

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

EMILIANE PEREIRA LAIGNIER

**NITRÓXIDOS COMO REGULADORES DA PRODUÇÃO
DE OXIDANTES POR MACRÓFAGOS**

Alfenas/MG
2008

EMILIANE PEREIRA LAIGNIER

**NITRÓXIDOS COMO REGULADORES DA PRODUÇÃO
DE OXIDANTES POR MACRÓFAGOS**

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre
em Ciências Farmacêuticas pela
Universidade Federal de Alfenas. Área de
concentração: Área 2.

Orientadora: Profa. Dra. Maísa Ribeiro
Pereira Lima Brigagão.

Alfenas/MG
2008

EMILIANE PEREIRA LAIGNIER

**NITRÓXIDOS COMO REGULADORES DA PRODUÇÃO
DE OXIDANTES POR MACRÓFAGOS**

A Banca Examinadora abaixo-assinada,
aprova a Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela
Universidade Federal de Alfenas. Área de
concentração: Área 2.

Aprovada em:

Profº.
Instituição:

Assinatura:

Profº.
Instituição:

Assinatura:

Profº.
Instituição:

Assinatura:

Ao meu Grande DEUS pelo dom da vida, pela saúde e pelo trabalho. Aos meus Pais (Ademar e Lucinda) e Irmãs (Dani e Rafa), pelo amor, apoio, dedicação e principalmente a compreensão às minhas ausências para a conclusão deste curso.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alfenas- MG, pela oportunidade concedida para a realização deste curso.

À Profa. Dra. Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão pela orientação e confiança para a execução deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica que colaboraram de alguma forma na execução deste trabalho. Deixo aqui meu agradecimento principalmente à Luciana Chavasco e ao Samuel que se tornaram não apenas colegas de laboratório, mas meus amigos tanto nas horas boas quanto nas horas ruins.

Aos Amigos e colegas de Mestrado, que nestes dois sempre acrescentaram em minha formação e vida, eterna gratidão a todos.

Às minhas amigas Carla Sandra, Layanne e Michele, pelas palavras que serviram de incentivo e apoio durante esta caminhada e pela amizade que será para a vida toda.

Aos Funcionários da UNIFAL-MG, em especial, aos Funcionários do Laboratório de Bioquímica Básica pela colaboração e ajuda prestada.

Ao Prof. Dr. Pio Colepicolo, Profa. Dra. Ohara Augusto e Dra. Edlaine Linares, todos pertencentes ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP), ao Prof. Roberto Martins Lourenço, Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), que gentilmente cederam seus laboratórios para a execução de alguns experimentos.

A CAPES- REUNI; CNPq-Redoxoma; UNIFAL-MG, pelo apoio financeiro.

A Todos aqueles que de alguma maneira colaboraram para a execução deste trabalho.

Resumo

Os tióis são importantes para manter as funções celulares. A glutathiona (GSH) é um importante peptídeo redutor que repara biomoléculas oxidadas envolvidas na sinalização celular e atua como “scavenger” de biorradicais, quando, neste último caso, forma-se o radical glutationila (GS^{\bullet}). Para investigar o papel dos radicais tiila (RS^{\bullet}) durante o “burst” respiratório de macrófagos, foi usado o nitróxido 4-9((-acridinecarbonil)-amino)-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (Ac-Tempo) o qual reage com radicais, particularmente tiila e radicais centrados no carbono, apagando o sinal de EPR, enquanto ocorre aumento de fluorescência da acridina (λ_{ex} 361 nm, λ_{em} 440 nm) (Borisenko et al. JACS 126, 9221, 2004). Macrófagos de focos inflamatórios peritoneais não estimuladas mostraram um baixo sinal de fluorescência acompanhado pela manutenção do sinal de EPR característico do Ac-Tempo. Estímulo celular com PMA, na presença de Ac-Tempo, elicitou sinal de fluorescência dose-dependente, em sincronia com a redução do sinal de EPR e com consumo de O_2 . Mudanças na intensidade do sinal de fluorescência e de EPR foram dependentes dos níveis celulares de GSH, demonstrado pelo pré-tratamento das células com butionina sulfoximina (BSO) e *N*-etilmaleimida (NEM). O tratamento celular com o nitróxido determinou diminuição do processo de S-glutathionação protéica associado à atividade do complexo NADPH oxidase. Os resultados sugerem um papel central de radicais tiila, provavelmente GS^{\bullet} , na manutenção do “burst” respiratório de macrófagos e apontam os nitróxidos como protótipos de antiinflamatórios.

Palavras-chave: nitróxido; macrófago, radical tiila; inflamação; “burst” respiratório.

Abstract

Thiols are required to maintain cellular functions. For instance, glutathione (GSH) is an important reductant to repair oxidized biomolecules, to cycle proteins involved in cell signaling and to scavenge bioradicals, although the relatively reactive glutathionyl radical (GS•) is produced in the latter case. To investigate GS• participation in macrophage respiratory burst, we employed the nitroxide 4-(9-acridinecarbonyl)-amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (Ac-Tempo) whose interaction with GS• and carbon centered radicals switches off Ac-Tempo EPR signal while switching on acridine moiety fluorescence (λ_{exc} 361 nm, λ_{emi} 440 nm) (Borisenko et al JACS 126, 9221,2004). Inflammatory macrophages unstimulated displayed low fluorescence accompanied by maintenance of Ac-Tempo EPR signal. Cells stimulated with PMA in the presence of Ac-Tempo elicited a dose-dependent fluorescence in synchrony with EPR signal decay and O₂ consumption. Changes in fluorescence and EPR signal intensity were dependent on GSH levels as demonstrated by pre-treatment of cells with buthionine sulfoximine and *N*-ethylmaleimide. The macrophage protein S-glutathionylation process due to NADPH oxidase activation was significantly decreased under Ac-Tempo cellular treatment. These results suggest a role of thiol radicals in the maintenance of the macrophages respiratory burst and may provide a therapeutic target for inflammation management.

Key words: nitroxide; macrophage; thiol radical; inflammation; respiratory burst.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	09
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1. O processo inflamatório	10
2.2. O complexo NADPH oxidase	15
2.3. O processo pós-traducional de S-glutationação protéica	21
2.4. Nitróxidos e suas aplicações biológicas	24
2.4.1 Metabolismo dos nitróxidos	26
2.4.2 Atividade antioxidante e protetora dos nitróxidos	27
3. OBJETIVOS	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Isolamento dos macrófagos peritoneais	30
4.2. Viabilidade celular	31
4.3. Determinação da concentração protéica total	32
4.4. Efeito de Ac-Tempo sobre a atividade do complexo NADPH oxidase	32
4.5. Verificação da produção de radicais tiila por macrófagos	33
4.6. Determinação da razão GSH/GSH+0,5 GSSG celular	35
4.7. Determinação de S-glutationação protéica	36
4.8. Análise Estatística	38
5. RESULTADOS	38
5.1. População fagocitária de focos inflamatórios crônicos peritoneais	38
5.2. Viabilidade celular de macrófagos inflamatórios tratados com Ac-Tempo	39
5.3. Efeito de Ac-Tempo na atividade do complexo NADPH oxidase de macófagos peritoneais	40
5.4. Verificação da produção de radicais tiila em sistema modelo	41
5.5. Produção de radicais tiila por macrófagos peritoneais	46
5.6. Determinação da concentração celular de GSH e GSSG	50
5.7. Determinação da s-glutationação protéica em macrófagos e efeito de Ac-Tempo sobre esse processamento pós-traducional	54
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÕES	65

INTRODUÇÃO

Com o aumento na expectativa de vida da população, aliado ao crescimento exponencial dos custos médico-hospitalares, a sociedade necessita vencer constantes desafios, através do desenvolvimento de novos conhecimentos científicos e de novas tecnologias que resultem em modificações importantes no estilo de vida das pessoas. O estudo do controle da homeostasia bioquímica é um desses novos conceitos, dirigido no sentido de maximizar as funções fisiológicas de cada indivíduo, de maneira a assegurar tanto o bem-estar quanto a saúde, como também o risco mínimo de desenvolvimento de doenças ao longo da vida.

Nos últimos anos, há uma grande busca a agentes antiinflamatórios potentes que não apresentem os efeitos colaterais típicos das drogas esteroidais. Recentemente, o fato de que antiinflamatórios comercializados como fármacos seguros, foram mostrados como compostos danosos, em alguns casos, letais, levanta a hipótese de que vias bioquímicas diferentes devem ser estudadas detalhadamente como possíveis alvos celulares para novos compostos. Aliado a isto, o fato de que a longevidade da população está aumentando significativamente, o que determina uma incidência mais prolongada de patologias com componentes inflamatórios, torna de vital importância a pesquisa de novos mecanismos de prevenção e/ou minimização destas alterações do organismo.

A possibilidade de elucidação de novos alvos bioquímicos no controle do processo inflamatório é um desafio para um grande número de pesquisadores, uma vez que estudos nesta área implicam em compreensão de respostas celulares ao nível molecular e planejamento e execução de experimentos sob estrito controle.

Assim, a concentração de esforços na busca de regulação de vias bioquímicas específicas foi alvo desse trabalho, especialmente aquelas vias que elicitam a produção de espécies oxidantes que modulam a resposta inflamatória. Especificamente, a resposta oxidativa de fagócitos inflamatórios ao tratamento com nitróxido foi testada, visando estudar a hipótese de compostos dessa classe química atuarem como agentes de modulação dessa resposta fisiológica.

2. REVISAO DE LITERATURA

2.1. O processo inflamatório

No decurso de milhões de anos de evolução, os animais vertebrados desenvolveram elaborados sistemas de defesa contra a invasão de patógenos, onde os fagócitos profissionais (neutrófilos ou leucócitos polimorfonucleares, eosinófilos e fagócitos mononucleares) desempenham um papel essencial para a sobrevivência do organismo. Estas células sanguíneas da série branca são capazes de reconhecer, fagocitar, matar, e eliminar a maioria dos agentes patogênicos que invadem um hospedeiro através do processo inflamatório (SALYERS; WHITT, 1994; BABIOR, 2000).

Inflamação (do latim *inflamare*) é uma resposta de um tecido vascularizado a uma injúria sofrida por este tecido, sendo caracterizada pela saída de células e líquido de sangue para o interstício. Pode ser desencadeada por agentes físicos, infecções microbianas, substâncias químicas, tecidos necróticos ou reações imunes. Os sinais cardinais do processo inflamatório são: calor, rubor, tumor e dor. Além disso, a perda de função do tecido ou órgão afetado também pode ser considerada como um sinal clássico. Assim, mesmo o processo inflamatório sendo um mecanismo de defesa do organismo, em muitos casos pode acarretar sérios danos à funcionalidade do organismo (BRASILEIRO FILHO, 2000;COTRAN, 2000).

Durante o processo inflamatório, ocorre no local da injúria uma elevação do suprimento sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular, migração de leucócitos (granulócitos, monócitos e linfócitos) e, simultaneamente, indução da liberação de mediadores bioquímicos, tais como proteínas de fase aguda, eicosanóides e citocinas, em uma resposta coordenada do organismo (Figura 1). Com a interrupção da ação do agente inflamatório, a liberação de mediadores é diminuída, a microcirculação retoma o equilíbrio hemodinâmico original e as células exsudadas retornam à circulação sanguínea, geralmente pelos vasos linfáticos. Quando ocorre necrose, fragmentos tissulares são fagocitados e, em seguida, advem a cicatrização ou regeneração,

dependendo do grau da lesão e do órgão acometido (BRASILEIRO FILHO, 2000; OHSHIMA et al, 2005).

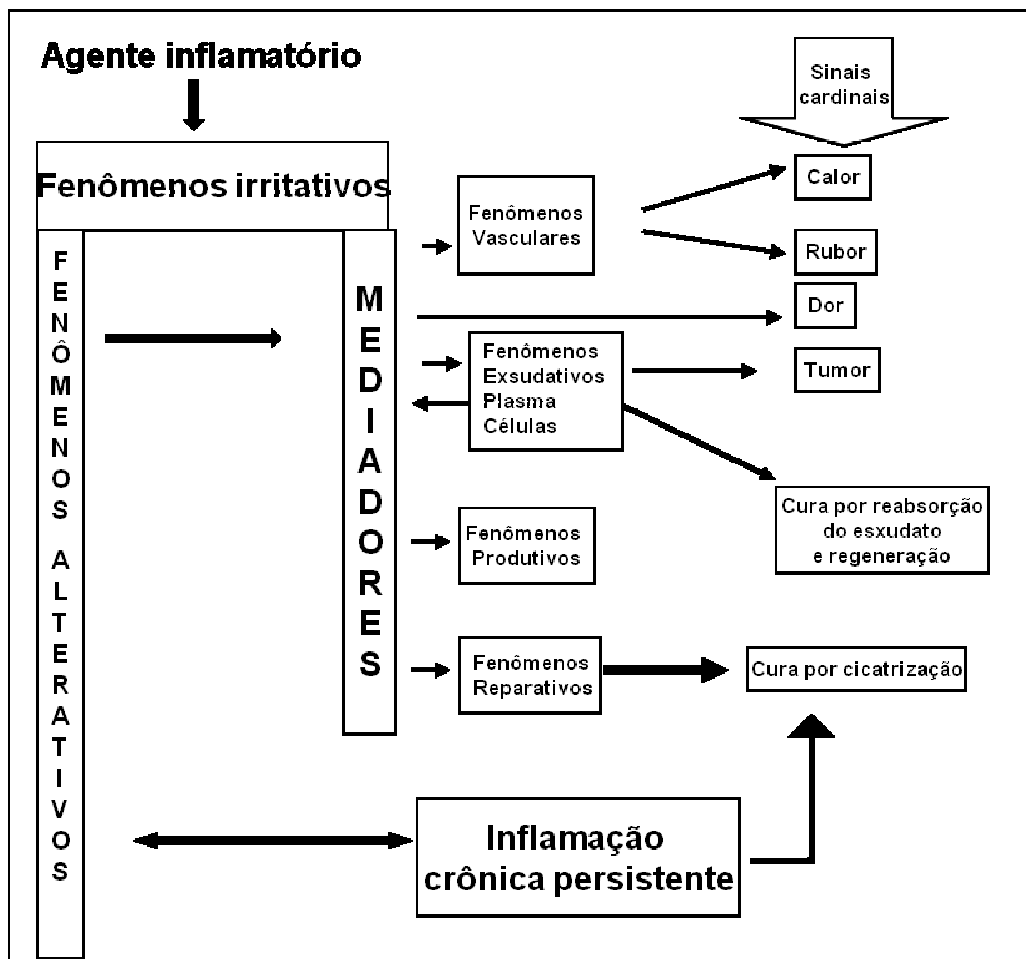


Figura 1: Relação entre o processo inflamatório e os mediadores da inflamação.
Adaptado de BRASILEIRO FILHO, 2000.

O processo inflamatório pode ser caracterizado como agudo ou crônico, sendo a diferenciação feita pelo tempo de duração do processo e pelo tipo celular predominante no foco inflamatório. Na inflamação aguda, o período de duração é relativamente curto, levando de alguns minutos a alguns dias. Alterações no calibre vascular fazem com que aconteça um aumento no fluxo sanguíneo provocando calor e rubor, envolve exsudação

de fluido e migração predominantemente de neutrófilos, causando dor e edema (BRASILEIRO FILHO, 2000; COTRAN, 2000; SARKAR; FISHER, 2006).

Se o fator lesivo ao organismo não for eliminado pelos neutrófilos em um curto espaço de tempo, na inflamação aguda, ocorre então recrutamento de monócitos circulantes, que se infiltram na área lesada e diferenciam-se em macrófagos, caracterizando a inflamação crônica. Esta origina-se em resposta à continuidade da inflamação aguda ou como resposta à exposição prolongada e de baixa intensidade a agentes agressores. Além de macrófagos, no local de injúria ocorre a infiltração de linfócitos, paralelamente à proliferação de vasos sanguíneos e tecido conjuntivo. A ação destes fagócitos mononucleados é modulada por uma vasta gama de fatores liberados pelos mesmos e por células endoteliais (MIZEL; JARET, 1985; CAMARERO *et al.*, 1990).

No processo crônico da inflamação ocorre simultaneamente destruição tecidual e tentativa de reparo do processo. O dano tecidual deve-se, primordialmente, à atividade proteolítica e geração contínua de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (OHSHIMA *et al.*, 2005; SARKAR; FISHER, 2006) pelos fagócitos.

O sistema mononuclear fagocitário é o principal efetor pela ocorrência da inflamação crônica. Os monócitos são atraídos para o tecido atingido por intermédio de adesão molecular ou por fatores quimiotáticos, que, ao atingirem tecidos extravasculares tornam-se ativados por citocinas secretando uma variedade de produtos que resulta em injúria tecidual e fibrose (COTRAN, 2006; SARKAR; FISHER, 2006)

O início e a manutenção da resposta inflamatória devem-se aos mediadores químicos que desempenham diversas funções. Estes mediadores incluem: (i) Aminas vasoativas, representadas por histamina e serotonina, que provocam vasodilatação e aumento na permeabilidade vascular. (ii) Proteínas plasmáticas que incluem os sistemas do complemento, o conjunto das cininas e o sistema de coagulação. O sistema do complemento é rigorosamente controlado por proteínas plasmáticas e circulantes que agem na lise celular, permeabilidade vascular, através de C3a e C5a

que estimulam a liberação de histamina, opsonização e fagocitose através de C3b. As cininas agem na vasodilatação, permeabilidade vascular e dor por intermédio da bradicinina. Além disso, atuam através da ativação do fator XII, convertendo pré-caliceína em caliceína, que tem atividade quimiotática, capacidade de aumentar a permeabilidade vascular e adesão celular. O sistema de coagulação está intimamente ligado ao fator XII, ou fator de Hageman, que determina produção de plasmina, agente causador de aumento da permeabilidade vascular. (iii) Citocinas, mediadores pró-inflamatórios que influenciam em vários aspectos e têm como principais representantes o fator de necrose tumoral (TNF), diferentes interleucinas (IL), e as quimiocinas, todos mediadores bioquímicos que mantêm o processo inflamatório através do estímulo de células endoteliais. (iv) Agentes oxidantes (BRASILEIRO FILHO, 2000; ROITT, 2004; COTTRAN, 2006).

A sequência de eventos no qual as células fagocitárias reconhecem e eliminam agentes estranhos ao organismo é bem conhecida, tendo sido reportada pela primeira vez nos anos finais de 1800 por um cientista russo, Ellie Metchnikoff (1883, apud BABIOR, 2000) constituindo o processo de fagocitose. Nesse processo, agentes estranhos ao organismo, após o engolfamento pela membrana plasmática dos fagócitos com formação do fagossoma, são internalizados e destruídos. A capacidade de “killing” dos fagócitos baseia-se em dois mecanismos distintos, onde a produção de espécies químicas oxidantes (mecanismo oxidativo) associa-se à liberação de proteínas digestivas e microbidas (mecanismo não-oxidativo) no fagossoma. O mecanismo oxidante ocorre através da produção de ERO e de ERN no fagossoma, com a ativação de um sistema enzimático denominado NADPH oxidase e das enzimas óxido nítrico sintases (NOS). Essas últimas expressam-se como três isoformas (nNOS, neuronal; iNOS, induzível; eNOS, endotelial) capazes de produzir óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$), mediador pleiotrópico da inflamação que atua diretamente na vasodilatação, através da ativação de guanilato ciclase, e possui atividade microbicida quando da formação de espécies fortemente oxidantes como peroxinitrito (ONOO^-), S-nitrosotióis (RSNO^-) e dióxido de nitrogênio (NO_2^-). Essa atividade microbicida é diretamente dependente da produção

concomitante de ERO, o que pode levar a severos danos tissulares (CHAN et al., 2001; SARKAR; FISHER , 2006; NAGY et al., 2007).

A Figura 2, abaixo, sumariza a seqüência de eventos inter-relacionados em um processo inflamatório, que pode levar a dano tecidual e/ou determinar sinalização celular específica.

