford, 1972.

ANDRADE, Vanessa L. *et al.* Evaluation of plasmatic MMP-8, MMP-9, TIMP-1 and MPO levels in obese and lean women. **Clinical Biochemistry**, v. 45, n. 6, p.412-415, abr. 2012.

ANDREW, Patricia C.; KRINSKY, Norman I.. A Kinetic Analysis of the Interaction of Human Myeloperoxidase with Hydrogen Peroxide, Chloride Ions, and Protons. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 22, p.13240-13245, maio 1982.

ARNHOLD, Juergen; FLEMMIG, Joerg. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, n. 1, p.92-106, ago. 2010.

AUGUSTO, O.; MIYAMOTO, S.. Oxygen Radicals and Related Species, in: K. Pantopoulos, H.M. Schipper (Eds.), **Principles of Free Radical Biomedicine**, Nova Science Publishers Inc., New York, p. 1-23.2011.

BALDUS, Stephan *et al.* Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 12, p.1759-1770, 15 dez. 2001.

BANCI, Lucia. Structural properties of peroxidases. **Journal of Biotechnology**, v. 53, n. 2-3, p.253-263, mar. 1997.

BATTISTUZZI, G. *et al.* Redox properties of heme peroxidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Review, v. 500, n. 1, p.21-36, 2010a.

BATTISTUZZI, Gianantonio *et al.* Redox thermodynamics of lactoperoxidase and eosinophil peroxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 494, n. 1, p.72-77, fev. 2010b.

BORATO, D. *et al.* Biomarkers in Obesity: Serum Myeloperoxidase and Traditional Cardiac Risk Parameters. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 124, n. 01, p.49-54, 21 jan. 2016.

BOZEMAN, Paula M.; LEARN, Douglas B.; THOMAS, Edwin L.. Assay of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. **Journal of Immunological Methods**, v. 126, p.125-133, 1990.

CHAVALI, Balagopalakrishna *et al.* ESR and X-ray Structure Investigations on the Binding and Mechanism of Inhibition of the Native State of Myeloperoxidase with Low Molecular Weight Fragments. **Appl Magn Reson**, v. 46, n. 8, p.853-873, 19 maio 2015.

CHAPMAN, Anna L. P. *et al.* Ceruloplasmin Is an Endogenous Inhibitor of Myeloperoxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 9, p.6465-6477, mar. 2013.

CHESNEY, Jason A. *et al.* A spectrophotometric assay for chlorine-containing compounds. **Analytical Biochemistry**, v. 196, p.262-266, 1991.

CHURG, Andrew *et al.* Late Intervention with a Myeloperoxidase Inhibitor Stops Progression of Experimental Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 185, n. 1, p.34-43, jan. 2012.

CRUZ, Wilton Antônio da Silva. **Atividade de mieloperoxidase e produção de oxigênio singlete em neutrófilos e células monocíticas**. 2010. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CUNICO, Robert L.; GOODING, Karen M.; WEHR, Tin. **Basic HPLC and CE of Biomolecules**. Bay Bioanalytical Laboratory, 1998. 388 p.

DYPBUKT, J *et al.* A sensitive and selective assay for chloramine production by myeloperoxidase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39, n. 11, p.1468-1477, 1 dez. 2005.

FLEMMIG, J. *et al.* Detection of the halogenating activity of heme peroxidases in leukocytes by aminophenyl fluorescein. **Free Radic Res**, v. 49, n. 6, p.768-776, jun. 2015.

FORBES, L. V. *et al.* Potent Reversible Inhibition of Myeloperoxidase by Aromatic Hydroxamates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 51, p.36636-36647, 5 nov. 2013.

FU, X. *et al.* Hypochlorous Acid Oxygenates the Cysteine Switch Domain of Pro-matrilysin (MMP-7): A MECHANISM FOR MATRIX METALLOPROTEINASE ACTIVATION AND ATHEROSCLEROTIC PLAQUE RUPTURE BY MYELOPEROXIDASE. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 44, p.41279-41287, 30 ago. 2001.

FURTMÜLLER, Paul Georg; BURNER, Ursula; OBINGER, Christian. Reaction of Myeloperoxidase Compound I with Chloride, Bromide, Iodide, and Thiocyanate. **Biochemistry**, v. 37, n. 51, p.17923-17930, dez. 1998.