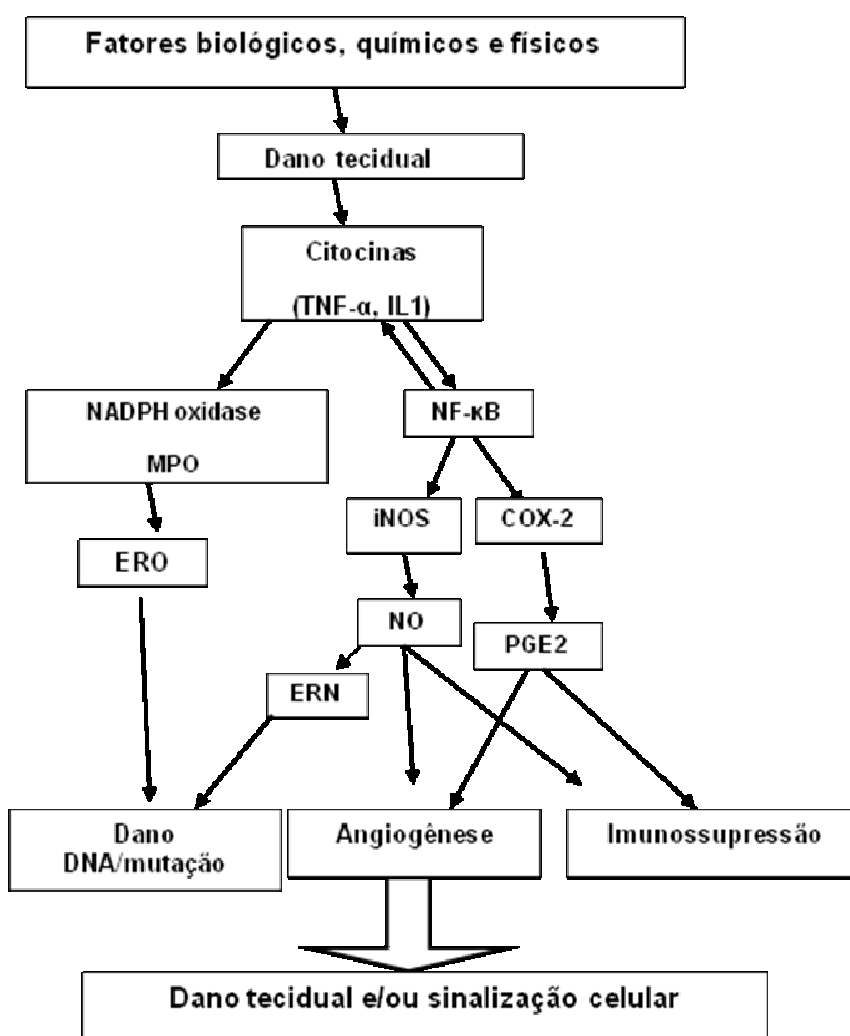


Figura 2. Eventos relacionados ao processo inflamatório, mostrando a produção de ERO/ERN, e de mediadores pró-inflamatórios e as possíveis respostas celulares. Adaptado de OHSHIMA et al, 2005.

2.2. O complexo NADPH oxidase

Em 1935 foi sugerido pela primeira vez que produtos oxigenados estariam envolvidos na capacidade de fagócitos profissionais matarem microorganismos (Baldrige & Gerard, 1935 apud BABIOR, 2000), mas só na década de 50 ficou bem estabelecido este envolvimento. Sbarra & Karnovsky publicaram um trabalho no qual mostravam que a capacidade de “killing” dos fagócitos acontecia com um aumento abrupto do consumo de oxigênio, acompanhado por alterações no metabolismo do oxigênio e ativação da via das pentoses-fosfato (BABIOR, 2000).

Esse processo, hoje denominado “burst” respiratório ou “burst” oxidativo, ocorre com formação de uma vasta gama de ERO/ERN. A primeira espécie reativa a ser formada é o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que é produzido por uma reação entre o oxigênio extracelular e o NADPH, resulta da atividade catalítica do complexo enzimático NADPH oxidase. A alta afinidade ($K_M \cong 10\mu M$) com o oxigênio molecular, o acceptor final de elétrons na reação, permite confirmar que este complexo produz $O_2^{\bullet-}$ nas baixas tensões de oxigênio que prevalecem nas células de tecidos aeróbicos infectadas por agentes invasores (MORE et al., 1991; BABIOR, 1992). O “burst” respiratório ocorre conforme a estequiometria da reação abaixo:



Em células não estimuladas o sistema NADPH oxidase está dormente e seus componentes estão dissociados com frações presentes no citossol e na membrana de grânulos secretórios. A ativação do “burst” respiratório envolve profundas mudanças de localização e atividade de diferentes componentes deste complexo enzimático (BORREGAARD; TAUBER, 1984; BABIOR, 2004).

O complexo NADPH oxidase possui componentes presentes no citossol ($p47^{phox}$, $p40^{phox}$, $p67^{phox}$) e outros localizados em membranas de vesículas secretórias ($gp91^{phox}$ e $p22^{phox}$) (BABIOR, 1999).

O primeiro componente descrito como associado à membrana foi o citocromo b_{245} , na década de 60. Posteriormente, suas subunidades foram identificadas como duas proteínas, $gp91^{phox}$ e $p22^{phox}$, que, juntas, formam a heme proteína redenominada citocromo b_{558} , que apresenta um baixo potencial de redução (-245 mV). A proteína $gp91^{phox}$ consiste de um polipeptídeo catiônico de 53-56 kDa, com três segmentos transmembrana (PARKOS et al., 1987; ISOGAI et al., 1991).

A outra subunidade do citocromo b_{558} , a proteína não glicosilada $p22^{phox}$, apresenta apenas um domínio hidrofóbico que constitui sua região transmembrana. Considerado o doador final de elétrons no complexo NADPH oxidase, o citocromo b_{558} , que se encontra em membranas de grânulos secretórios em células não estimuladas (KOBAYASHI et al., 1998), apresenta dois grupamentos heme, sendo um deles posicionado entre as subunidades $gp91^{phox}$ e $p22^{phox}$, posição não usual para proteínas desta classe, e outro ligado às histidinas 94 e 116 da $p22^{phox}$, posição semelhante àquelas ocorrentes em outras heme proteínas como mioglobina e citocromo b_5 . A presença da proteína Rap 1A, existente na membrana dos grânulos secretórios, sugere a participação da mesma na montagem do complexo, dirigindo a fusão da membrana desses grânulos à membrana plasmática, na região de formação do fagossoma (JESIAITIS et al., 1991; ROTROSEN et al., 1992; KOBAYASHI et al., 1998).

Entre os componentes citossólicos da NADPH oxidase, um grupo de fosfoproteínas de migração relativa entre 45-49 kDa foram identificados. Estas proteínas foram extensamente estudadas, e hoje são designadas $p47^{phox}$, sendo que, em recentes estudos, são mostradas como oito isoformas de fosfoproteínas com pI na faixa de 6,8 a 10, com um único precursor não fosforilado que pode ser detectado por "immunoblotting". Encontrada exclusivamente no citossol em fagócitos não estimulados, a $p47^{phox}$ é parcialmente transferida para a membrana quando as células recebem diferentes estímulos que determinam a produção de $O_2^{\bullet-}$ (LOMAX et al., 1989; VOLPP et al., 1989).

Um segundo componente citossólico desta oxidase, denominado $p67^{phox}$, também sofre translocação do citossol para a membrana quando fagócitos são ativados. Evidências sugerem que esta proteína interage com lipídeos de membrana

durante a ativação da NADPH oxidase, ligando-se ao citoesqueleto através de sua região carboxiterminal (BABIOR, 1992; VAN BRUGGEN et al., 2003; BABIOR, 2004).

Mais recentemente, a investigação da função da proteína citossólica p40^{phox} no complexo NADPH oxidase apontou-a como um regulador negativo da atividade do complexo enzimático, paralelamente à fosforilação do resíduo 154 de treonina pela proteína quinase C (LOPES et al., 2004). Adicionalmente, isoformas de proteínas ligadoras de nucleotídeos de guanina da família *Ras*, Rac 1 e Rac 2 (isoladas de macrófagos de ratos e de neutrófilos humanos, respectivamente) foram mostradas como essenciais na atividade de NADPH oxidase. Estas se associam à membrana, e, paralelamente à proteína Rap 1A, regulam a polimerização da actina (SEGAL et al., 2000). A função desta na ativação do complexo NADPH oxidase é dependente da translocação das frações p47^{phox} e p67^{phox}, evidenciada claramente em experimentos com neutrófilos de portadores de doença granulomatosa crônica (DGC), onde falta uma ou as duas subunidades, não ocorrendo, então, mudança de localização da fração p40^{phox} (TSUNAWAKI et al., 1994; MATUTE et al., 2005).

A importância do complexo NADPH oxidase pode ser percebida no caso da DGC, uma imunodeficiência congênita, na qual os fagócitos não possuem capacidade microbicida oxidante. Estes pacientes são suscetíveis a infecções recorrentes por fungos e bactérias, manifestadas por abscessos que afetam tecidos subcutâneos profundos. (BABIOR, 2000; BOER et al., 2005). Trabalhos recentes demonstram que o complexo NADPH oxidase, e não enzimas degranuladas, como mieloperoxidase (MPO), têm a responsabilidade na defesa das células em condições de linfopenia contra infecções espontâneas (OSTANIN et al., 2007).

A Figura 3 ilustra a ativação do complexo NADPH oxidase, destacando-se a liberação do O₂^{•-} no fagossoma.

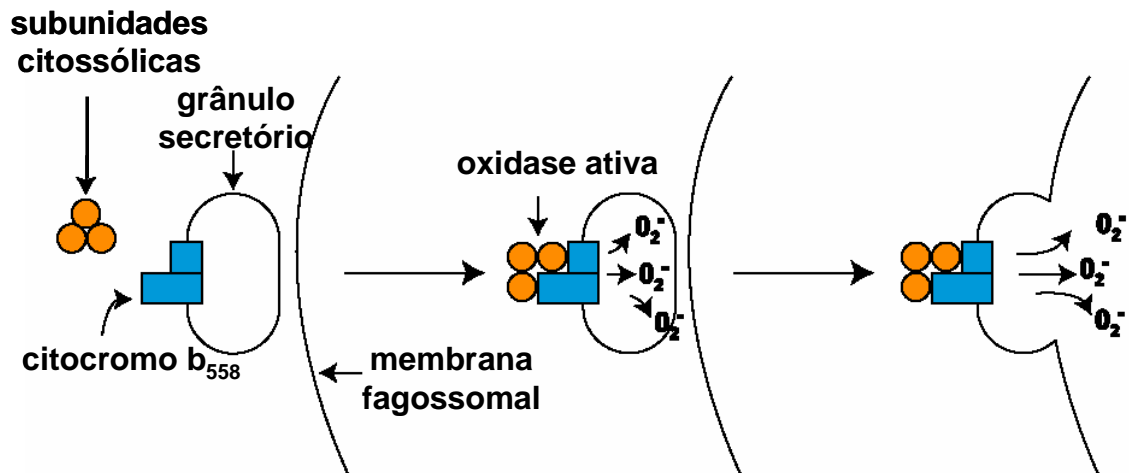


Figura 3. Ativação do complexo NADPH oxidase fagocitário. Está mostrada a translocação de componentes citossólicos e componentes de grânulos secretórios para a membrana fagossomal e a produção de $O_2^{\bullet -}$ no fagossoma. Adaptado de BABIOR, 2000.

Embora sejam altamente reativas, com potencialidade deletéria ao organismo, ERO/ERN são toleradas e mesmo utilizadas, tanto por organismos procariotos quanto por eucariotos. Para tanto, concorrem a destruição espontânea e a degradação dessas espécies por enzimas especializadas, além da ação de vários metais e compostos antioxidantes de baixo peso molecular como tocoferol, ascorbato, carotenóides, bilirrubina, ácido úrico e glutathiona (GSH), entre outros (SIES, 1986; CADENAS, 1989; DI MASCIO et al., 1995; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A ação de ERO/ERN como compostos sinalizadores intra e intercelulares tem sido mostrada em células vegetais e animais.

A produção de ERO/ERN por fagócitos é reconhecida como uma resposta de defesa contra agentes estranhos ao organismo, e, portanto, essencial para a sobrevivência. A partir do O_2 , que se encontra no estado triplete, pode ser produzido $O_2^{\bullet -}$, por ganho de um elétron, ou oxigênio singlete (1O_2), por mudança do número de spin de um dos dois elétrons não pareados do O_2 através de uma reação endotérmica.

Embora o $O_2^{\bullet-}$ não seja uma espécie oxidante forte, reações subsequentes deste radical levam à produção de ERO mais eficientes como microbicidas. No fagossoma, o $O_2^{\bullet-}$ sofre dismutação, resultando na produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que, além de ser capaz de atravessar membranas e oxidar GSH e metionina, ativa a expressão de genes que estão sob o controle do fator de transcrição NF- κ B. Além disso, este peróxido, através de reação de Fenton, na presença de metais como Fe^{2+} origina o radical hidroxila (HO^{\bullet}), extremamente reativo, capaz de causar danos em fitas de DNA, inativar diferentes enzimas, iniciar a lipoperoxidação de membranas. O $O_2^{\bullet-}$ pode, adicionalmente, sofrer protonação em meio ácido, originando a forma altamente reativa HO_2^{\bullet} . A MPO, enzima que é liberada no fagossoma durante a fagocitose, catalisa a produção de ácido hipocloroso (HOCl), a partir de H_2O_2 e Cl^- . Este ácido, altamente reativo, é capaz de oxidar diferentes biomoléculas, servindo, ainda, de substrato para a produção subsequente de HO^{\bullet} e 1O_2 (HAMPTON et al., 1998, HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999) (Figura 4).

Recentemente, surgiram evidências de que ozônio (O_3) e o trióxido de dihidrogênio (H_2O_3), poderosos agentes oxidantes, são formados no fagossoma por exposição de fagócitos a anticorpos. O_3 seria formado a partir de 1O_2 , e sua detecção realizada na presença de catalase, enzima que destrói o H_2O_2 o qual catalisa a decomposição de O_3 (BABIOR et al., 2003). A possibilidade de formação desses oxidantes por fagócitos estimulados deixa claro que, embora se conheça uma vasta gama de detalhes de ERO/ERN produzidos por fagócitos, outra variedade de oxidantes, até o momento desconhecidos, pode despontar nos próximos anos.

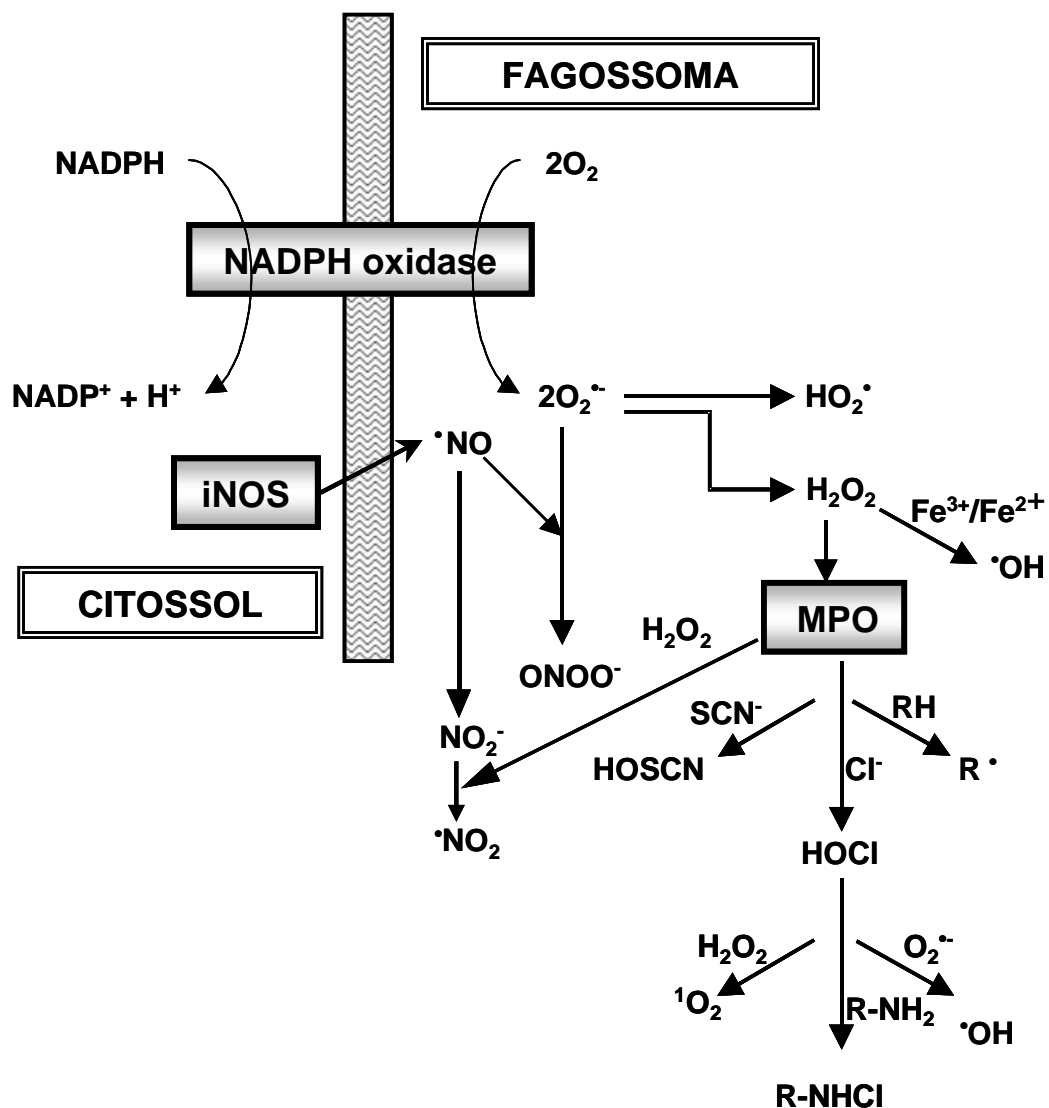


Figura 4. Produção de ERO/ERN por fagócitos. Ressaltam-se os doadores citossólicos de elétrons para o sistema NADPH oxidase que produz $O_2^{\bullet-}$ no fagossoma. Adaptado de HAMPTON et al., 1998

Uma grande variedade de agentes, tanto substâncias solúveis quanto particuladas, é capaz de estimular, seletivamente, ou em conjunto, o sistema NADPH oxidase e iNOS em fagócitos. Entre as solúveis incluem-se os peptídeos quimiotáticos, como o formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), a concanavalina A, os leucotrienos, as

citocininas, os ionóforos de cálcio, o fluoreto de sódio e os ésteres de forbol, como o forbol 12-miristato 13-acetato (PMA). Bactérias e leveduras opsonizadas que atuam pela via alternativa do complemento, complexos imunes formados pela interação antígeno/anticorpo que atuam pela via clássica do complemento e estreptolisina O são substratos particulados capazes de ativar fagócitos (JESIATIS et al., 1991).

Usando monócitos humanos Heo et al. (2008) mostrou que a luz (rhLIGHT) é capaz de aumentar a migração de monócitos humanos bem como ativar o complexo NADPH oxidase via fosforilação da fração p47^{phox}.

Vias bioquímicas diferentes são ativadas na produção de O₂^{•-} por fagócitos, dependendo da natureza das células e do ativador utilizado (JESIATIS et al., 1991; BRIGAGÃO; COLEPICOLO, 1998; BRIGAGÃO et al., 2000). PMA e alguns de seus análogos são promotores tumorais descritos como capazes de disparar o "burst" respiratório em células fagocitárias através da ativação direta da proteína quinase C (PKC), o que independe de receptores de membranas. Estes forbóis são agonistas que se ligam diretamente ao domínio de ligação de diacilglicerol (DAG) da PKC, ativando-a por mudança conformacional e aumento da afinidade por íon cálcio, em algumas isoformas. Esta ativação de PKC determina que a mesma fosforile resíduos de serina e treonina em uma vasta gama de substratos protéicos (DYKE, 1991). Foi mostrado que a proteína p47^{phox} é, *in vitro*, substrato para PKC, e que a fosforilação nos seus diferentes resíduos de serina inicia a ativação do complexo NADPH oxidase (BABIOR, 2000).