FURTMÜLLER, Paul Georg *et al.* Spectral and Kinetic Studies on the Formation of Eosinophil Peroxidase Compound I and Its Reaction with Halides and Thiocyanate †. **Biochemistry**, v. 39, n. 50, p.15578-15584, dez. 2000a.

FURTMÜLLER, Paul G. *et al.* Mechanism of reaction of myeloperoxidase with hydrogen peroxide and chloride ion. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 19, p.5858-5864, out. 2000b.

GIOIA, de *et al.* A theoretical three-dimensional model for lactoperoxidase and eosinophil peroxidase, built on the scaffold of the myeloperoxidase X-ray structure. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 1, n. 5, p.476-485, 14 out. 1996.

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.

HAZELL, Linda J.; STOCKER, Roland. Oxidation of low-density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages. **Biochemical Journal**, v. 290, p.165-172, 1993.

HUANG, Jiansheng *et al.* Inactivation of myeloperoxidase by benzoic acid hydrazide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 570, p.14-22, mar. 2015.

JANTSCHKO, Walter *et al.* Exploitation of the unusual thermodynamic properties of human myeloperoxidase in inhibitor design. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, n. 8, p.1149-1157, abr. 2005.

JUNQUEIRA, Roberto Gonçalves. **Limites dos Sistemas Analíticos Limites dos Sistemas Analítico**. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/docs/Limites_Sistemas_analiticos.pdf>. Acesso em: 09 jun. 2016.

KETTLE, Anthony J.; GEDYE, Craig A.; WINTERBOURN, Christine C.. Mechanism of inactivation of myeloperoxidase by 4-aminobenzoic acid hydrazide. **Biochemistry**, v. 321, p.503-508, 1997.

KETTLE, Anthony J.; WINTERBOURN, Christine C.. A Kinetic Analysis of the Catalase Activity of Myeloperoxidase †. **Biochemistry**, v. 40, n. 34, p.10204-10212, ago. 2001.

KETTLE, Anthony J. *et al.* Measuring chlorine bleach in biology and medicine. **Biochimica et Biophysica Acta (bba) - General Subjects**, v. 1840, n. 2, p.781-793, fev. 2014.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. **Journal of Bacteriology**, v. 95, n. 6, p. 2131-2138, jun. 1968.

KLEBANOFF, S. J.. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, n. 5, p.598-625, 26 jan. 2005.

KUBATOVA, Alena. **Determination of LODs (limits of detection) and LOQs (limit of quantification)**. Disponível em: <https://arts-sciences.und.edu/chemistry/kubatova-research-group/_files/docs/determination_of_lods_new.pdf>. Acesso em: 09 jun. 2016.

LAU, Denise; BALDUS, Stephan. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, n. 1, p.16-26, jul. 2006.

LIU, Fengyu *et al.* Reversible and selective luminescent determination of ClO⁻ /H₂S redox cycle in vitro and in vivo based on a ruthenium trisbipyridyl probe. **The Analyst**, v. 139, n. 13, p.3324-3329, 2014.

LORIA, Valentina *et al.* Myeloperoxidase: A New Biomarker of Inflammation in Ischemic Heart Disease and Acute Coronary Syndromes. **Mediators of Inflammation**, p.1-4, 2008.

LU, T *et al.* Analysis of the mechanism by which melatonin inhibits human eosinophil peroxidase. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 6, p.1308-1317, jul. 2008.

MACPHERSON, J. C. *et al.* Eosinophils are a Major Source of Nitric Oxide-Derived Oxidants in Severe Asthma: Characterization of Pathways Available to Eosinophils for Generating Reactive Nitrogen Species. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 9, p.5763-5772, 1 maio 2001.

MALLE, E. *et al.* Myeloperoxidase: a target for new drug development? **British Journal of Pharmacology**, v. 152, p.838-854, 2007.

MARSCHE, G.. Hypochlorite-modified High Density Lipoprotein, a High Affinity Ligand to Scavenger Receptor Class B, Type I, Impairs High Density Lipoprotein-dependent Selective

Lipid Uptake and Reverse Cholesterol Transport. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 35, p.32172-32179, 17 jun. 2002.