2.3. O processo pós-traducional de S-glutationilação protéica

A habilidade das células comunicarem entre si e responder a um ambiente bioquímico específico constitui o mecanismo biológico designado transdução de sinal. Nesse contexto, estão envolvidos segundos mensageiros bioquímicos, dentre os quais se incluem ERO/ERN. Dados da literatura nos últimos vinte anos sugerem, ainda, que estas espécies oxidantes desempenham papel fundamental na modulação de funções celulares. Em células animais, especialmente em fibroblastos e células de linfomas, sabe-se que diferentes estímulos como vírus e bactérias, forbóis e interleucinas são

capazes de causar elevação na quantidade de espécies oxidantes produzidas, o que induz uma expressão gênica diferenciada em resposta ao estado redox da célula (KAHN; WILSON, 1995; ROLLET-LABELLE et al., 1998).

Os estudos iniciais nesta área foram feitos com oxidantes exógenos. Mais recentemente, as pesquisas se concentram em condições que levam à produção endógena de ERO/ERN, uma vez que há tempos é conhecido o fato de que o balanço redox celular é de vital importância para as diversas funções celulares.

Dentre as defesas antioxidantes endógenas destaca-se GSH (Figura 5). Este tripeptídeo (γ Glu-Cys-Gly) é sintetizado no citoplasma de todas as células animais e está na concentração de aproximadamente 1 a 10 mM. Esta elevada concentração intracelular de GSH combinada com seu grande poder redutor fazem dela o maior representante dos antioxidantes de baixo peso molecular, capaz de proteger estruturas com funções extremamente importantes como as proteínas e ácidos nucleicos (DALLE-DONNE et al. , 2007; HALLIWELL; GUTERIDGE, 2007).

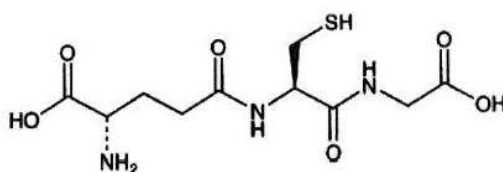


Figura 5. Estrutura química do tripeptídeo glutathione. Esse composto tiólico é constituído pelos aminoácidos L-glutamato, L-cisteína e glicina (γ Glu-Cys-Gly). Adaptado de SIES, 1999.

Sob estresse oxidativo e/ou nitrosativo os grupos tióis protéicos estão entre o mais vulneráveis às alterações redox (reversíveis ou irreversíveis) Estas modificações são alvos de estudos porque a cisteína é um aminoácido que contém um grupo tiol (-SH) presente no sítio ativo de muitas proteínas, e alterações neste grupamento poderiam desorganizar algumas respostas como sinalização celular e controle da expressão gênica. Além disso, estas alterações no estado redox são reconhecidas

como resposta celular adaptativa ao aumento à exposição e/ou à produção endógena de ERO/ERN (WINTERBOURN & HAMPTON, 2008).

Algumas modificações nos resíduos de aminoácidos de proteínas incluem a formação de ácido sulfênico (Cys-SOH), ácido sulfônico (Cys-SO₃H), ácido sulfínico (Cys-SO₂H), formação de pontes de dissulfeto intra e intermoleculares e a formação de dissulfetos mistos (DALLE-DONNE, et al. 2007).

A formação de dissulfetos mistos protéicos envolvendo grupo sulfidril protéico (PSH) e GSH é um processo denominado S-glutationilação protéica. Este processo é uma modificação pós-traducional que ocorre não apenas sob estresse oxidativo/nitrosativo, mas também em condições fisiológicas normais. A S-glutationilação é determinada por vários fatores como o valor do pK_a da PSH, a estabilidade do dissulfeto resultante ou a acessibilidade na estrutura tridimensional (GHEZZI; DI SIMPLICIO, 2001; DALLE-DONNE et al., 2007).

O processo de S-glutationilação pode ocorrer através de algumas reações como: (i) proteína-SH reduzida ou GSH reagindo com um derivado sulfidril oxidado (ácido sulfênico, radical tiila ou S-nitrosotiol); (ii) troca tiol/dissulfeto entre tiol protéico e glutatona oxidada (GSSG) ou proteína glutatona (PSSG); (iii) reação entre tióis protéicos e intermediários S-nitrosotióis, por exemplo, S-nitrosoglutationa (GSNO); (iv) envolvimento de formação de radicais tiila, determinando interação direta entre resíduo protéico cisteinila livre e GSH ou, de maneira inversa, radicais glutatona e cisteína reduzida na estrutura protéica (DALLE-DONNE et al. , 2007; GALLOGLY; MIEYAL, 2007, WINTERBOURN; HAMPTON, 2008).

Como um mecanismo bioquímico regulatório, o processo de S-glutationilação pode ser revertido. A deglutationilação, a remoção da GSH de dissulfetos mistos protéicos, e ocorre quando o meio torna-se mais reduzido, podendo ser de maneira dependente ou independente de enzimas. As enzimas já relatadas na literatura que participam deste processo incluem: (i) glutarredoxinas (GRx) que conforme estudos prévios, apresentam a forma citosólica GRx1 que, em células de mamíferos, parece ser a maior responsável pela atividade de deglutationilação; (ii) sufirredoxina (SRx), uma pequena oxirredutase que possui um resíduo cisteinila em sua sequência e que foi a

primeira proteína identificada como envolvida especificamente na deglutinationilação redutiva de proteínas; (iii) tioredoxina (TRx), demonstrada como uma enzima que sofre S-glutinationilação. Além disso, relatos na literatura sugerem que TRx seja capaz de sofrer deglutinationilação espontânea (FINDLAY et al., 2005; DALLE-DONNE et al., 2007; GALLOGLY; MIEYAL, 2007).

A modificação pós-traducional protéica em resíduos de cisteína foi induzida em diversos tipos celulares, que, frente a diferentes agentes oxidantes responderam com S-glutinationilação de um “pool” protéico (CHAI et al., 1994b; RAVICHANDRAN et al., 1994; SCHUPPE et al., 1992; FIGUEIREDO-PEREIRA et al., 1998; PADGETT; WHORTON, 1998; EATON et al., 2002; KLEINMAN et al., 2003). Para refinar o conhecimento dos mecanismos através dos quais ocorre a S-glutinationilação, determinando a cinética e estequiometria do processo, estudos com proteínas isoladas foram conduzidos utilizando anidrase carbônica (CHAI et al., 1999), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (MOHR et al., 1999), diferentes isoformas de PKC (WARD et al., 2000), proteasoma 20S (DEMASI et al., 2001), neurogranina/RC3 e neuromodulina/GAP-43 (HUANG; HUANG, 2002), proteína de choque térmico HSP27 (EATON et al., 2000), actina (DALLE-DONNE et al., 2003), tubulina (LANDINO et al., 2004) e hemoglobina (MAWATARI; MURAKAMI, 2004), entre outras, como alvos protéicos da formação de dissulfetos mistos.

2.4 Nitróxidos e suas aplicações biológicas

Os nitróxidos, espécies radicalares estáveis (Figura 6) têm sua estabilidade química atribuída aos grupos metila na posição α na estrutura dos anéis com cinco membros (pirrolidina, pirrolina ou oxazolidina) e anel com seis membros (piperidina) (SOULE et al., 2007) .

O grupo metila previne a dismutação radical-radical e inibe o acesso de substâncias reativas que poderiam quelatar as espécies radicalares (SOULE et al., 2007). Estes compostos possuem um elétron desemparelhado na função N-O que está incluída no anel aromático ou alifático (FEDELI et al., 2003).

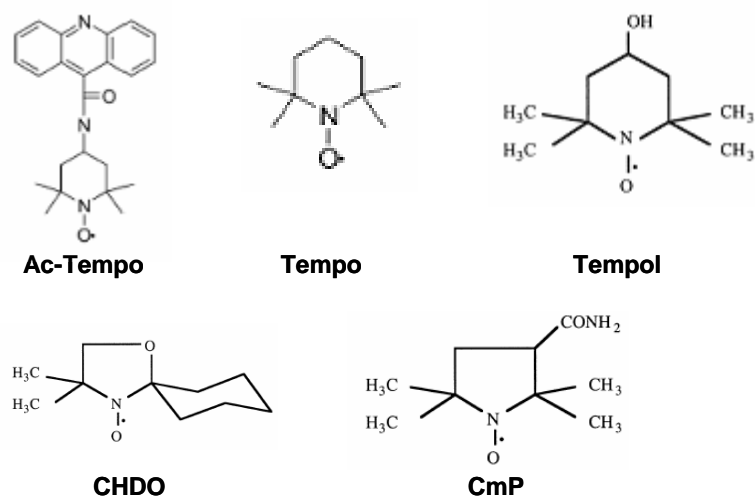


Figura 6: Estruturas químicas de nitróxidos. Os nitróxidos 4-9(-acridinecarbonyl)-amino)-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (Ac-Tempo) 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (Tempo) e 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (Tempol) constituem exemplos de estruturas com anéis de seis membros (piperidina) e os nitróxidos 2-ciclohexano-5,5-dimetiloxazolidina-1-oxil (CHDO) e 3-carbamoyl-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-1-oxil (CmP) mostram estruturas com anéis de cinco membros (oxazolidina e pirrolidina, respectivamente) Adaptado de: BORISENKO et al., 2004 e SAMUNI; BARENHOLZ, 2002).

Os diferentes tipos de anéis e substituintes produzem diferentes nitróxidos com propriedades físico-químicas distintas (KROLL et al., 1999). Por apresentarem estabilidade química e propriedades paramagnéticas permanentes, os nitróxidos são empregados como sondas em estudos envolvendo ressonância eletrônica paramagnética (EPR) e são usados como agentes de contraste para imagem de ressonância magnética (MRI) (SOULE et al., 2007). Alguns relatos literários apontam os primeiros usos dos nitróxidos como sondas biofísicas e marcadores para estudos de membranas e proteínas (FEDELI et al., 2003).

A natureza radicalar dos nitróxidos poderia levantar uma preocupação com relação aos possíveis efeitos mutagênicos ou teratogênicos destes compostos. No

entanto, estudos detalhados com células CHO AS52 e o nitróxido Tempol mostraram ausência de toxicidade e mutagenicidade (SOULE et al., 2007). Outro efeito anteriormente relacionado a este nitróxido relatado por DEGRAFF et al. (1992) é a limitação de mutações causadas por carcinógenos, como neocarzinostatina.

2.4.1. Metabolismo dos nitróxidos

Através de processos metabólicos celulares ou reações não enzimáticas, nitróxidos são metabolizados produzindo hidroxilaminas ou cátion oxoamônio. A atividade antioxidante dos nitróxidos está associada com a troca de um elétron envolvendo sua forma reduzida (hidroxilamina) e oxidada (cátion oxoamônio) (ISRAELI et al., 2005). O par nitróxido e cátion oxoamônio age como uma eficiente dupla redox suportando processos catalíticos. Ao contrário, o par nitróxido e hidroxilamina que não suporta este processo catalítico (SOULE et al., 2007).

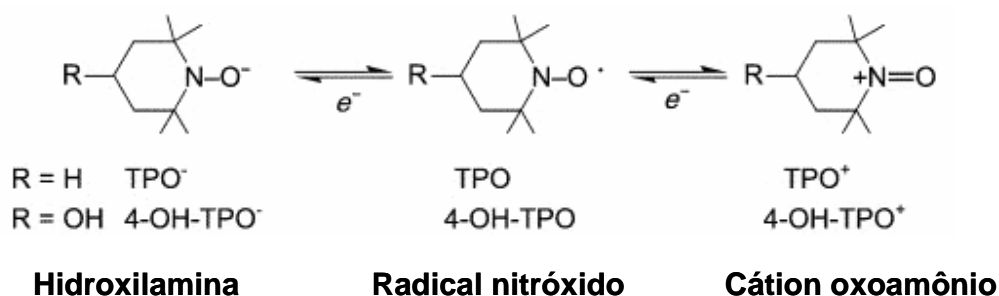


Figura 7. O processo redox de metabolização de nitróxidos. Os nitróxidos passam por uma sequência de reações bioquímicas, formando hidroxilamina ou cátion oxoamônio. Adaptado de ISRAELI et al., 2005.

O cátion oxoamônio é altamente oxidante e é responsável pelas atividades pró-oxidantes dos nitróxidos e seus efeitos colaterais (ISRAELI et al., 2005). Por outro lado, a hidroxilamina pode doar um átomo de hidrogênio funcionando como defesa antioxidante (SOULE et al., 2007).

A redução celular dos nitróxidos é influenciada pela estrutura química. *In vitro*, nitróxidos pirrolidínicos se mostraram mais resistentes à redução produzindo hidroxilamina em comparação com nitróxidos piperidínicos. *In vivo*, nitróxidos pirrolidínicos são mais estáveis que nitróxidos piperidínicos, e esta estabilidade depende dos diferentes grupos funcionais (KOMAROV et al., 1994).

2.4.2. Atividade antioxidante e protetora dos nitróxidos

A atividade antioxidante dos nitróxidos deve-se à sua versatilidade de atuarem como “scavenger” de radicais livres e à sua capacidade de manter metais de transição na sua forma oxidada, prevenindo, dessa maneira, a formação de radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) na reação de Fenton. Além disso, possuem atividade SOD “like” ou SOD mimética (FEDELI et al., 2003; SAMUNI et al., 2002; SOULE et al., 2007).

Esta atividade SOD mimética deve-se ao fato que, de maneira similar à SOD endógena, os nitróxidos atuam no processo de dismutação do ânion radical $\text{O}_2^{\cdot-}$, produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio. Nesta reação o nitróxido age como catalisador e não é consumido (SOULE et al., 2007).

Em preparações farmacêuticas com lipossomos, a lipoperoxidação é o principal problema que compromete seu uso, determinando perda de estabilidade. Estudos com o nitróxido TEMPO mostraram sua efetividade na prevenção da lipoperoxidação durante a estocagem. Isso deve-se ao fato de que os radicais nitróxidos reagem com outros radicais levando à fase de terminação da reação em cadeia da lipoperoxidação (CIMATO et al., 2004).

A atividade antioxidante e protetora dos nitróxidos foi comprovada em diferentes células, sob condições de estresse oxidativo/nitrosativo diversas. Estudos em fibroblastos humanos apontaram que com uma dose efetiva menor que a dose máxima tolerada de Tempol oferece proteção contra raios UVA1 e, comparado com a vitamina C (1mg/mL), tem atividade fotoprotetora igual ou superior. Esses resultados sugerem uma perspectiva de uso para o Tempol como agente anti-fotoenvelhecimento na medicina e em cosméticos (YAN et al., 2005).

Conforme demonstrado por Vendetti et al. (2008), vitaminas antioxidantes, tanto hidrossolúveis como lipossolúveis, mostraram-se menos efetivas que alguns nitróxidos em relação à defesa na degradação do colágeno. Além disso, este estudo ainda alerta para o possível uso de nitróxidos em preparações tópicas, indicando que alguns nitróxidos possuem atividade antioxidante mais efetiva na ausência de exposição ultravioleta (UV).

A capacidade de reação dos nitróxidos via radical-radical produzem espécies não radicalares (hidroxilaminas alquiladas) explica a razão desses compostos inibirem a oxidação do colágeno (VENDETTI et al., 2008). O ácido hialurônico está presente nas cartilagens e outros tecidos e por ação de ERO, em particular $\bullet\text{OH}$, esse composto bioquímico é degradado provocando processos fisiopatológicos como a artrite reumatóide. Nestes casos, em que $\bullet\text{OH}$ é a primeira espécie oxidante associado aos danos detectados, foi verificado que nitróxidos são capazes de proteger o ácido hialurônico da degradação (LURIE et al., 2003).

O efeito protetor dos nitróxidos também pode ser considerado em relação aos danos oxidativos sofridos pelo DNA em células epiteliais de ratos expostas a diferentes fontes de ERN (FEDELI et al., 2003). Mesmo sendo efetivos, existem diferenças nessa proteção exercida pelos nitróxidos, fato que pode ser explicado com base nas diferenças estruturais que limitam a mobilidade e/ou afinidade pelo sítio de ação (DAMIANI et al., 2000).

Diferentes trabalhos mostram o efeito protetor de nitróxidos em danos causados por patologias inflamatórias. Entretanto, não existem relatos que explorem uma possível ação de nitróxidos como compostos capazes de modularem diretamente a ação de fagócitos, especialmente através da atividade do complexo enzimático NADPH oxidase.

3.OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto foi verificar o efeito do nitróxido Ac-Tempo na atividade do complexo NADPH de macrófagos.

Para tanto, pretendeu-se, especificamente:

- Caracterizar a produção de radicais tiila, especialmente glutacionila, em macrófagos inflamatórios durante a ativação do complexo NADPH oxidase pela via de proteína quinase C;
- Verificar se a ativação do complexo NADPH oxidase é alterada pelo bloqueio da formação de radicais tiila.
- Verificar se o nitróxido Ac-Tempo modula a ocorrência de S-glutacionação associada à ativação do complexo NADPH oxidase fagocitário.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Para atingirmos os objetivos propostos, as seguintes etapas de trabalho foram executadas:

4.1. Isolamento de macrófagos peritoneais

Camundongos machos da linhagem Swiss com idade entre seis e nove semanas, mantidos no Biotério da Universidade Federal de Alfenas, com ração peletizada a água *ad libitum*, em regime de luz/escuro de 12/12 horas (luz entre 6:00 e 18:00 horas), com temperatura controlada a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, foram usados em todos os experimentos em grupos de 15 a 25 animais.

As células inflamatórias foram isoladas da cavidade peritoneal conforme metodologia descrita por Rabadji et al. (1996). A inflamação crônica foi desencadeada pela injeção de 1 mL de caseinato de sódio 12% (m/v, em solução salina isotônica). A injeção de caseinato de sódio foi feita sempre às 8:00 horas para evitar variações circadianas.

Após 72 horas da injeção intraperitoneal do sal protéico para indução do processo inflamatório, os animais foram anestesiados com éter etílico e sacrificados por deslocamento da coluna cervical. Foram injetados 5 mL de solução tampão fosfato (PBS, 125 mM, pH 7,5) gelado, na cavidade peritoneal de cada animal e o lavado peritoneal coletado com seringa de plástico. O "poll" celular foi centrifugado por 15 minutos a $500\times g$ a 4°C .

O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em PBS. Este procedimento foi repetido duas vezes e as células precipitadas foram contadas em câmara de Neubauer. Alíquotas deste precipitado foram usadas para a confecção de lâminas nas quais foram feitas contagem diferencial em microscópio óptico. As lâminas foram coradas pelo método de May-Grunwald- Giemsa (Sigma Chemical Co.)

Padronizou-se o uso de 1×10^6 células por mL em todos os experimentos, exceto quando o experimento requeria claramente condições diferentes. As suspensões celulares receberam tratamentos diferentes, constituindo quatro grupos experimentais:

1-Grupo controle: macrófagos ressuspensos em PBS;

2-Grupo estimulado: macrófagos estimuladas com PMA (100 ng, solubilizado em DMSO, concentração final 0,05% v/v, 100ng, 37°C, 5 minutos);

3-Grupo nitróxido: macrófagos incubados com Ac-Tempo (dissolvido em metanol, concentração final 0,01% v/v, 10 minutos, 37°C);

4-Grupo nitróxido estimulado: macrófagos incubados com Ac-Tempo (dissolvido em metanol, concentração final 0,01% m/v 10 minutos, 37°C) e posteriormente estimulados com PMA (100ng, solubilizado em DMSO, concentração final 0,05% v/v, 37°C, 5 minutos).