MARTINS, André Bittencourt. **Concentração e atividade sérica da mieloperoxidase em indivíduos Tabagistas**. 2010. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2010.

NICHOLLS, S. J.. Myeloperoxidase and Cardiovascular Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 6, p.1102-1111, 1 jun. 2005.

NUSSBAUM, Claudia *et al.* Myeloperoxidase: A Leukocyte-Derived Protagonist of Inflammation and Cardiovascular Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 6, p.692-713, 20 fev. 2013.

O'BRIEN, Peter J.. Peroxidases. **Chemico-biological Interactions**, v. 129, n. 1-2, p.113-139, 2000.

PATTISON, D.I.; DAVIES, M.J.. Reactions of Myeloperoxidase-Derived Oxidants with Biological Substrates: Gaining Chemical Insight into Human Inflammatory Diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, p.3271-3290, 2006.

PAUMANN-PAGE, Martina *et al.* Inactivation of human myeloperoxidase by hydrogen peroxide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 539, n. 1, p.51-62, nov. 2013.

PAVIA, Donald L. *et al.* **Introdução À Espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 716 p. Tradução Pedro Barros.

POULOS, Thomas L.; KRAUT, Joseph. The Stereochemistry of Peroxidase Catalysis*. **The Journal of Biological Chemistry**, Califórnia, v. 255, n. 17, p.8199-8205, jan. 1980.

ROSE, Alexander S. *et al.* Web-based molecular graphics for large complexes. **Proceedings Of The 21st International Conference On Web3d Technology - Web3d '16**, p.185-186, 2016.

ROSE, Alexander S.; HILDEBRAND, Peter W.. NGL Viewer: a web application for molecular visualization. **Nucleic Acids Research**, v.43, n. 1, p.576-579, 29 abr. 2015.

SCHINDHELM, Roger K. *et al.* Myeloperoxidase: A Useful Biomarker for Cardiovascular Disease Risk Stratification? **Clinical Chemistry**, p.1462-1470, 2009.

SENTHILMOHAN, Revathy; KETTLE, Anthony J.. Bromination and chlorination reactions of myeloperoxidase at physiological concentrations of bromide and chloride. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, n. 2, p.235-244, jan. 2006.

SETSUKINAI, K.-i. *et al.* Development of Novel Fluorescence Probes That Can Reliably Detect Reactive Oxygen Species and Distinguish Specific Species. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 5, p.3170-3175, 4 nov. 2002.

SIBBETT, Scott S.; KLEBANOFF, Seymour J.; HURST, James K.. Resonance Raman characterization of the heme prosthetic group in eosinophil peroxidase. **Febs Letters**, v. 189, n. 2, p.271-275, 23 set. 1985.

SILVA, Railmara Pereira da; FREITAS, Sheila Cristina Monteiro Paiva. **XII Curso de Verão - Portal do conhecimento do departamento de bioquímica**: Universidade de São Paulo. [2016]. Disponível em: <http://cursobioquimica.iq.usp.br/paginas_view.php?idPagina=245&idTopico=862#.WEA1A_krLIV>. Acesso em: 9 nov. 2016.

SLUNGAARD, Arne; MAHONEY JR, John R.. Bromide-dependent toxicity of eosinophil peroxidase for endothelium and isolated working rat hearts: a model for eosinophilic endocarditis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 173, n. 1, p.117-123, 1991.

SOKOLOV, A. V. *et al.* Kinetic method for assaying the halogenating activity of myeloperoxidase based on reaction of celestine blue B with taurine halogenamines. **Free Radic Res**, v. 49, n. 6, p.777-789, jun. 2015.

SONG, Ping *et al.* Association of Plasma Myeloperoxidase Level with Risk of Coronary Artery Disease in Patients with Type 2 Diabetes. **Disease Markers**, v. 2015, p.1-5, 2015.

STAMP *et al.* Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 51, p. 1796-1803, jul.2012.

STELMASZYNSKA, Teresa; ZGLICZYNSKI, Jan M.. Myeloperoxidase of Human Neutrophilic Granulocytes as Chlorinating Enzyme. **European Journal of Biochemistry**, v. 45, n. 1, p.305-312, jun. 1974.