4.2. Viabilidade celular

A viabilidade celular foi testada com o método padrão em que um sal tetrazólico (MTT, [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) é reduzido à formazana. Este método envolve a conversão do MTT (12 mM), que é hidrossolúvel, em uma formazana insolúvel, que, após solubilização com dimetil sulfóxido (DMSO), é determinada a densidade óptica a 540nm, que apresenta correlação direta com o número de células viáveis.

A conversão à formazana é feita, primariamente, por enzimas mitocondriais, especialmente a succinato desidrogenase (Figura 8), sendo, portanto, um teste capaz de determinar acuradamente o número de células viáveis em uma preparação (GIANNINI et al., 2001).

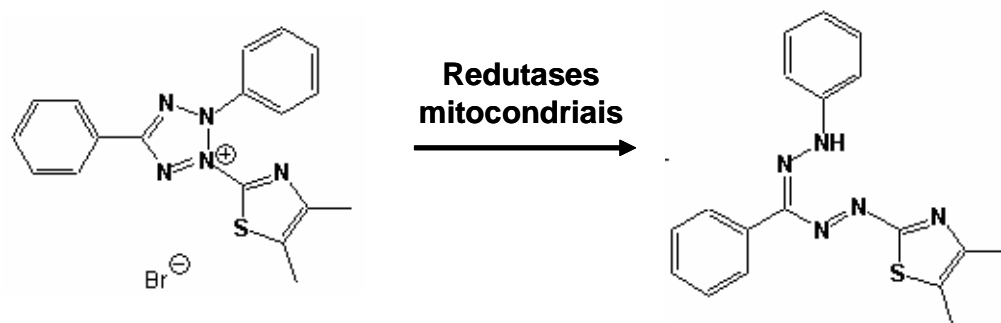


Figura 8. Redução de MTT, um sal tetrazólico amarelo, à formaza insolúvel, de coloração roxa.

Fagócitos, em número definido dentro dos padrões de linearidade do método, foram incubados por 45 minutos a 37°C com diferentes concentrações do nítróxido em estudo, e, após centrifugação (500xg, temperatura ambiente), o sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram acrescentados 250 µL de DMSO. A densidade óptica (540nm, espectrofotômetro Spectronic GENESYS 5) foi determinada e comparada entre todos os grupos celulares. Experimentos controles foram feitos com incubação dos macrófagos apenas com o veículo de dissolução do nítróxido e/ou do PMA.

Controles adicionais foram realizados em condições idênticas, na ausência de células, para verificar possível interferência química do nítróxido ou dos veículos de dissolução no estado de óxido-redução do MTT.

4.3. Determinação da concentração protéica total

As concentrações protéicas foram determinadas em todas as amostras pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão para a curva de calibração (λ 595nm, 2,5-20,0 µg de proteína/mL).

4.4. Efeito de Ac-Tempo sobre a atividade do complexo NADPH oxidase

Aumento do consumo de oxigênio por fagócitos, dissociado da cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, está diretamente associado à ativação do sistema NADPH oxidase, com formação de $O_2^{\bullet-}$ no fagossoma (BABIOR, 1992). As concentrações de O_2 consumidas por macrófagos foram medidas em oxígrafo (YSI 5300, Yellow Spring Instr. Co. USA), segundo método previamente descrito (ALEXANDER; GRIFFITHS, 1993). O eletrodo de Clark foi estabilizado com D-PBS-G a 37°C, e a calibração foi feita com o uso de ditionito, sendo que a concentração de O_2 na presença de macrófagos não estimulados foi estabelecida como 100%. PMA (10-100 ng/ 10^6 células) foi adicionado às suspensões celulares e o consumo de O_2 foi monitorado por 5 min, sob agitação constante, a 37°C

4.5.Verificação da produção de radicais tiila por macrófagos

A produção de radicais tiila em macrófagos foi monitorada utilizando-se uma sonda específica, o nitróxido Ac-Tempo. Este composto paramagnético, uma espécie radicalar estável, apresenta estrutura conjugada de nitróxido e acridina. A interação com radicais tiila determina o decaimento do sinal característico em EPR (resultante do esqueleto Tempo) e aumento de fluorescência (resultante do esqueleto de acridina) (BORISENKO et al., 2004). Assim, foi possível determinar, através de duas metodologias diferentes, a ocorrência de radicais tiila com uso de uma única sonda química.

O método foi, inicialmente, validado através de um sistema modelo onde há produção de diferentes radicais tiila. Foi utilizado o sistema fenol/ H_2O_2 /peroxidase/GSH (ou cisteína), onde a peroxidase catalisa a decomposição do peróxido, em cujo ciclo catalítico é gerado o composto I por redução de dois elétrons do grupamento heme da enzima, o qual oxida o fenol a radicais fenoxil, que, por sua vez, retornam ao estado nativo pela oxidação de GSH a GS^{\bullet} (ou cisteína a cisteinil). Os radicais tiila reagem, então, com Ac-Tempo, apagando o sinal de EPR e aumentando a fluorescência conforme esquematizado abaixo:

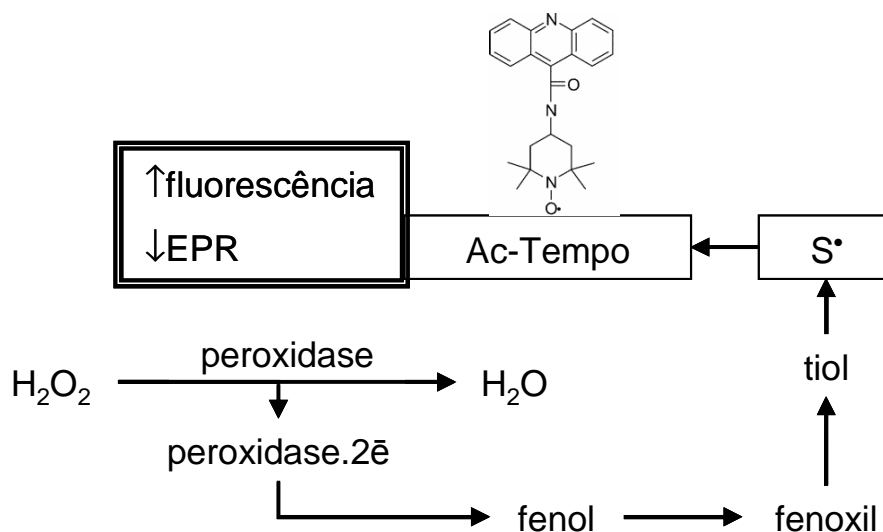


Figura 9. Esquema mostrando a produção de radicais RS' através de catálise de peroxidase.

Este sistema químico foi executado para validação da metodologia, com dois compostos tiólicos separadamente (GSH ou cisteína), acrescidos de fenol, peroxidase (HRP 0,2 U/mL), o nitróxido Ac-Tempo e H₂O₂, segundo descrição prévia de Borisenko et al. (2004), com algumas modificações. Os experimentos descritos a seguir foram realizados no Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Os reagentes foram colocados em diferentes concentrações, e foi registrado o espectro obtido por EPR (espectrômetro Bruker EMX) e por fluorescência (espectrofluorímetro Shimadzu RF5301PC). As medidas do sinal de EPR foram realizadas em um espectrômetro equipado com uma cavidade padrão, operando em uma frequência de banda X, usando uma cela padrão de quartzo que foi preenchida com 80µL de amostra. O espectro característico do nitróxido Ac-Tempo foi feito nas seguintes condições: campo de 335,7 mT, banda de passagem de 8 mT, modulação de campo 0,32 mT, emissão de microondas em 10 mW, tempo constante 0,1 s, tempo de varredura 1 minuto. O tempo de curso do espectro de EPR do Ac-Tempo foi obtido pela varredura repetida do campo correspondente ao pico médio do espectro de EPR

seguinto as mesmas condições experimentais. A análise de fluorescência foi realizada usando-se λ_{exc} 361 nm e λ_{emi} 440 nm. Alíquotas das preparações foram retiradas para a determinação de tióis reduzidos, cujas análises foram feitas segundo metodologia descrita no item abaixo.

Suspensões de macrófagos obtidos como descrito nos itens anteriores foram incubadas com diferentes concentrações de Ac-Tempo, em estado dormente ou após estimulação com PMA, com monitoração da viabilidade celular. A reação deste nitróxido com radicais tiila produzidos pelo estímulo com o forbol foi monitorada pelo aumento de fluorescência e decréscimo do sinal característico de EPR nas mesmas condições utilizadas para a validação do sistema químico descrito acima.

A sondagem de radicais tiila específicos nos fagócitos foi validada com o tratamento das células por 4h a 37°C com o agente alquilante *N*-etilmaleimida 10 μ M (NEM), um bloqueador de grupamentos tióis ou com sulfóxido de butionina 50 μ M (BSO), um inibidor competitivo da enzima glutathione sintetase (16 horas, 37°C). Desta forma, foi possível diferenciar o radical glutathionila dentre outros radicais tiila produzidos durante a ativação de macrófagos, bem como realizar sua quantificação e associação à ativação do complexo NADPH oxidase.

4.6. Determinação da razão GSH/GSH + 0,5 GSSG celular

O estado redox celular pode ser determinado por meio da quantificação de GSH em relação à sua forma oxidada GSSG (Sies, 1999). GSH e outros tióis, tais como cisteína, *N*-acetilcisteína e γ -glutamylcisteína, reagem com monobromobimano (mBB; 3,7-dimetil-4bromometil-6-metil-1,5-diazobicyclo[3.3.0]octa-3,6-dieno-2,8-diona) (Figura 10), um agente alquilante específico para grupamentos sulfidríla.

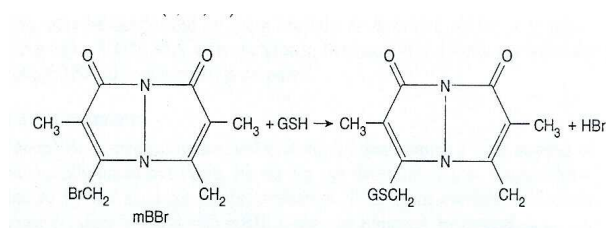


Figura 10. Reação do mBBr com GSH com formação de um aduto fluorescente.

Para a verificação de possível alteração da razão GSH/GSH + 0,5GSSG nos macrófagos frente ao tratamento com Ac-Tempo, os adutos tiólicos do mBBr foram separados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em coluna C-18 (Shim-pack VP-ODS, 4,6mm x 25cm, 5 μ m, conectada em série com pré-coluna C18 modelo Shim-pack GVP-ODS, 4,6mm x 10mm). Amostras das suspensões celulares receberam *N*-etil-morfolina (1M, pH 7,4) e imediata adição de mBrB (0,1M) (EDTA, 6,3 mM). A reação de derivatização foi feita por 20 minutos ao abrigo da luz. Decorrido este tempo, foram acrescentados ácido sulfossalicílico (SSA, 4,31% m/v, padrão interno de referência), ácido etileno di-amino tetracético e ácido acético glacial, e as amostras foram filtradas em membrana (0,45 μ m, Millipore).

A eluição foi feita com tampão A (metanol 14,2% e ácido acético 0,25% m/v, pH 3,9) durante 30 minutos, em fluxo de 1 mL/minuto. Em seguida, a coluna foi lavada com tampão B (metanol 90% e ácido acético 0,25%, pH 3,9) por 5 minutos e re-equilibrada com o tampão A antes de cada nova injeção. Todas as amostras foram tratadas.

A identificação de GSH foi realizada pela comparação com o tempo de retenção de padrões autênticos (10-100 nmol) através de detector de fluorescência (modelo RF-10AXL) utilizando-se λ_{ex} =360nm e λ_{em} =470nm, e a quantificação foi feita através de análise da integral das respectivas áreas (Software "LC-Solution Multi") (PUNCHARD; KELLY, 1996).

A determinação de GSSG foi realizada após tratamento das amostras com glutatona redutase (1,5 U) e NADPH (0,3 mM) e calculada estequiometricamente em relação à concentração de GSH total.

4.7. Determinação de S-glutanionação protéica

O perfil de S-glutinação protéica foi determinado através de análise por “dot blot” para a verificação dessa modificação pós-traducional durante a ativação do complexo NADPH oxidase de macrófagos, bem como o efeito de Ac-Tempo sobre esse processo, segundo método previamente descrito (ROSSI et al., 2006).

Às alíquotas de suspensões celulares controle ou tratadas com Ac-Tempo, não estimuladas ou após estimulação com PMA, foram acrescentados inibidores de proteases (PMSF 0,2mM, leupeptina 1 µg/mL, aprotinina 2 µg/mL, pepstatina 1 µg/mL, benzamidina 17 µg/mL), seguindo-se adição de *N*-etilmaleimida (NEM, 50 mM) ou borohidreto de sódio (NaBH₄, 50 mM), por 30 min (25°C), para que os grupamentos tióis livres fossem quimicamente bloqueados por alquilação ou reduzidos, respectivamente (KLATT; LAMAS, 2000).

Em seguida as células foram rompidas em sessões de 20 minutos cada de congelamento e descongelamento. Para determinação da concentração protéica, as amostras foram centrifugadas (10.000xg, 4°C, 15 minutos) e alíquotas dos respectivos sobrenadantes foram analisadas.

Após a transferência das proteínas para a membrana (3 µg) foi feito o bloqueio da mesma com uma solução constituída de TBS-Tween 20 (1% m/v) e leite desnatado (10% m/v) por 1 hora sob agitação em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada por 15 minutos com TBS-Tween 20 (1% m/v). A membrana foi incubada com anticorpo primário monoclonal anti-glutinationa, (Santa Cruz Biotechnology, clone D8, diluição 1:8.000) por um período de 2 horas com agitação, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A membrana foi lavada novamente por mais 15 minutos com TBS-Tween 20 (1% m/v) e logo após foi feita a incubação com anticorpo secundário associado à peroxidase de raiz forte (Santa Cruz Biotechnology, anti-IgG, diluição 1:2.000) por 1 hora sob agitação, nas mesmas condições. Após última lavagem por um período de 15 minutos com a mesma solução, a revelação foi feita com o sistema quimioluminescente ECL[®] 2132 (Amersham), incubação por 5 minutos e exposição da membrana ao filme (Kodac T-MAT G/RA) por 4 minutos em câmara escura (LINARES, et al., 2008). A revelação dos filmes foi realizada em processador automático (A/T 2000

xR), no Laboratório de Radiologia da UNIFAL-MG, sendo então os filmes submetidos à densitometria e os resultados expressos em porcentagem da área específica em proporção à área total densitometrada (RAVICHANDRAN et al., 1994).

4.8. Análises Estatísticas

Todos os resultados foram expressos como média \pm dp de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata. Os resultados foram submetidos à análise estatística para testes de variância utilizando-se o teste ANOVA e o teste de Tukey para comparações múltiplas de médias (ZARR, 1996). Valores de p iguais ou menores que 0,05, indicadores do nível de significância de pelo menos 5% entre as diferenças encontradas, foram considerados estatisticamente significativos.

5.RESULTADOS

5.1. População fagocitária de focos inflamatórios crônicos peritoneais

O processo inflamatório pode ser desencadeado tanto por microorganismos quanto por substâncias estranhas ao organismo como caseinato de sódio, tioglicolato e carragenana. Inicialmente o foco inflamatório é povoado por neutrófilos e, com o passar do tempo, a inflamação passa a ser crônica e então, predominam os macrófagos. Os macrófagos, assim como os neutrófilos, desempenham um papel importante na resposta do organismo nas diferentes lesões.

Induzimos um processo inflamatório crônico em camundongos pela injeção intraperitoneal de caseinato de sódio. Após 72 horas da injeção do indutor, uma população significativa de macrófagos foi elicitada por lavagem peritoneal com PBS. As lâminas foram coradas por May-Grünwald-Giemsa e analisadas por microscopia óptica. A Figura 11 mostra um campo microscópico característico dessa população celular.

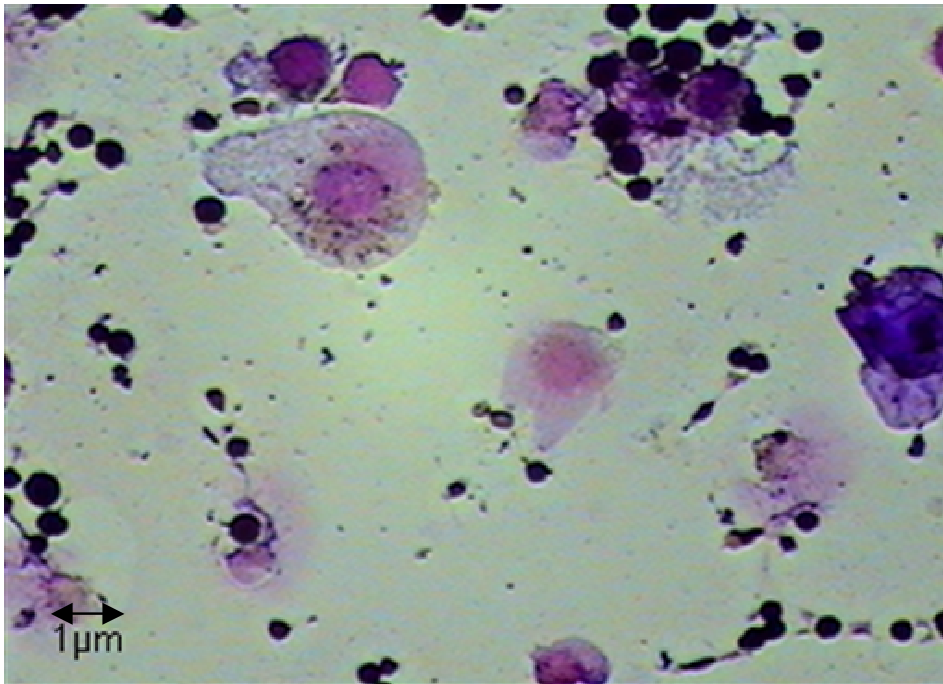


Figura 11. Campo microscópico mostrando a identificação de células mononucleares de focos inflamatórios induzidos na cavidade peritoneal de camundongos. Coloração May-Grünwald-Giemsa.

5.2. Viabilidade celular de macrófagos inflamatórios tratados com Ac-Tempo

A viabilidade celular determinada pelo método de redução do MTT mostrou que o tratamento das células fagocitárias com o nitróxido Ac-Tempo e/ou a estimulação do complexo NADPH oxidase, nas condições testadas, não foi afetada. Células do grupo controle e tratadas com Ac-Tempo mostraram capacidade de reduzir o MTT de forma similar, uma vez que as densidades ópticas observadas não variaram significativamente (variação menor que 5% entre os diferentes experimentos).

De forma similar, os veículos de dissolução do Ac-Tempo e do PMA (metanol e DMSO, respectivamente) não modificaram a atividade das desidrogenases mitocondriais testadas.

5.3. Efeito de Ac-Tempo na atividade do complexo NADPH oxidase de macrófagos peritoneais.

Macrófagos de focos inflamatórios peritoneais mostraram um aumento de consumo de oxigênio crescente em função da dose de PMA utilizada como estímulo do sistema NADPH oxidase (Figura 12). Nota-se que nos ensaios com células dormentes esse consumo não é detectado, sendo que o mesmo atinge um valor máximo $3,7 \pm 1,2$ nmol O_2 /min/ 10^6 células quando foram utilizados 100 ng PMA. Este evento foi inibido pelo tratamento prévio dos fagócitos com Ac-Tempo, como mostrado na Figura 18. A dose de $100 \mu M$ do nitróxido foi capaz de suprimir totalmente a atividade do complexo NADPH oxidase. O aumento da quantidade do nitróxido (acima de $100 \mu M$) não mostrou efeito diferente sobre a atividade do complexo NADPH oxidase, assim como o aumento no estímulo com PMA não foi alterado com quantidades maiores que 100ng.

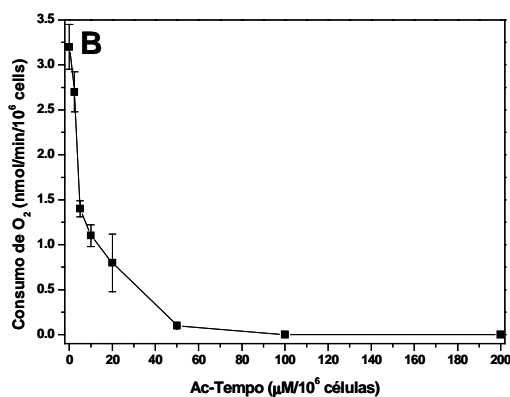
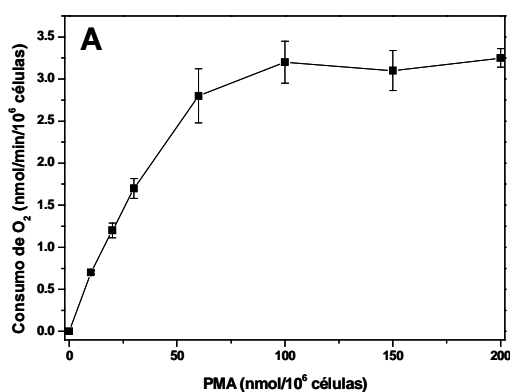


Figura 12: Efeito de Ac-Tempo no consumo de O₂ por macrófagos inflamatórios estimulados diretamente pela via proteína quinase C. A: células sem tratamento com Ac-Tempo; B: células previamente incubadas com Ac-Tempo e estimuladas com o forbol PMA (100 ng/10⁶ macrófagos).

5.4. Verificação da produção de radicais tiila em sistema modelo

No sistema modelo (fenol/H₂O₂/peroxidase/GSH ou cisteína) as reações foram preparadas com Ac-Tempo (10 µM), 0,2 U/mL de HRP, fenol (2.5 µM), H₂O₂ (10 µM) e as concentrações especificadas de GSH. Neste sistema ocorre a produção de radicais tiila que ao interagirem com o Ac-Tempo resulta em decaimento do sinal característico em EPR e aumento na fluorescência (λ_{exc} 361 nm) (BORISENKO et al., 2004).

Concentrações diferentes de GSH foram usadas para monitorar a fluorescência e houve um aumento neste sinal à medida que a concentração de GSH aumentou. Nota-se nessa varredura que, fixando-se λ_{ex} 361nm, o comprimento de onda de maior emissão foi λ_{ex} 440nm.

A Figura 13 mostra a cinética de emissão de fluorescência no sistema modelo e a dependência do aumento da fluorescência em função da concentração de GSH e a Figura 14 detalha a validação do sistema modelo utilizado.

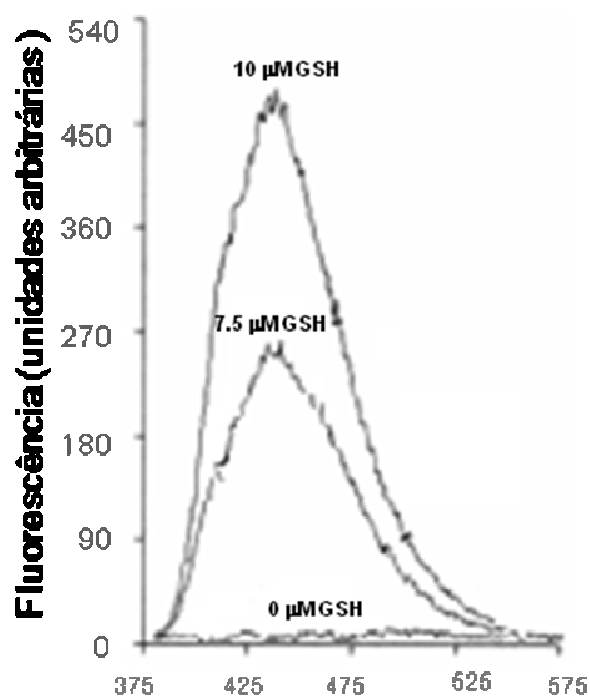


Figura 13: Dependência de concentração de GSH na emissão de fluorescência pelo nitróxido Ac-Tempo. O espectro de fluorescência foi monitorado em λ_{ex} 361 nm.

O sistema modelo foi validado usando o registro da fluorescência nas melhores condições determinadas anteriormente (λ_{ex} 361 nm λ_{em} 440 nm) com variações nas concentrações de fenol, GSH, Cys, H_2O_2 e NEM conforme pode ser visto na Figura 14.

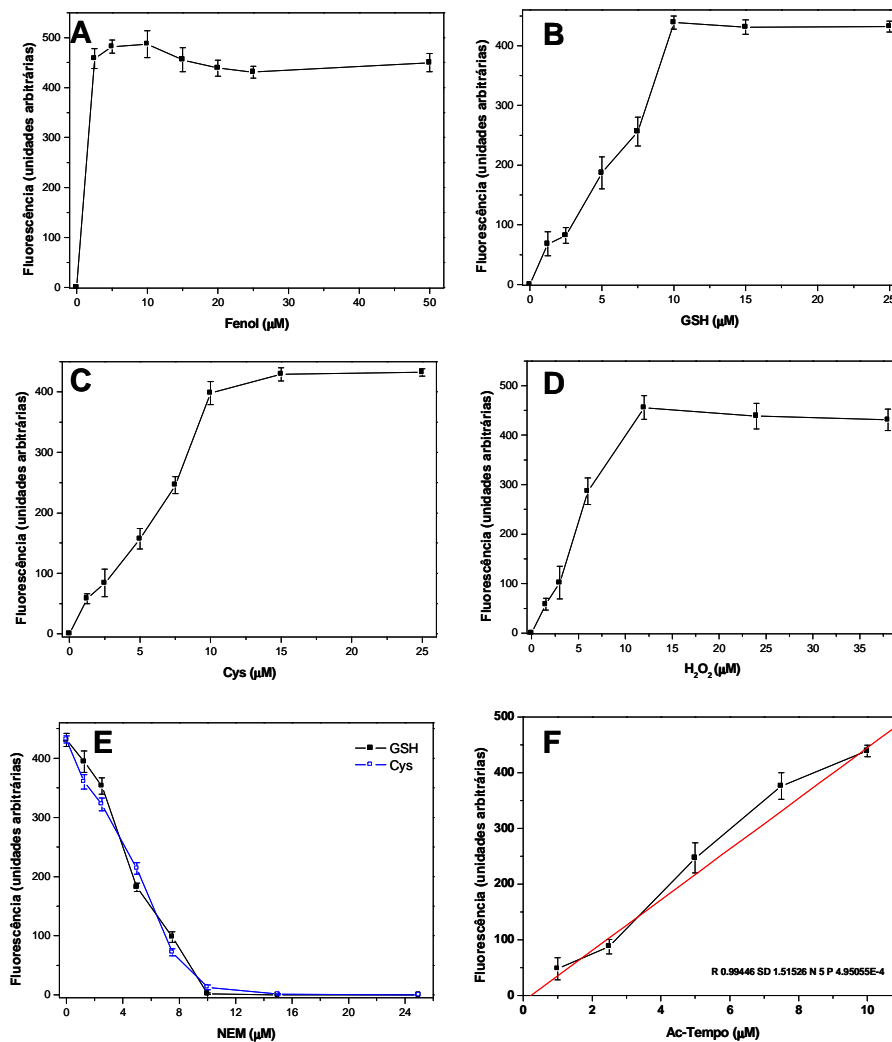


Figura 14. Fluorescência de Ac-Tempo em diferentes concentrações de H₂O₂, fenol e compostos tiólicos. Fluorescência total (λ_{ex} 361nm, λ_{em} 440nm) foi determinada nas seguintes condições de incubação: A: 10 μ M H₂O₂, 10 μ M GSH; B e C: 2.5 μ M fenol, 10 μ M H₂O₂; D: 2.5 μ M fenol, 10 μ M GSH; E: 2.5 μ M fenol, 10 μ M H₂O₂, 10 μ M GSH ou 25 μ M Cys; F: análise por regressão linear de A. Ac-Tempo (10 μ M) e HRP (0.2 U/mL) usados em concentrações idênticas em todos os experimentos. Resultados expressos com média \pm dp de 3 experimentos independentes.

A produção dos radicais tiila também foi acompanhada por EPR. A calibração do equipamento de EPR foi feita com o nitróxido Tempol cuja concentração era 36 μ M e em seguida o espectro característico do nitróxido Ac-Tempo (100 μ M) foi registrado. A Figura 15 mostra o registro deste espectro.



Figura 15. Espectro de EPR característico do nitróxido Ac-Tempo (100 μ M).

Conforme mostrado na Figura 16 o aumento da fluorescência foi dependente da concentração de GSH, assim como o decaimento do sinal de EPR no sistema modelo. O espectro de EPR foi monitorado por 2 minutos. Esta relação entre o decaimento do sinal de EPR e aumento da fluorescência conforme aumento da concentração de GSH pode ser verificada na Figura 16.

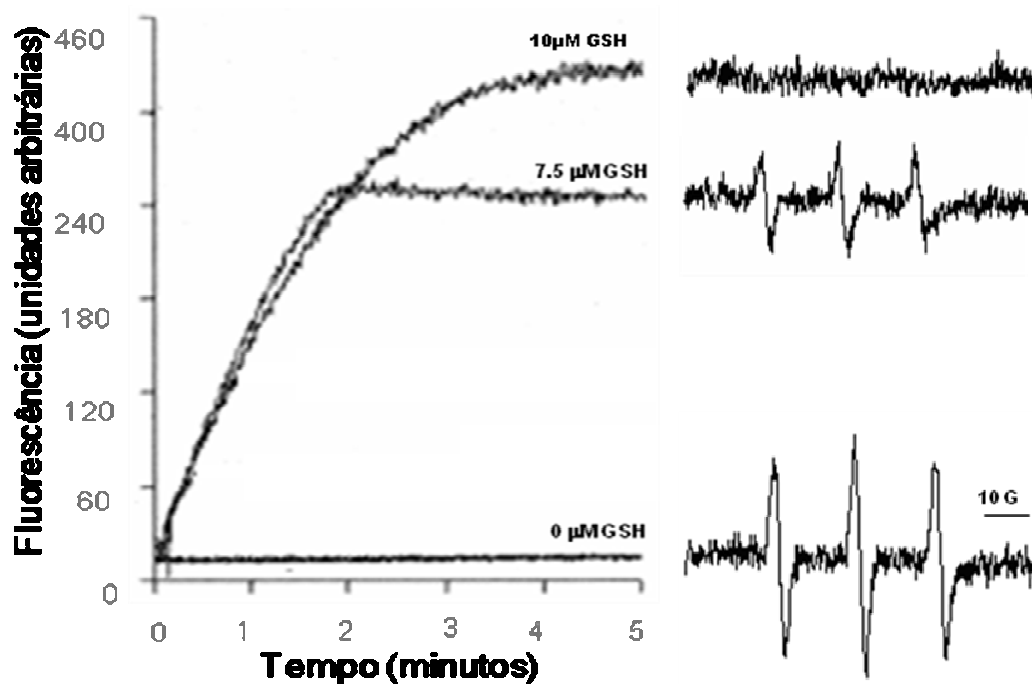


Figura 16. Dependência da concentração de GSH no aumento da fluorescência e decaimento do sinal de EPR.

Ainda usando o sistema modelo foi feita a determinação da estequiometria da reação GSH: Ac-Tempo indicando uma correlação linear de 1:1. Esta determinação foi feita por HPLC usando monobrobimano com agente derivatizante. A Figura 17 mostra esta estequiometria.

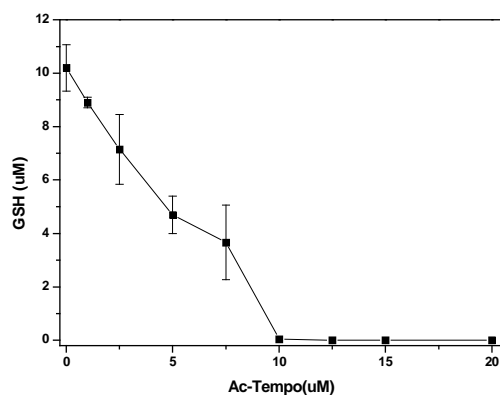


Figura 17. Estequiometria da reação GSH: Ac-Tempo. Alíquotas do sistema modelo usado para análise dos sinais de EPR e fluorescência do nitróxido foram retiradas durante os ensaios e as concentrações de GSH remanescentes analisadas por cromatografia.

5.5. Produção de radicais tiila por macrófagos peritoneais

As suspensões das células peritoneais elicítadas foram incubadas com Ac-Tempo por 10 minutos e estimuladas ou não com PMA e o espectro de EPR foi acompanhado e a fluorescência foi analisada. Os resultados estão mostrados nas Figuras 18, 19 e 20.

Nas células não estimuladas, o sinal de EPR característico do nitróxido permaneceu (Figura 19) com a mesma intensidade registrada na análise desse composto isolado (Figura 14). De forma coerente, a fluorescência, nessas condições, foi não significativa. Quando estimuladas com PMA (50ng/10⁶ macrófagos), o sinal de EPR decaiu cerca de 50% e houve um aumento parcial na fluorescência (cerca de 60 unidades). O estímulo com 100ng foi usado e o sinal de EPR foi apagado em concordância com o aumento da fluorescência.

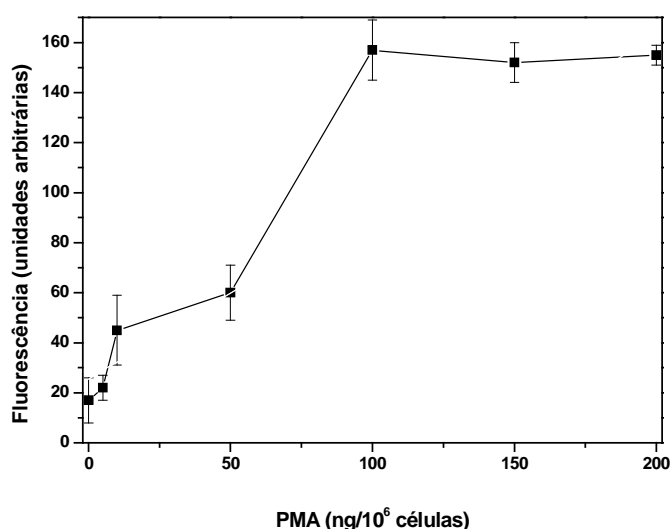


Figura 18. Fluorescência de suspensões celulares de macrófagos tratados com Ac-Tempo sob ativação de PKC. Após incubação com o nitróxido, as células foram estimuladas com PMA e a fluorescência das suspensões celulares (10^6 células/mL) determinada nas mesmas condições usadas nos ensaios de sistema modelo ($\lambda_{ex}361\text{nm}$, $\lambda_{em}440\text{nm}$).

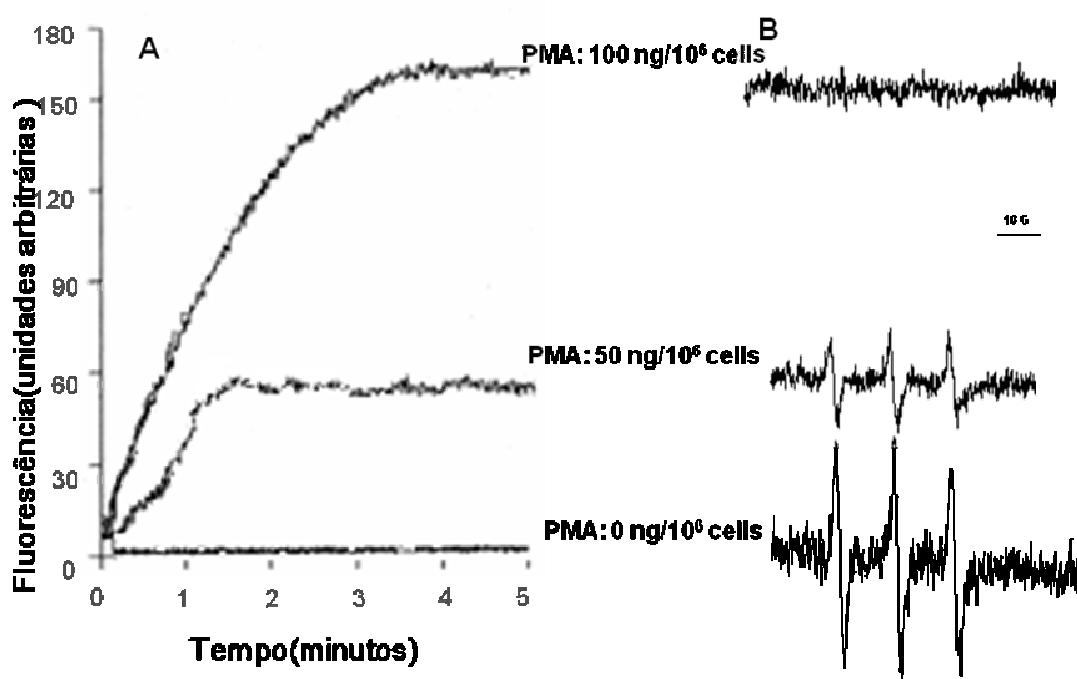


Figura 19: Fluorescência (A) e sinal de EPR (B) de macrófagos dormentes ou estimulados com PMA. As células foram tratadas com Ac-Tempo ($100 \mu\text{M}/10^6$ células).

Para explorar o envolvimento de radicais tiila no efeito de Ac-Tempo em macrófagos foi feita incubação das células com compostos que diminuem a concentração celular de GSH ou que alteram a disponibilidade de grupos tiólicos reduzidos (BSO ou NEM, respectivamente) antes do tratamento dos fagócitos com Ac-Tempo. Os resultados mostrados na Figura 20 evidenciam que ambos os tratamentos

foram capazes de alterar as respostas celulares. A intensidade do sinal espectral de Ac-Tempo nas suspensões celulares é dose-dependente (A e B). Quando comparados os sinais de células não estimuladas (B) com aqueles detectados na análise de macrófagos tratados com BSO ou NEM e estimulados (C e D), nota-se um pequeno decréscimo de sinal, indicativo de pouco consumo de Ac-Tempo. Entretanto, quando os macrófagos não foram tratados com BSO ou com NEM, a estimulação determinou apagamento completo do sinal de EPR (E), indicando que o nitróxido reagiu no meio celular.

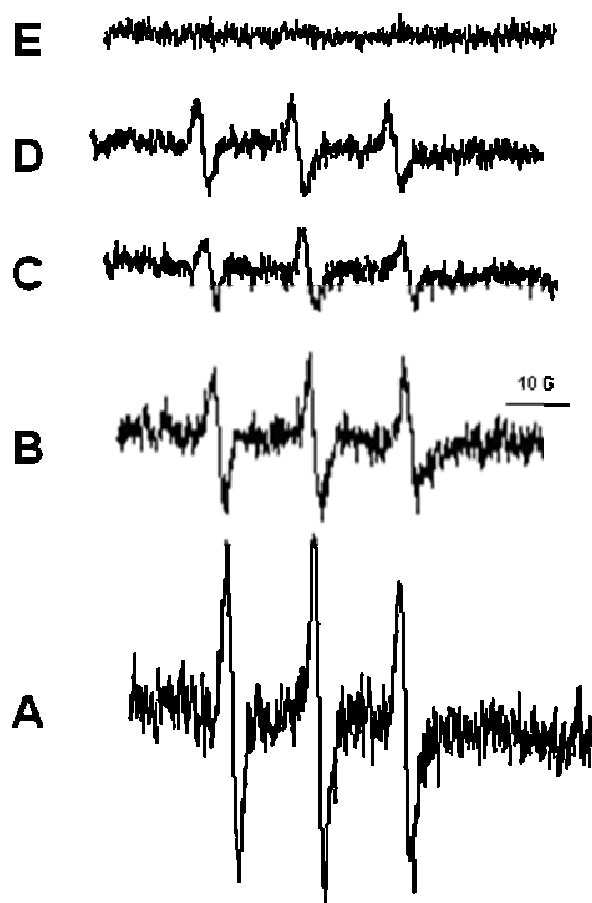


Figura 20: Espectro de EPR de suspensões celulares de macrófagos (10^6 células).