TAKEUCHI, Toyohide. 1.2.5. HPLC of amino acids as dansyl and dabsyl derivatives. **Journal of Chromatography Library**, p.229-241, 2005.

THEORELL H, AKESON, A. Highly purified milk peroxidase. Arkiv for Kemi, **Minerologi, och Geologi**, v. 17, p. 1-6, 1943.

TIDÉN, ANNA-KARIN *et al.* 2-Thioxanthines Are Mechanism-based Inactivators of Myeloperoxidase That Block Oxidative Stress during Inflammation. **The Journal of Biological Chemistry**. p. 1-14, 2011.

TIYERILI, Vedat *et al.* Neutrophil-derived myeloperoxidase promotes atherogenesis and neointima formation in mice. **International Journal of Cardiology**, v. 204, p.29-36, fev. 2016.

VAN ANTWERPEN, P.; BOUDJELTIA, K. Zouaoui. Rational drug design applied to myeloperoxidase inhibition. **Free Radic Res**, v. 49, n. 6, p.711-720, jun. 2015.

VAN DALEN, C J; KETTLE, A J. Substrates and products of eosinophil peroxidase. **Biochemical Journal**, New Zealand, v. 358, p.233-239, ago. 2001.

VAN DER VEEN, Betty S. *et al.* Myeloperoxidase: Molecular Mechanisms of Action and Their Relevance to Human Health and Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 11, p.2899-2937, 2009.

VASCONCELLOS NETO, João Ronaldo Tavares de. Diversidade e seleção de fungos basidiomicetos afiloforóides para produção de enzimas lignocelulolíticas em área de mata atlântica do sul da Bahia. 2010. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA, 2010.

VIVEKANANDAN-GIRI, A. *et al.* High density lipoprotein is targeted for oxidation by myeloperoxidase in rheumatoid arthritis. **Annals of The Rheumatic Diseases**, v. 72, n. 10, p.1725-1731, 12 jan. 2013.

WANG, Jianguo; SLUNGAARD, Arne. Role of eosinophil peroxidase in host defense and disease pathology. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, n. 2, p.256-260, jan. 2006.

WANG, Q. *et al.* Myeloperoxidase Deletion Prevents High-Fat Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. **Diabetes**, v. 63, n. 12, p.4172-4185, 14 jul. 2014.

WARD, Jessica *et al.* Mechanistic Characterization of a 2-Thioxanthine Myeloperoxidase Inhibitor and Selectivity Assessment Utilizing Click Chemistry–Activity-Based Protein Profiling. **Biochemistry**, v. 52, n. 51, p.9187-9201, 23 dez. 2013.

WEISS, Stephen J. *et al.* Chlorination of Taurine by Human Neutrophils. **Journal of Clinical Investigation**, v. 70, n. 3, p.598-607, 1 set. 1982.

WEVER, Ron; PLAT, Henk; HAMERS, Mic N.. Human eosinophil peroxidase: a novel isolation procedure, spectral properties and chlorinating activity. **Febs Letters**, v. 123, n. 2, p.327-331, 26 jan. 1981.

WU, Weijia *et al.* 3-Bromotyrosine and 3,5-Dibromotyrosine Are Major Products of Protein Oxidation by Eosinophil Peroxidase: Potential Markers for Eosinophil-Dependent Tissue Injury in Vivo †. **Biochemistry**, v. 38, n. 12, p.3538-3548, mar. 1999.

XIMENES, Valdecir Farias; MORGON, Nelson Henrique; SOUZA, Aguinaldo Robinson de. Hypobromous acid, a powerful endogenous electrophile: Experimental and theoretical studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 146, p.61-68, maio 2015.

ZENG, J.; FENNA, R.e.. X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 226, n. 1, p.185-207, jul. 1992.

ZHANG, Chunxiang *et al.* Interaction of myeloperoxidase with vascular NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species in vasculature: implications for vascular diseases. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 285, n. 6, p.2563-2572, 12 nov. 2003.

ZHANG, Min *et al.* Dansyl-8-aminoquinoline as a sensitive pH fluorescent probe with dual-responsive ranges in aqueous solutions. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. China, p. 682-686. 2014.