As seguintes condições de ensaios foram utilizadas: A: não estimulado, 100 μ M Ac-Tempo; B: não estimulado, 10 μ M Ac-Tempo; C: incubado com 10 μ M NEM (4 h, 37°C), 10 μ M Ac-Tempo e estimulado com PMA; D: incubado com 50 μ M BSO (16 h, 37°C) ,

10 μM Ac-Tempo e estimulado com PMA; E: 100 μM Ac-Tempo e estimulado com PMA. Foram utilizados 100 ng PMA/ 10^6 células em todos os experimentos. Os espectros de EPR são representativos de 3 experimentos independentes.

Condições semelhantes foram utilizadas para verificar diretamente a atividade do complexo NADPH oxidase e a fluorescência celular (Figura 21, A e B, respectivamente). A inibição da síntese de GSH com BSO foi capaz de potenciar o efeito inibitório que Ac-Tempo determinou no consumo de O_2 associado à estimulação de NADPH oxidase. Na menor dose utilizada (25 $\mu\text{M}/10^6$ células), esse composto provocou redução de 20% da atividade da oxidase, enquanto que na dose de 100 $\mu\text{M}/10^6$ células, BSO determinou uma diminuição de 90% dessa atividade quando comparada com as células apenas tratadas com Ac-Tempo.

O “burst” respiratório dos macrófagos também foi acompanhado quando foi feito o tratamento com Ac-Tempo após a incubação com NEM. Sob o mesmo estímulo com PMA, a alquilação de grupamentos tiólicos determinou consumo de O_2 significativamente diferente quando comparado aquele de macrófagos não tratados (Figura 12 B). Nas suspensões celulares submetidas à incubação prévia com NEM, seguida de acréscimo de Ac-Tempo, o estímulo para o “burst” respiratório definiu queda significativa na atividade de NADPH oxidase, mesmo em doses pequenas do agente alquilante.

Paralelamente, na Figura 21 pode ser visto que a fluorescência decorrente da liberação do esqueleto de acridina do Ac-Tempo, resultante de reação deste nitróxido com espécies radiculares, decaiu com o tratamento dos fagócitos com ambos os agentes que indisponibilizam compostos tiólicos.

Esses resultados reforçam aqueles obtidos pela análise dos espectros de EPR (Figura 18), fornecendo indícios de que a disponibilidade de compostos tiólicos é um fator preponderante para a atividade do complexo NADPH oxidase.

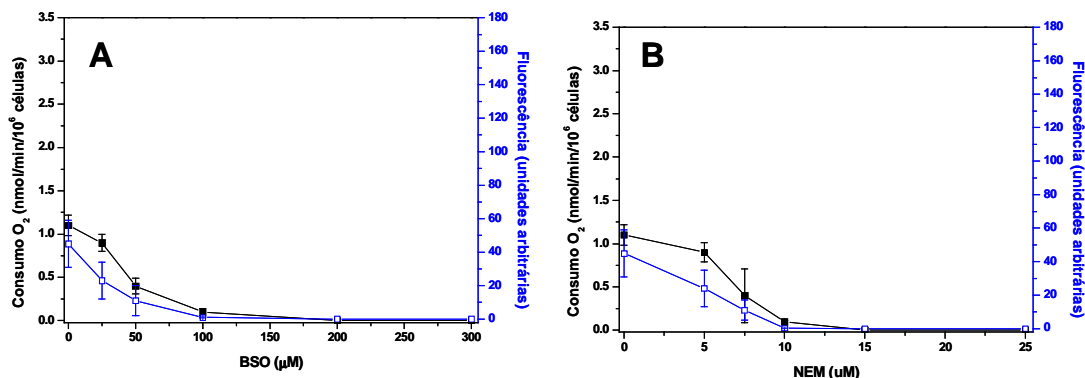


Figura 21. Efeito de BSO e NEM na ativação de NADPH oxidase e fluorescência de macrófagos tratados com Ac-Tempo. Os fagócitos foram incubados com BSO, inibidor da enzima glutatona sintetase (A) ou com o reagente alquilante NEM (B) e posteriormente tratados com Ac-Tempo (10 μM). O consumo de O₂ pelos macrófagos estimulados com PMA foi determinado paralelamente à fluorescência das suspensões celulares. Resultados mostrados como média±d.p., n=4.

5.6. Determinação da concentração celular de GSH e GSSG

Assim como muitos tióis, GSH reage com mBBr formando um aduto fluorescente estável e com base nessa derivatização pode ser feita a separação e quantificação usando detector de fluorescência no HPLC.

Para padronização do método foi feita uma curva de calibração usando padrões de GSH com concentrações de 10 a 100nmol. Estes padrões foram preparados conforme o protocolo descrito anteriormente que tem mBBr como agente derivatizante. A curva de calibração obtida foi construída com base na concentração de GSH x área do pico e pode ser vista na Figura 22. Os padrões foram preparados em triplicata e usou-se a média das três áreas para construir a curva de calibração.

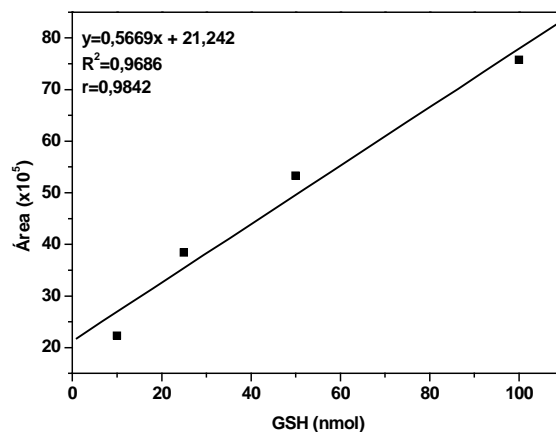


Figura 22. Curva de calibração de determinação de GSH. Foi utilizado método cromatográfico (HPLC) com detector de fluorescência ($\lambda_{ex}=360\text{nm}$ e $\lambda_{em}=470\text{nm}$), após derivatização com MBBr.

Um cromatograma representando a corrida cromatográfica com o padrão de 10nmol pode visto a seguir:

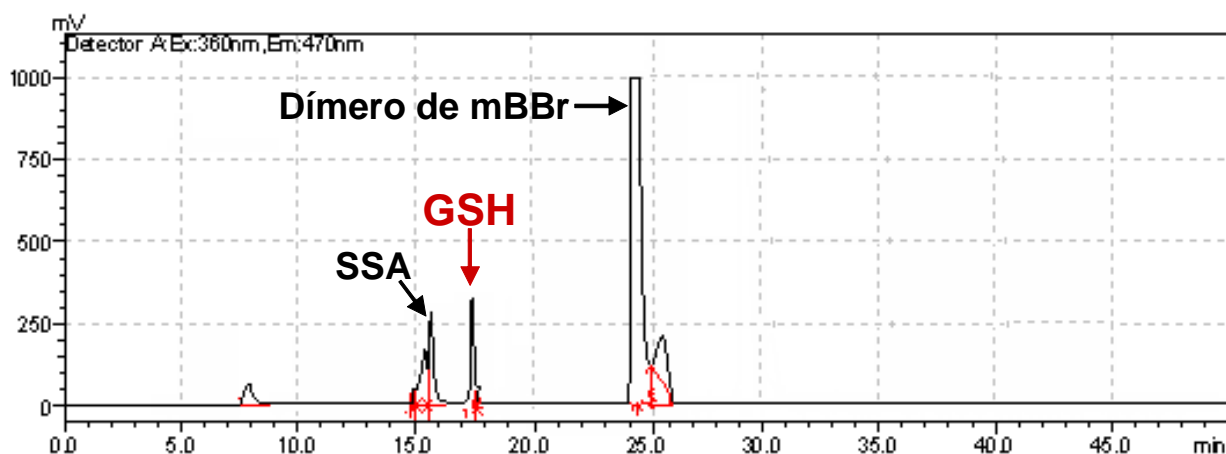


Figura 23. Cromatograma característico de detecção de GSH após derivatização com mBBr. Solução padrão de GHS (10 nmol) foi derivatizada e injetada em cromatógrafo, sendo a detecção feita por fluorescência. Nessas condições, o tempo de retenção (TR) deste analito foi 17,5 minutos.

As amostras foram preparadas e separadas para dois diferentes tratamentos químicos: um deles tratado com NEM e o outro com NaBH₄, visando bloquear os tióis celulares, para evitar oxidação *in vitro*, ou provocar redução dos mesmos, respectivamente. Imediatamente após os tratamentos as amostras foram derivatizadas, preparadas para a análise cromatográfica e alíquotas retiradas para determinação de massa protéica. Abaixo encontra-se um registro característico da corrida cromatográfica de amostra proveniente do Grupo controle tratado com NEM.

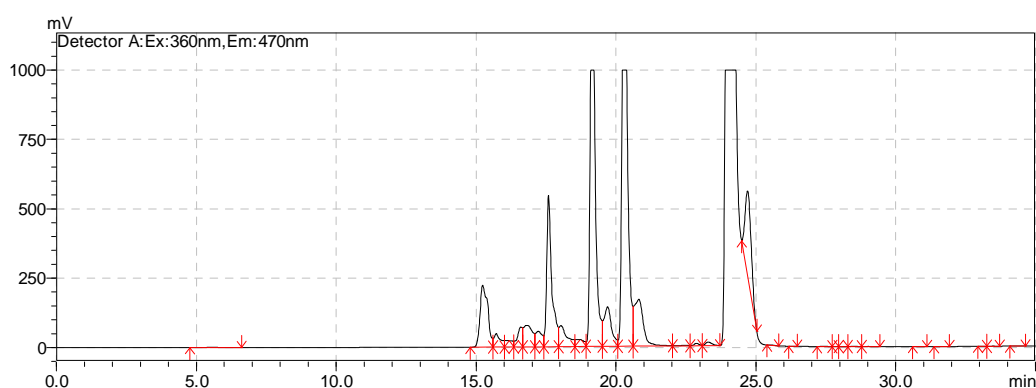


Figura 24. Cromatograma característico de amostra do Grupo controle (macrófagos dormentes) tratado com NEM. O pico característico de identificação de GSH (TR 17,5 minutos) está identificado, cuja intensidade de sinal foi de 500 mV.

A validação da análise cromatográfica foi realizada com acréscimo de padrão autêntico de GSH. O cromatograma abaixo mostra um resultado desta validação, quando foi utilizada a mesma amostra cuja análise está mostrada anteriormente (Figura 25), na qual foram acrescentados 25 nmol de GSH.

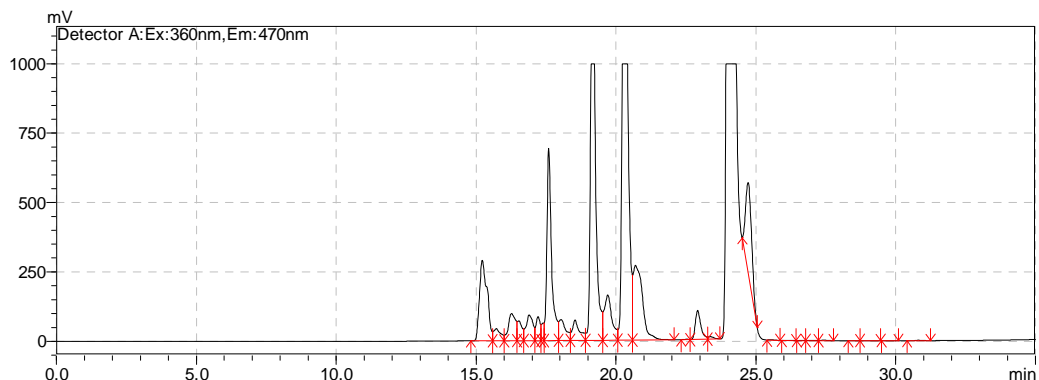


Figura 25. Cromatograma mostrando a validação do método usado para detecção e quantificação de GSH. Amostra de extrato celular do grupo controle tratado com NEM foi acrescida de 25 nmol de GSH. O TR identificado foi de 17,5 minutos, e a intensidade do sinal foi de 700 mV.

Para a determinação da concentração total de GSH presente nas amostras foi feito o tratamento das alíquotas com o agente fortemente redutor NaBH_4 , seguindo-se as mesmas condições de derivatização e tratamento das amostras.

A concentração de GSH e da forma oxidada GSSG foi calculada estequiometricamente. Os resultados mostraram que o tratamento das células com Ac-Tempo determinou queda da concentração de GSH, sem aumento proporcional da concentração de GSSG (Figura 26).

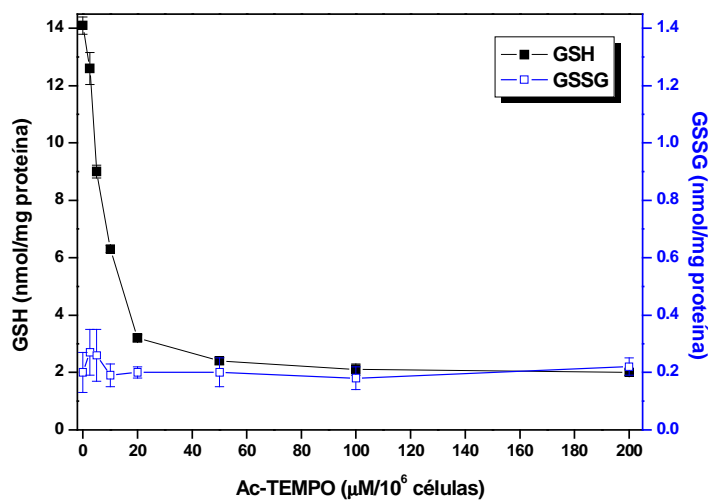


Figura 26. Efeito de tratamento de macrófagos com Ac-Tempo sobre a concentração celular de GSH e GSSG. Macrófagos tratados com diferentes concentrações do nitróxido Ac-Tempo foram submetidos à análise cromatográfica para quantificação de GSH e GSSG.

5.7. Determinação da S-glutationilação protéica em macrófagos e efeito de Ac-Tempo sobre esse processamento pós-traducional

A modificação protéica por S-glutationilação foi determinada usando anticorpo anti-GSH. As alíquotas das amostras com diferentes grupos de tratamento contendo em todos 3µg de proteína foram transferidas para a membrana de nitrocelulose e para confirmar a eficiência da transferência a membrana foi corada com Vermelho de Ponceau.

Confirmada a transferência seguiu-se a realização do “dot blot” conforme estabelecido anteriormente. Após a revelação, a intensidade de S-glutationilação protéica foi confirmada visualmente e analisada por densitometria para que fosse feita a quantificação já que este método do “dot blot” não é quantitativo.

No grupo em que foi feito o bloqueio do grupamento tiolíco com NEM o grupo controle mostra um nível basal de S-glutationilação. As células estimuladas com PMA revelaram uma quantidade maior de ocorrência de S-glutationilação, (aumento de 20% comparando-se com células dormentes). No grupo de células dormentes tratado com o nitróxido, esse processo foi fracamente detectado, em uma intensidade marcante menor (36%) que em células controle. Nas amostras de macrófagos tratados com Ac-Tempo e posteriormente estimulados, houve decréscimo de 48% da marcação com anticorpo anti-GSH, indicando claramente a interferência desse nitróxido no processo pós-traducional de ligação de GSH a estruturas protéicas.

O tratamento das amostras com NaBH₄ aboliu a marcação com o anticorpo anti-GSH, resultado coerente com a ação desse redutor químico sobre a ligação proteínas-GSH.

A Figura 27 mostra a membrana de nitrocelulose corada e abaixo a revelação do “dot blot” e a respectiva densitometria.

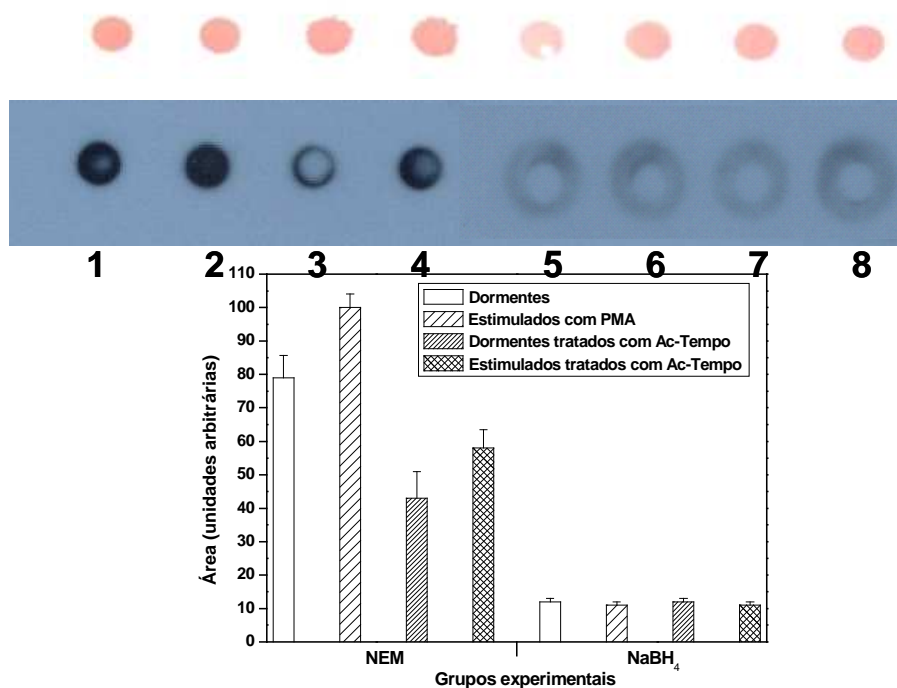


Figura 27. Identificação de S-glutathionilação protéica em macrófagos. A numeração corresponde às amostras: 1: macrófagos dormentes; 2: macrófagos estimulados com PMA (100 ng/10⁶ células); 3: macrófagos dormentes tratados com Ac-Tempo (100 μM); 4: macrófagos tratados com Ac-Tempo (100 μM) e estimulados com PMA (100 ng/10⁶ células). As amostras 4, 5, 6 e 7 correspondem, respectivamente, a alíquotas de 1, 2, 3 e 4 tratadas com o redutor NaBH₄.

6. DISCUSSÃO

Os fagócitos são células que participam ativamente no processo de defesa do organismo. Os macrófagos são células efetoras de resposta tardia no processo inflamatório, que, frente a uma agressão respondem com modificações metabólicas que

fazem aumentar sua capacidade microbicida e tumoricida. Nesta resposta, entre outros componentes, são produzidas ERO/ERN (BRASILEIRO FILHO, 2000).

Diferentes agentes são capazes de ativar o complexo NADPH oxidase dos macrófagos levando a produção de $O_2^{\bullet-}$. O forbol co-carcinogênico PMA, que estimula o “burst” respiratório de macrófagos diretamente pela via PKC, determinou um consumo máximo de O_2 de $3,2 \pm 0,25$ nmoles/min/ 10^6 (Figura 12). Esse consumo, estequiometricamente igual à produção do radical $O_2^{\bullet-}$, é resultante da ativação do complexo NADPH oxidase de fagócitos (HATANAKA et al, 2003)

O complexo NADPH oxidase é um sistema enzimático multi-compartimentalizado, com componentes localizados no citossol e na membrana de grânulos secretórios em estado não estimulado. Assim, um período “lag” de resposta do sistema, após a adição de um composto capaz de provocar a ativação do mesmo, é concernente à montagem do complexo enzimático para a produção catalítica de $O_2^{\bullet-}$. Foi mostrado que em neutrófilos humanos, o estímulo com PMA determina rápida despolarização de membrana, evento que se inicia apenas 5 segundos após o contato do forbol com a membrana celular, enquanto que a produção de $O_2^{\bullet-}$ é detectada depois de 50 segundos da adição do mesmo agente. Neste relato, a especificidade da resposta desse agente químico foi claramente demonstrada por comparação com o uso do análogo estrutural 4-O-metil forbol 12-miristato 13-acetato, o qual foi incapaz de elicitar ambas as respostas celulares, despolarização de membrana e produção de $O_2^{\bullet-}$, as quais também estão ausentes em fagócitos de pacientes portadores de CGD (WHITIN et al., 1980). Em células de mesma origem, outros relatos mostraram um período “lag” médio de 54 segundos como resposta à mesma concentração de neutrófilos (NEWBURGER et al., 1980). Embora estivéssemos trabalhando com macrófagos, detectamos que um tempo médio de 10 segundos foi necessário para que as células respondessem ao estímulo e por esta razão foi monitorado o “burst” respiratório dos macrófagos por um período igual a dois minutos.

A produção de ERO/ERN por fagócito é um processo que ocorre sob um refinado controle fisiológico (PONTREMOLI et al., 1989; BRIGAGÃO & COLEPICOLO, 1996;

CHAN et al., 1998; HATANAKA et al., 2003). Se de um lado esse evento representa uma resposta essencial do organismo contra agentes estranhos, por outro pode determinar lesões oxidativas irreversíveis quando ocorre de forma descontrolada. Este fato é claramente mostrado com a liberação extensa de ERO/ERN por fagócitos associada a diferentes patologias como artrite reumatóide, lesão por isquemia e reperfusão, síndrome do distresse respiratório do adulto, enfisema pulmonar (MOREL et al., 1991; KAUR & HALLIWELL, 1994; BABIOR, 2000). O controle do “burst” respiratório de fagócitos por agentes exógenos tem, assim, se tornado um possível alvo bioquímico para se sustentar o equilíbrio entre a produção de oxidantes e a ação de antioxidantes em focos inflamatórios.

Em consequência à diversidade de componentes e à multiplicidade de vias de transdução de sinais bioquímicos capazes de ativar e sustentar a atividade catalítica do complexo NADPH oxidase, uma variedade de agentes, com maior ou menor especificidade, é capaz de exercer efeito inibitório sobre esse sistema. Estes compostos são divididos em duas grandes classes, com base em seus alvos bioquímicos: aqueles que inibem a atividade do sistema em células íntegras, mas são inertes quando testados sobre a enzima isolada e reconstituída em um sistema “cell free”, e aqueles capazes de exercer um efeito inibitório direto sobre os diversos componentes do complexo, mostrando, portanto, capacidade de impedir a liberação de $O_2^{\bullet-}$ tanto por fagócitos íntegros quanto por preparações da enzima isolada (CROSS, 1990).

No primeiro grupo encontram-se substâncias que interferem em um ou mais estágios da montagem do complexo, ou nas diferentes vias de transdução de sinais necessárias à sustentação da produção de $O_2^{\bullet-}$, ou ainda, em vias metabólicas específicas que são acionadas na célula durante o “burst” respiratório, como a via das hexoses monofosfato (BECKER, 1983). Inibidores de vias de sinalizações específicas, como a toxina pertússica, capaz de inibir a transdução de sinal via proteína G (CASEY & GILMAN, 1988), aspirina (MARIDONNEAU-PARINI et al., 1986), diclofenaco e indometacina (CROSS, 1990), inibidores do metabolismo de fosfolípidos, além de compostos que contêm selênio (GOPALAKRISHNA et al., 1997), alfa-tocoferol (CHAN

et al., 2001) e flavonóides (LU et al., 2001; MENG et al., 2001; KO et al., 2004), que inibem a atividade catalítica de proteínas quinases ou ativam fosfatases, são alguns dos compostos conhecidos como capazes de suprimir o “burst” respiratório de fagócitos por vias bioquímicas específicas.

Entre os inibidores diretos do complexo NADPH oxidase encontram-se aqueles compostos capazes de impedir ou retardar a ativação do mesmo. Assim, inibidores da ação de flavoproteínas, como o análogo de FAD, 5-deaza-FAD, além de difeniliodônio e quinacrina, que, por possuírem potencial redox maior que FAD impedem a transferência de elétrons para o citocromo b_{558} a partir de NADPH, determinam menor produção de $O_2^{\bullet-}$ provocando um aumento do período “lag” do sistema enzimático (CROSS, 1990). Efeito semelhante é exercido por $^{\bullet}NO$, que impede a montagem do complexo NADPH oxidase, retardando ou anulando a produção de $O_2^{\bullet-}$ por neutrófilos em função da concentração no meio de reação (FUJII et al., 1997; RODENAS et al., 1998).

A incubação prévia das suspensões celulares de macrófagos inflamatórios com Ac-Tempo determinou uma inibição do “burst” respiratório com uma correlação direta entre a dose do nitróxido e a quantidade de O_2 consumida pelos fagócitos. Esse efeito não pode ser atribuído a uma possível toxicidade do nitróxido, uma vez que a viabilidade celular se mantém inalterada quando se comparam populações de macrófagos não tratados e expostos a doses de nitróxido capazes de inibir totalmente a atividade do complexo NADPH oxidase.

Os nitróxidos são descritos como agentes que apresentam atividade SOD mimética ou simplesmente “SOD like”, cujo mecanismo de ação envolve um par redox oxoamônio/nitróxido. Nesta reação, os nitróxidos agem como catalizadores da dismutação de $O_2^{\bullet-}$ para H_2O_2 e oxigênio (SOULE et al., 2007). Por esta razão não foi usada as metodologias envolvendo a detecção direta de liberação de $O_2^{\bullet-}$, como o teste espectrofotométrico de redução do citocromo *c* ou o teste luminescente com uso de luminol, pois poderia haver alteração nos resultados obtidos decorrentes da reação direta entre o nitróxido Ac-Tempo e $O_2^{\bullet-}$.

O nitróxido Ac-Tempo é um composto paramagnético, uma espécie radicalar estável, apresenta estrutura conjugada de nitróxido e acridina. O sistema químico fenol/H₂O₂/peroxidase/GSH ou cisteína e HRP utilizado mostrou-se sensível ao bloqueio dos grupamentos tiólicos (Figura 14), o que permite inferir que esses compostos são essenciais para a reação.

Os compostos fenólicos são bons substratos para peroxidases que catalizam a oxidação de fenóis formando um produto intermediário, o radical fenoxil, que pode ser reduzido pela GSH ou outros tióis dando origem aos radicais tiila (GOLDMAN et al., 1999). A interação com radicais tiila determina o decaimento do sinal característico em EPR (resultante do esqueleto Tempo) e aumento de fluorescência (resultante do esqueleto de acridina) (BORISENKO et al., 2004). Assim, foi possível determinar, através de duas metodologias diferentes, a ocorrência de radicais tiila com uso de uma única sonda química conforme mostrado na Figura 16.

O aumento da fluorescência e decaimento do sinal de EPR mostraram-se dependentes da concentração de GSH, resultados confirmados pela estequiometria linear apresentada na reação GSH: Ac-Tempo (1:1), explicitado na (Figura 17).

Com base na interação entre nitróxidos e radicais tiila que foram produzidos no sistema químico usando o ciclo catalítico das peroxidases, foi utilizado Ac-Tempo para detectar a produção de radicais tiila em macrófagos peritoneais inflamatórios dormentes ou após estimulação do “burst” respiratório. Assim como no sistema químico foram usadas as metodologias por EPR e fluorescência. Os resultados obtidos no sistema químico e no sistema celular tiveram boa correlação em ambas as metodologias, uma vez que os espectros de fluorescência foram similares (Figura 19).

Através do estímulo com diferentes concentrações de PMA foram produzidos radicais tiila e dessa forma o sinal característico do nitróxido decresceu enquanto o sinal de fluorescência aumentou. Essa interação entre os nitróxidos e radicais tiila em condições biologicamente relevantes é tida como responsável pela proteção exercida pelos nitróxidos já que os radicais tiila seriam eficientemente retirados do meio. Esta proteção é claramente mostrada quando se usou células HL-60 tratadas com Ac-Tempo, onde esse nitróxido mostrou-se capaz de prevenir a oxidação de GSH induzida

por fenol/H₂O₂, protegendo as células contra efeitos tóxicos induzidos por fenol/H₂O₂ através de reação com radicais tiila (BORISENKO et al., 2004).

Para que fosse feita a confirmação da presença de radicais tiila durante a estimulação do “burst” respiratório dos macrófagos foi utilizada a incubação prévia com NEM, um agente alquilante específico de grupos tióis, e BSO, que inibe a enzima glutatona sintetase. Após o tempo específico de incubação para cada um destes compostos foi feito o tratamento das células com o nitróxido e estímulo com PMA para posterior registro dos espectros de EPR. Podemos perceber (Figura 20) que ocorreu uma redução no sinal por EPR, sem, entretanto, ocorrer supressão completa do mesmo. Esse fato pode ser atribuído à reação de Ac-Tempo com outras espécies radicalares, especialmente radicais centrados no carbono (BORISENKO et al., 2004).

A capacidade das células comunicarem-se uma com as outras e responder ao seu ambiente constitui um mecanismo biológico importante. As modificações reversíveis pós-transcrição e pós-tradução nas estruturas protéicas governam a resposta adaptativa das células ao ambiente. Entre outros mecanismos bem estabelecidos dessas modificações, incluem-se as interações proteínas-proteínas, mudanças alostéricas induzidas pela ligação de efetores específicos, processos proteolíticos, além de modificações químicas como acilação, acetilação, alquilação e fosforilação em diferentes sítios de proteínas específicas. O princípio do processo de S-tiolação/detiolação, como todas essas formas dinâmicas de modificações protéicas, é um balanço entre a formação reversível de ligações de compostos tiólicos a sítios específicos que determinam modificações individuais em diferentes proteínas, o qual ocorre como uma resposta rápida e eficiente da célula a situações de estresses oxidativo/nitrosativo (THOMAS et al., 1995; KLATT & LAMAS, 2000).

Durante o processo de fagocitose ou sob estímulos específicos, os fagócitos profissionais produzem grande quantidade de espécies oxidantes, assim, o consumo de O_2 é aumentado e esta espécie é convertida em $O_2^{\bullet-}$ e, posteriormente por enzimas como a SOD e mieloperoxidases, a H_2O_2 , HClO e HO^{\bullet} , oxidantes mais potentes que $O_2^{\bullet-}$. O complexo enzimático NADPH oxidase de membrana é internalizado durante a

formação do fagossoma, e as espécies oxidantes, especialmente H_2O_2 , entram no citoplasma celular. Desse modo, as próprias células fagocitárias ficam expostas ao ataque oxidativo dessas ERO/ERN, podendo ocorrer ações deletérias devidas ao desbalanço entre a produção de oxidantes e a ação de antioxidantes enzimáticos e de baixo peso molecular, levando à perda de função celular ou em algumas doenças como a artrite reumatóide é possível que a presença constante de neutrófilos e macrófagos contribuam para a sustentação do dano oxidativo (BABIOR, 2000; BABIOR, 2002).

O mecanismo reversível de S-glutationação protéica é um evento metabólico importante que está diretamente associado à produção de oxidantes por fagócitos. A sua importância está relacionada com a proteção de estruturas celulares contra danos potenciais acarretados por ERO/ERN produzidos pelas próprias células fagocitárias, quanto na regulação metabólica que sustenta tal produção (RINNA et al., 2006; DALLE-DONNE et al, 2007; GALLOGLY & MIEYAL, 2007).

Nesse trabalho estudamos a S-glutationação protéica em macrófagos inflamatórios para verificarmos se o efeito de Ac-Tempo sobre o “burst” respiratório estimulado por PMA correlacionava-se com esse processo de modificação protéica. A análise por “dot blot” da S-glutationilação protéica em macrófagos apresentou diferenças entre os diferentes grupos de tratamento. No grupo tratado com NEM as amostras do grupo controle apresentaram um nível basal de S-glutationilação já que este processo ocorre em condições fisiológicas. Quando os macrófagos foram estimulados, foi detectado um aumento significativo no nível alto S-glutationilação protéica, indicando uma resposta ao estímulo externo com PMA, paralelo à ativação do “burst” respiratório dos macrófagos. Esse resultado é coerente com relatos prévios da literatura, onde o mecanismo reversível de S-glutationação protéica foi mostrado como um evento metabólico importante diretamente associado à produção de oxidantes por fagócitos, tanto na proteção de estruturas celulares contra danos potenciais acarretados por ERO/ERN produzidos pelas próprias células fagocitárias, quanto na regulação metabólica que sustenta tal produção (Chai et al., 1994a; RAVICHANDRAN et al., 1994; CARR; WINTERBOURN, 1997). Nos fagócitos tratados com o nitróxido houve redução na taxa de S-glutationilação, o que sugere uma possível ação desse

composto nas células dormentes. De forma marcante, a análise das suspensões celulares tratadas com Ac-Tempo e posteriormente estimulados pela via PKC, mostra claramente que esse agente foi capaz de alterar a resposta das células com significativa diminuição do processo de S-glutationilação. Todos os grupos experimentais tratados com um agente redutor, NaBH_4 , quando analisados, mostraram supressão praticamente completa da marcação com o anticorpo anti-GSH, o que comprova que esse é um processo oxidativo, reversível por redução química.

O processo de S-glutationilação é um mecanismo de sinalização celular que ocorre em resposta ao meio ambiente celular ou estímulo, como neste trabalho, feito pelo PMA. Durante este processo, o grupamento lateral do(s) resíduo(s) de cisteína em uma proteína é sensível à oxidação, e forma com GSH uma ligação dissulfeto. S-glutationilação constitui um mecanismo de proteção às estruturas protéicas contra danos irreversíveis em condições de elevado estresse oxidativo/nitrosativo. Quando este sítio protéico é uma enzima, poderá ocorrer alteração da atividade enzimática (DALLE-DONNE et al., 2007; GHEZZI & DI SIMPLICIO, 2007). Alguns fármacos, como o dissulfiram, que é usado para o tratamento do alcoolismo, mostrou-se capaz de provocar um desequilíbrio no estado redox de GSH intraplaquetária induzindo S-glutationilação reversível (ROSSI et al., 2006).

A ativação do “burst” respiratório em células antes dormentes provoca a liberação de ERO/ERN produzidas pelo complexo NADPH oxidase e esta ativação pode ser por diversos agentes como o PMA que é um ativador da PKC (BABIOR, 1992).

Os tióis ou proteínas que contém este grupamento exercem um papel fundamental na sinalização redox uma vez que alterações no estado celular redox causadas por ERO/ERN podem levar à formação de dissulfetos mistos protéicos (proteína-GSH) e/ou formação/reposicionamento/rompimento de dissulfetos intramoleculares. (FORMAN & TORRES, 2001).

A S-glutationilação é uma modificação protéica pós-traducional que pode modificar a atividade de algumas proteínas que possuem em seu sítio um resíduo de cisteína. Muitas proteínas que regulam vias sinalizadoras, como quinases, fosfatases e

fosfolipases, e fatores de transcrição que controlam crescimento celular, diferenciação e apoptose, sofrem regulação por S-glutathionilação (DALLE-DONNE et al., 2007).

Regulação da atividade catalítica das fosfatases é mostrada através de S-glutathionilação, processo que inativa a Proteína Tirosina Fosfatase (PTP) (FORMAN & TORRES, 2001). Outro exemplo de fosfatase regulada por este mecanismo é Proteína Fosfatase 2 (isoforma PP2A), embora existam poucos estudos mostrando esta regulação que envolveria um resíduo de cisteína 273 (RUNNEGAR et al., 1995). Além disso, em células Caco-2 esta regulação de PP2A e aumento na fosforilação da treonina é causada pela presença de H₂O₂ que poderia ser causada por ativação de uma ou mais isoformas de PKC (RAO & CLAYTON, 2002). Com relação ao sítio de regulação existem quanto a sua localização, pois usando como modelo PTP1B Ghezzi & Simplicio (2007) mostraram que esta regulação está relacionada à oxidação do resíduo de cisteína 215.

Outro fator importante para a reatividade de tióis protéicos é o valor de pK_a. Quando desprotonados (tiolatos) a reatividade dos tióis é maior. Em tióis protéicos e em GSH o valor de pK_a gira em torno de 8,5. Porém, em PTP que são as fosfatases mais susceptíveis à oxidação o pK_a fica em 4,7-5,4. Esse baixo valor de pK_a é crucial para a atividade da enzima, pois em pH fisiológico estes grupamentos tiólicos estão desprotonados e podem ser oxidados mesmo na presença, ou até mesmo em excesso de outros resíduo de cisteína (BARTOSZ, 2008).

Muitas evidências mostram o envolvimento das quinases na sinalização celular (GOPALAKRISHNA & JAKEN, 2000; FORMAN & TORRES, 2001; DALLE-DONNE et al., 2007; BARTOSZ, 2008). Em especial, a PKC é descrita por estar em um grupo de moléculas que são sensíveis para modificações redox, pois tanto em seu domínio catalítico quanto no regulatório, a enzima possui regiões ricas em cisteína que são sítios para regulação redox, porém a presença de alta concentração de resíduos de cisteína e de zinco fazem do domínio regulatório da PKC um alvo mais sensível para regulação redox que outros tióis. A ativação desta enzima por um forbol, como o PMA, é prolongada e muito mais eficiente devido à estabilidade do forbol dentro da célula (GOPALAKRISHNA & JAKEN, 2000).

Assim como as quinases, a proteína Ras também possui cisteínas chave no seu domínio regulatório que também são passíveis de oxidação (WINTERBOURN & HAMPTON, 2008). Este fato levanta a hipótese de que os próprios componentes do complexo NADPH oxidase estariam sofrendo regulação por S-glutathionação, mas a confirmação desta hipótese só seria possível com testes em sistema “cell-free” ou através de imunoprecipitação.

O processo de S-glutathionação protéica é metabolicamente relevante, tanto por constituir-se num mecanismo de proteção ao estresse oxidativo/nitrosativo, quanto por prover uma regulação metabólica que supre as necessidades celulares sob situações específicas. Nosso trabalho mostra que, paralelamente a outros eventos metabólicos como fosforilação (ANDREWS ; BABIOR, 1984; CHAN et al., 2001) e síntese protéica (EDWARDS et al., 1989; McCOLLS et al., 1990; STRINGER et al., 1995; BRIGAGÃO; COLEPICOLO, 1996; BRIGAGÃO; COLEPICOLO, 1998), a S-glutathionação protéica está intrinsecamente ligada à resposta de macrófagos ao estímulo do complexo NADPH oxidase. Explicitamos aqui que esse processo pode ser modulado pelo nitróxido Ac-Tempo, o que coloca esse mecanismo pós-traducional como um possível alvo farmacológico para o desenvolvimento de drogas que modulem a liberação de oxidantes por fagócitos.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos e discutidos conjuntamente nesse trabalho permitem propor as seguintes conclusões:

1. O nitróxido Ac-Tempo inibe o “burst” respiratório de macrófagos estimulados pela via de PKC.
2. A formação de radicais tiila durante a ativação do complexo NADPH oxidase é um alvo preponderante para reação do nitróxido..
3. O efeito de Ac-Tempo é exercido através da diminuição do processo de S-glutinationação protéica associada ao “burst” respiratório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, R.R.; GRIFFITHS, L.M. Basic Methods in Biochemistry. 2 ed. New York: Wiley- Liss, 1992.

ANDREWS, P.C., BABIOR, B.M. Phosphorylation of cytosolic proteins by resting and activated human neutrophils. **Blood**, v. 64, p. 883-890. 1984.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase. **Current Opinion in Immunology**, v. 16, p. 42-47. 2004.

BABIOR, B.M. et al. Investigating antibody-catalysed ozone generation by neutrophils. **PNAS**, v. 100, p. 3031-3034. 2003.

BABIOR, B.M. Phagocytes and oxidative stress. **Am J Med**, v. 109, p. 33-44. 2000.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, n. 5, p. 1464-1476, march. 1999.

BABIOR, B.M. The respiratory burst oxidase. **Adv Enzymol**, v. 65, p. 49-95. 1992.

BARTOSZ, G. Reactive oxygen species: destroyers or messengers?, *Biochemical Pharmacology* (2008), doi: 10.1016/j.bcp.2008.11.009

BECKER, E.L. Chemotatic factors of inflammation. *Trends Pharm Sci*, v. 4, p. 223-225. 1983.

BOER, M. de et al. A donor splice site mutation in intron 1 of CYBA, leading to chronic granulomatous disease. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v.35, p. 365 – 369. 2005.

BORISENKO, G.G. et al. Nitroxides scavenge myeloperoxidase-catalyzed thiol radicals in model systems and in cells. **Journal of the American Chemical Society**, v.126. p. 9221-9232. 2004.

BORREGAARD, N.; TAUBER, A.I. Subcellular localization of the human neutrophil NADPH oxidase. **J Biol Chem.**, n. 259, p.47-52. 1984.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteins-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254. 1976.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia Geral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

BRIGAGÃO, M.R.P.L.; BARROSO, A.S.; COLEPICOLO, P. Fluctuation of reactive oxygen species released by inflammatory cells. *In: The Redox State and Circadian Rhythms*. Driessche T.V. (ed). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 2000.

BRIGAGÃO, M.R.P.L.; COLEPICOLO, P. Oscillations in superoxide anion release by polymorphonuclear leukocytes and its inhibition by human saliva. **Biol Rhythm Res.**, v. 27, n.3, p. 269-280. 1996.

BRIGAGÃO, M.R.P.L.; COLEPICOLO, P. Activation of neutrophils is daily inhibited by saliva. **Biol Rhythm Res**, n. 29, p. 598-605.1998.

CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. **Annu Rev Biochem**, v. 58, p. 79-110.1989.

CAMARERO, V.C.P.C. et al.. Epithelioid macrophages secrete a deactivating factor for superoxide release. **J Cel Physiol**. v.145, p. 481-487. 1990.

CASEY, P.J.; GILMAN, A.G.G protein involvement in receptor-effector coupling. **J Biol Chem**, v. 263, p. 2577-22580. 1988.

CARR, A.C.; WINTERBOURN, C.C. Oxidation of neutrophil glutathione and protein thiols by myeloperoxidase- derived hypochlorous acid. *Biochem J.*, v. 327, p. 275-281. 1997.

CHAI, Y.C. et al. S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch Biochem Biophys*, v. 310, n. 1, p. 273-281. 1994.

CHAI, Y. C.; HENDRICH, S.; THOMAS, J.A. (1994b) Protein S-thiolation in hepatocytes stimulated by t-butyl hydroperoxide, menadione, and neutrophils. *Arch Biochem Biophys*, v. 310, p. 264-272. 1994b.

CHAN, S.S. et al. Functional activity of blood polymorphonuclear leukocytes as an oxidative stress biomarker in human subjects. *Free Rad Biol Med*, v. 24, p. 1411-1418. 1998.

CHAI, Y.C. et al. Identification of an abundant S-thiolated rat liver protein as carbonic anhydrase III; characterization of S-thiolation and dethiolation reactions. *Arch Biochem Biophys*, v. 284, p. 270-278. 1999.

CHAN, S.S. et al. Alpha-tocopherol modulates tyrosine phosphorylation in human neutrophils by inhibition of protein kinase C activity and activation of tyrosine phosphatases. *Free Radic Res*, v. 35, p. 843-856. 2001.

CIMATO, A.N. et al. Antioxidant effects of water- and lipid-soluble nitroxide radicals in liposomes. *Free Radical in Biology & Medicine*, v. 37, n. 12, p. 2042- 2051. 2004.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins Patologia Estrutural e Funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

CROSS, A.R. Inhibitors of the leukocyte superoxide generating oxidase. Mechanisms of action and methods for their elucidation. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 8, p. 71-93. 1990.

CUZZOCREA, S. et al. Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces dinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. **European Journal of Pharmacology**, v. 406, p. 127-137. 2000.

DALLE-DONE, I. et al. Reversible S-glutathionylation of Cys³⁷⁴ regulated actin filament formation by inducing structural changes in the actin molecule. **Free Rad Biol Med.**, v.34, p.23- 32. 2003.

DALLE-DONNE, I. et al. S-glutathionylation in protein redox regulation. **Free Radical Biology & Medicine**, v.43, p.883-898. 2007.

DAMIANI, E. et al. The effects of nitroxide radicals on oxidative DNA damage. **Free Radical Biology & Medicine**, v.28, n. 08, p. 1257-1265. 2000.

DE GRAFF, W.G. et al. Nitroxides- mediated protection against X-ray- and neocarzinostatin- induced DNA damage. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 13, p. 479-487. 1992.

DEMASI,M.; SHRINGARPURE, R.; DAVIES, K.J.A. Glutathiolation of the proteasome is enhanced by proteolytic inhibitors. **Arch Biochem Biophys.** ,v. 389, p. 254-263. 2001.

DI MASCIO,P. et al. Diurnal rhythm of β -catorene in photosynthetic alga *Gonyaulax polyedra*. **Biol Chem Hoppe-Seyler**, v. 376, p. 297-301. 1995.

DYKE, K.V. Soluble and insoluble activators of neutrophil chemiluminescence. *In: The Molecular Basis of Oxidative Damage by Leukocytes*. Jesaitis A.J., Dratz E.A. (ed). Montana: Big Sky, 1991.

EATON, P; FULLER, W.; SHATTOCK, M.J. S-thiolation of HSP27 regulates its multimeric aggregate size independently of phosphorylation. **J Biol Chem**.v.277, p. 21189-21196.2000.

EATON P. et al. Detection, quantitation, purification, and identification of cardiac proteins S-thiolated during ischemia and reperfusion. **J Biol Chem.** ,v.277, p. 9806-9811.2002.

EDWARDS, S.W.; HOLDEN, C.S; HUMPREYS, J.M.; HART, C.A. (1989) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) primes the respiratory burst and stimulates protein biosynthesis in human neutrophils. **FEBS Letters.**, v. 256, p. 62-66.1989.

FEDELI, D. et al. Nitroxide radicals protect against DNA damage in rat epithelial cells induced by nitric oxide, nitroxyl anion and peroxynitrite. **Mutation Research**, v. 535, p. 117-125. 2003.

FIGUEIREDO-PEREIRA, M.E.; YAKUSHIN, S.;COHEN, G. (1998) Disruption of the intracellular sulfhydryl homeostasis by cadmium-induced oxidative stress leads to protein thiolation and ubiquitination in neuronal cells. **J Biol Chem.**, v.273, p.12703-12709. 1998.

FINDLAY, V.J.; TAPIERO, H.; TOWNSEND, D.M. Sulfiredoxin: a potential therapeutic agent? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.59, p. 374-379. 2005.

FORMAN, H.J.; TORRES, M. Redox signaling in macrophages. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, p. 189-216. 2001.

FUJII, H Nitric oxide inactivates NADPH oxidase in pig neutrophils by inhibiting its assembling process. **J Biol Chem.**,v. 272, n.52, p.32773-32778.1997

GALLOGLY, M.M.; MIEYAL, J.J. Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress. **Current Opinion in Pharmacology**, v.7, p.381-391. 2007.

GHEZZI, P.; DI SIMPLICIO. Glutathionylation pathways in drug response. **Current Opinion in Pharmacology**, v.7, p. 398- 403. 2007.

GIANNINI, C.New sesquiterpene derivatives from the sponge *Dysidea* species with a selective inhibitor profile against human phospholipase A₂ and other leukocyte functions. **J Nat Prod**, v. 64, p. 612-615. 2001.

GOLDMAN, R. Myeloperoxidase- catalysed redox- cycling of phenol promotes lipid peroxidation and thiol oxidation in HL-60 cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 9/10, p. 1050-1063. 1999.

GOLAPALAKRHISNA, R.; GUNDIMEDA, U.; CHEN, Z. Cancer preventive selenocompounds induce a specific redox modification of cysteine-rich regions in calcium-dependent isoenzymes of protein kinase C. **Arch Biochem Biophys**, v. 348, p. 25-36.1997.

GOPALAKRISHNA, R.; JAKEN, S. Protein kinase C signaling and oxidative stress. **Free Radicals Biology & Medicine**, v. 28, n. 9, p. 1349-1361. 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDG, J.M.C. **Free Radical in Biology and Medicine**.4 ed. New York: Oxford University Press.,2007.

HAMPTON, M.B.; KETLE, A.J.; WINTERBOURN, C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v. 92, p. 3007-3017. 1998.

HATANAKA E.; RIBEIRO, F.P.; CAMPA, A. The acute phase protein serum amyloid A primes neutrophils. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 38, n. 1, p. 81-84, 2003.

HEO, S.K. et al. NADPH oxidase activation is required for migration by LIGHT in human monocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 371, p.834–840. 2008.

HUANG, K.P.;HUANG, F.L. Glutathionylation of proteins by glutathione disulfide S-oxide. **Biochem Pharmacol.**, v.64, p. 1049-1056. 2002.

ISOGAI, Y.et al. Superoxide production by cythchrome b558 purified from neutrophils in a reconstituted system with an exogenous reductase. **J Biol Chem**, v. 266, p. 13481-13484. 1991.

ISRAELI, A. et al. Kinetics and mechanism of the comproportionation reaction between oxoammonium cation and hydroxylamine derived from cyclic nitroxides. **Free Radical Biology & Medicine**, v.38, p. 317– 324. 2005.

JESIATIS, A.J. et al. *In: The Molecular Basis of Oxidative Damage by Leukocytes.* Jesiatis A.J., Dratz E.A. (ed) Montana: Big Sky. 1991.

KAUR, H.; HALLIWELL, B. Evidence for nitric oxide- mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. **FEBS Letters**, v. 350, p. 9-12. 1994.

KHAM, A.U.; WILSON, T. Reactive oxygen species as cellular messengers. **Chem Biol.**, v.2, p. 437-445. 1995.

KLATT, P.; LAMAS, S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. **Eur J Biochem.**, v.. 267, p. 4928-4944. 2000

KLEINMAN, W.A. et al. Protein glutathiolation in human blood. **Biochem Pharmacol.** , v.65. p. 741-746. 2003.

KO, H.J. Anti-inflammatory flavonoids and pterocarpanoid from *Crotalaria pallida* and *C. assamica*. **Bioorg Med Chem Lett.** , v.14, p. 1011-1014.2004.

KOBAYASHI, T.; ROBINSON, J.M.; SEGUCHI, H. Identification of intracellular sites of superoxide production in stimulated neutrophils. **J Cell Sci**, n. 111, p. 81-91. 1998.

KOMAROV, A.M.; JOSEPH, J.; LAI, C.S. In vivo pharmacokinetics of nitroxides in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 201, n. 02, p. 1035-1042. 1994.

KROLL, C.; LANGNER, A.; BORCHERT, H.H. Nitroxides metabolism in the human keratinocyte cell line HaCaT. **Free Radicals Biology & Medicine**, v. 26, n. 7/8, p. 850-857. 1999.

LANDINO ,L.M. et al. Modulation of the redox state of tubulin by the glutathione/glutaredoxin reductase system. **Biochem Biophys Res Commun.** v.314 p. 555-560. 2004.

LINARES, E.; GIORGIO, S.; AUGUSTO, O. Inhibition of in vivo leishmanicidal mechanisms by tempol: Nitric oxide down-regulation and oxidant scavenging. **Free Radical Biology & Medicine**, v.44 p.1668–1676. 2008.

LOPES, L.R.et al. Phosphorylated p40^{phox} as a negative regulator of NADPH oxidase. **Biochem**, n. 43, p. 3723-3730. 2004.

LOMAX, K.J. et al. Recombinant 47-kilodalton cytosol factor restores NADPH oxidase in chronic granulomatous disease. **Science**, n. 245, p.409-412. 1989.

LU, H.W. (2001) Effect of three flavonoids, 5,7,3',4'-tetrahydroxy-methoxy flavone, luteolin, and quercetin, on the stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation of proteins in human neutrophil. **Arch Biochem Biophys**,v. 393, p. 73-77.2001.

LURIE, Z. et al. Do stable nitroxide radicals catalyse or inhibit the degradation of hyaluronic acid? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, n. 02, p. 169-178. 2003.

MARIDONNEAU-PARINI, I.; TRINGALE, S.M.; TAUBER, A.I.. Identification of distinct activation pathways of the human neutrophil NADPH-oxidase. **J Immunol**, v.137, p. 2925-2929.1986.

MATUTE, J.D. et al. p40^{phox}: The last NADPH oxidase subunit. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 35, p. 291 – 302. 2005.

MAWATARI, S.; MURAKAMI, K. Different types of glutathionylation of hemoglobin can exist in intact erythrocytes. **Arch Biochem Biophys**. v.421, p. 108-114.2004.

MCCORD, J.M. ; FRIDOVCH, I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. **J Biol Chem.** ,v.243, p. 5753-5760. 1968.

MENG, Z. Effect of five flavonoid compounds isolated from *Quercus dentata* Thunb on superoxide generation in human neutrophils and phosphorylation of neutrophil proteins. **Clin Chim Acta**, v. 306, p. 97-102. 2001.

MIZEL, S.B. ; JARET, P. **Self Defense**. San Diego: Harcourt Brace Jovanovich, 1985.

MOHR, S. Nitric oxide-induced S-glutathionylation and inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **J Biol Chem.** , v. 274, p. 9427-9430. 1999.

MOREL, F.; DOUSSIERE, J.; VIGNAIS, P.V. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. **Eur J Biochem**, n. 201, p. 523-546. 1991.

NAGY, G. et al., Nitric oxide, chronic inflammation and autoimmunity, **Immunol Lett** (2007), doi:10.1016/j.imelet.2007.04.013.

NEWBURGER, P.E.; CHOVANIEC, M.E.; COHEN, H.J. Activity and activation of the granulocyte superoxide-generating system. **Blood**, v. 55, n. 1, p. 85-92. 1980.

OHSHIMA, H. et al. Prevention of human cancer by modulation of chronic inflammatory processes. **Mutation Research**, v. 591, p. 110-122. 2005.

OSTANIN, D.V. et al. NADPH oxidase but not myeloperoxidase protects lymphopenic mice from spontaneous infections. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.355 ,p.801–806. 2007.

PADGETT, C.M.; WHORTON, A.R. Cellular responses to nitric oxide ;role of protein S-thiolation/dethiolation. **Arch Biochem Biophys.** .v.358, p. 232-242. 1998.

PARKOS, C.A. et al. Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22,000. **J Clin Invest**, n. 80, p.732-748. 1987.

PONTREMOLI, S. Enhanced activation of the respiratory burst oxidase in neutrophils from hypertensive patients. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 158, n. 3, p. 966-972. 1989.

RABADJI, R.C. et al. Oscillation of reactive oxygen species released by activated neutrophils. ***Biol Rhythm Res***, v.27, p. 269-280. 1996.

RAO, P.K.; CLAYTON, L.W. Regulation of protein phosphatase 2A by hydrogen peroxide and glutathionylation. ***Biochemical and Biophysical Research Communications***, v. 293, p. 610-616. 2002.

RAVICHANDRAN, V. et al. S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by the phagocytosis-associated respiratory burst in blood monocytes. ***J Biol Chem.***, v. 269, n. 40, p. 25010-25015. 1994.

ROITT, I.M. ; DELVES, P.J. ***Fundamentos de Imunologia***. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

RINNA, A.; TORRES, M.; FORMAN, H.J. Stimulation of the macrophage respiratory burst by ADP causes selective glutathionylation of the protein tyrosine phosphatase 1B. ***Free Radical Biology & Medicine***, v.41, p. 86-91. 2006.

RODENAS, J.; MITJAVILA, M. T.; CARBONELL, T. Nitric oxide inhibits superoxide production by inflammatory polymorphonuclear leukocytes. ***Am J Physiol.***, v. 274, p. 827-830. 1998.

ROLLETL-LABELLE, E. Hydroxyl radical as a potential intracellular mediator of polymorphonuclear neutrophil apoptosis. ***Free Radical Biology & Medicine***, v. 24, n.4, p. 563-572. 1998.

ROSSI, R. et al. Protein S-glutathionylation and platelet anti-aggregatin activity of disulfiram. ***Biochemical Pharmacology***, v.72, p. 608-615. 2006.

ROTROSEN, D. et al. Cytochrome b558: the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase. ***Science***, n. 265, p.1459-1462. 1992.

SALYERS, A.A.; WHITT, D. **Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach**. Washington: ASM Press, 1994.

SARKAR, D. & FISHER, P.B. Molecular mechanisms of aging- associated inflammation. **Cancer Letters**, v. 236, p.13-23.2006

SAMUNI, A.M.; BARENHOLZ, Y. Site- relationship of nitroxide radical's antioxidative effect. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 34, n. 02, p. 177-185. 2003.

SAMUNI, A. et al. Kinetics and mechanism of hydroxyl radical and OH-adduct radical reactions with nitroxides and with their hydroxylamines. **J. AM. CHEM. SOC.**, v.124, 8719-8724. 2002.

SBARRA, A.J.; KARNOVSKY, M.L. The biochemical basis of phagocytosis. **J Biol Chem.**, v. 234, n. 6, p.1355-1362. 1959.

SCHUPPE, I.; MOLDEUS, P.; COTGREAVE, I.A. Protein-specific S-thiolation in human endothelial cells during oxidative stress. **Biochem Pharmacol.** ,v;44, p. 1757-1764. 1992.

SEGAL, B.H. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. **Medicine**, v. 79, n. 3, p.170-200. 2000.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 25, p. 1058-1071. 1986.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology & Medicine**, v.27, p. 916-921. 1999.

SOULE, B. P. et al. The chemistry and biology of nitroxide compounds. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 42, p.1632-1650. 2007.

STRINGER, R.E.; EDWARDS, S.W. Potentiation of the respiratory burst of human neutrophils by cycloheximide: regulation of reactive oxidant production by a protein(s) with rapid turnover? **Inflamm Res.**, v.44,p.158-163. 1995.

THOMAS, J.A.; POLAND, B.; HONZATKO, R. Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. **Arch Biochem Biophys**, v..319, p. 1-9.1995.

TSUNAWAKI, S. et al. A novel cytosolic component, p 40^{phox}, of respiratory burst oxidase associates with p67^{phox} and is absent in patients with chronic granulomatous disease who lack p67^{phox}. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 199, n. 03, p. 1378-1387, March. 1994.

VAN BRUGGEN, R. et al. Continuous translocation of RAC2 and the NADPH oxidase component p67^{phox} during phagocytosis. **J Biol Chem**, n, 278, p. 9097-9102. 2003.

VENDETTI, E. et al. Nitroxides are more efficient inhibitors of oxidative damage to calf skin collagen than antioxidant vitamins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, p. 58-68. 2008.

VOLPP, B.D. et al. Cloning of the cDNA and functional expression of the 47-kilodalton cytosolic component of human neutrophil respiratory burst. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 86, p. 7195-7199. 1989.

WARD, N.E. et al. Oxidant-induced S-glutathiolation inactivates protein kinase C- α (PKC- α): a potential mechanism of PKC isozyme regulation. **Biochem.**, v.39, p. 10319-10329. 2000.

WHITIN, J.C. et al. Correlation between membrane potential changes and superoxide production in human granulocytes stimulated by phorbol myristate acetate. **J Biol Chem**, v. 225, p. 1874-1878. 1980.

WINTERBOURN, C.C.; HAMPTON. The chemistry and specificity in redox signaling. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 45, p. 549-561. 2008.

YAN, S.X. et al. Tempol, one of nitroxides, is a novel ultraviolet-A1 radiation protector for human dermal fibroblasts. **Journal of Dermatological Science** , v.37, p.137—143. 2005.

ZARR, J.H. **Biostatistical analysis**.3.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996.