

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**LUCIANA SOUZA CHAVASCO**

**REGULAÇÃO DA ATIVIDADE NOX2 DE NEUTRÓFILOS POR  
NITRÓXIDOS**

Alfenas/MG  
2009

**LUCIANA SOUZA CHAVASCO**

**REGULAÇÃO DA ATIVIDADE NOX2 DE NEUTRÓFILOS POR  
NITRÓXIDOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas-MG. Área de concentração: Área 2.  
Orientadora: Profa. Dra. Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão.

Alfenas/MG  
2009

**LUCIANA SOUZA CHAVASCO**

**REGULAÇÃO DA ATIVIDADE NOX2 DE NEUTRÓFILOS POR  
NITRÓXIDOS**

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-MG. Área de concentração: Área 2.

Aprovada em:

Prof.  
Instituição:

Assinatura:

Prof.  
Instituição:

Assinatura:

Prof.  
Instituição:

Assinatura:

**Ao meu grande DEUS pelo dom da vida, pela saúde e pelo trabalho. Aos meus Pais, Vilce e Anderson e ao meu noivo Luis Felipe, pelo amor, apoio e, principalmente compreensão às minhas ausências para 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 especial ao Samuel e Gérsika que se tornaram não apenas colegas de laboratório, mas grandes amigos.

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

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

Ao Gabriel Moraes, técnico do Laboratório de Pesquisa da Bioquímica, pela ajuda e colaboração durante a realização dos experimentos.

Ao meu Tio Kleber Chavasco, pelos bons conselhos prestados nas horas difíceis.

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.

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

À todos aqueles que de alguma maneira colaboraram para a execução deste trabalho.

## RESUMO

Espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas por neutrófilos através do complexo Nox2 estão diretamente associadas às ações deletérias surgidas quando a inflamação escapa do controle da homeostase. A produção exacerbada destas espécies é controlada por ações de antioxidantes endógenos como a glutathiona (GSH), um importante tripeptídeo redutor que repara biomoléculas oxidadas envolvidas na sinalização celular e atua como “scavenger” de biorradicais. Os nitróxidos são radicais livres, sintéticos e estáveis que apresentam propriedades antioxidantes e antiinflamatórias. Recentemente foi demonstrado que estes são capazes de modular o “burst” respiratório de macrófagos, reduzindo a produção de ânions superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) gerados pelo complexo Nox2, em um mecanismo no qual atuam como “scavengers” de radicais tiila ( $RS^{\cdot}$ ), alterando modificações proteicas pós-traducionais. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade dos nitróxidos 4-9((-acridinecarbonil)-amino)-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (Ac-Tempo) e 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (Tempo) de interagir e indisponibilizar  $RS^{\cdot}$ , especialmente glutationila ( $GS^{\cdot}$ ), modulando a produção de ERO/ERN por neutrófilos inflamatórios isolados da cavidade peritoneal. O “burst” respiratório de neutrófilos estimulados com forbol 12-miristato 13- acetato (PMA) foi monitorado através de técnicas espectrofotométricas e a capacidade de interação entre  $RS^{\cdot}$  e nitróxidos foi analisada através de ensaios de Ressonância Paraeletromagnética (EPR) e Espectrometria de Fluorescência. Para confirmar a produção de  $RS^{\cdot}$  durante a ativação do complexo Nox2, utilizou-se o agente captador de spin, 5,5-dimetilpirrolina-N-óxido (DMPO) e o sinal de EPR característico do aduto DMPO/ $GS^{\cdot}$  foi monitorado. Verificou-se um aumento da resposta de fluorescência, acompanhado pela redução do sinal de EPR do nitróxido em células estimuladas com PMA. Com a finalidade de verificar alterações proteicas pós-traducionais de *S*-glutathionilação os grupos experimentais foram submetidos à técnica de “dot blotting” e o tratamento celular com o nitróxido Tempo 100  $\mu$ M determinou uma diminuição do processo de *S*-glutathionilação proteica associado à atividade do complexo Nox2. Os resultados apontam os nitróxidos como protótipos de antioxidantes e antiinflamatórios.

Palavras-chave: Inflamação. Neutrófilos. “Burst” respiratório. Radical tiila. Nitróxido.

## ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS), produced in neutrophils, through the Nox2 complex are directly associated with the deleterious actions that arise when inflammation escapes from the control of organic homeostasis. An exacerbated production of these species is controlled by endogenous antioxidants such as glutathione (GSH), an important tripeptide able to repair oxidized biomolecules involved in cell signaling and to act as a scavenger of bioradicals. The nitroxides are synthetic and stable free radicals which have been frequently reported because of their anti-inflammatory and antioxidant properties. Recently, it was shown that these compounds can modulate neutrophil respiratory burst, reducing the production of superoxide anion generated by the Nox2 complex in a mechanism where they act as scavenger of thiyl radicals (RS<sup>•</sup>), altering post-translational modification of proteins. The aim of this work was to evaluate the ability of nitroxides 2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl (TEMPO) and 4-(9-acridinecarbonylamino)-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (Ac-Tempo) to interact with thiyl radicals, especially glutathionyl (GS<sup>•</sup>), minimizing the production of reactive oxygen and nitrogen species by inflammatory neutrophils isolated from the peritoneal cavity of mice. The respiratory burst in neutrophils stimulated by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) was monitored spectrophotometrically and the interaction between thiyl radicals and nitroxides was analyzed by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) and Fluorescence Spectroscopy. To confirm the production of RS<sup>•</sup> during the activation of the Nox2 complex, the spin trap for GS<sup>•</sup>, 5,5-dimethylpyrroline-N-oxide (DMPO) was used and the characteristic DMPO/GS<sup>•</sup> adduct EPR signal was monitored. An increase in the fluorescence response was observed, accompanied by a reduction of EPR signal of nitroxide in cells stimulated with PMA. Post-translational events such as *S*-glutathionylation were analyzed through dot blotting and the experimental groups treated with Tempo (100 μM) showed a decrease in the process of *S*-glutathionylation associated with the activity of the Nox2 complex. These results suggest that thiyl radicals play a role in the maintenance of the neutrophil respiratory burst and may provide a therapeutic target for inflammation management.

Keywords: Inflammation. Neutrophils. Respiratory burst. Thiyl radical. Nitroxides.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>07</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>09</b>
2.1 O processo inflamatório	09
2.2 Sistemas bioquímicos de produção ERO/ERN e seus impactos sobre o organismo	
12	
2.3 O complexo Nox2	14
2.4 ERO/ERN como sinalizadores celulares	20
2.5 Nitróxidos Cíclicos	22
2.5.1 Metabolismo dos nitróxidos	24
2.5.2 Atividade antioxidante e protetora dos nitróxidos	25
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>28</b>
4.1 Isolamento de neutrófilos peritoneais	
28	
4.2 Viabilidade celular	29
4.3 Determinação da concentração protéica total	30
4.4. Efeito dos nitróxidos Tempo e Ac-Tempo sobre a atividade do complexo Nox2	30
4.5 Verificação da produção de radicais tiila por neutrófilos	
30	
4.6 Determinação da concentração de GSH intracelular	32
4.7 Determinação de <i>S</i> -glutathionilação protéica	33
4.8 Análises estatísticas	34
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>35</b>
5.1 População neutrofilica isolada de foco inflamatório agudo de lavado peritoneal	35
5.2 Viabilidade celular de neutrófilos inflamatórios tratados com Tempo e Ac-Tempo	35
5.3 Efeito dos nitróxidos Tempo e Ac-Tempo sobre a atividade do complexo Nox2	36
5.4 Verificação da produção de radicais tiila por neutrófilos durante a ativação do complexo	
Nox2	38
5.5 Determinação da concentração celular de GSH	43
5.6 Determinação da <i>S</i> -glutathionilação proteica em neutrófilos	
45	



<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>48</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>59</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas décadas, uma série de pesquisas científicas envolvendo processos moleculares e bioquímicos foram realizadas visando uma melhor compreensão da etiologia e patogênese do estresse oxidativo celular, compreendido como um conjunto de condições intra e extracelulares que leva à produção exacerbada de ERO/ERN causando um desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes (SIES, 1993; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A oxidação é parte fundamental da vida e do metabolismo aeróbico sendo assim, as ERO/ERN são produzidas naturalmente pelo organismo. Estas espécies oxidantes, quando radicalares, são chamadas de radicais livres, caracterizando-se por apresentar um elétron desemparelhado (BARREIROS et al., 2006). No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intra e intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, por se tratar de compostos altamente instáveis e reativos, seu excesso, decorrente de uma disfunção biológica, desencadeia uma série de efeitos deletérios e prejudiciais ao organismo, tais como lipoperoxidação e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA. Dessa forma, encontram-se relacionados com várias patologias, tais como artrite, isquemia-reperfusão, doenças cardíacas, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou fator agravante do quadro geral dessas patologias (SIES, 1993; BARREIROS et al., 2006).

A elucidação do envolvimento de componentes inflamatórios como evento chave do processo de desencadeamento do estresse oxidativo consagrou a relevância terapêutica de fármacos antiinflamatórios no controle da resposta a danos oxidativos. Dessa forma, a busca pela descoberta de novos candidatos a protótipos de fármacos antiinflamatórios tornou-se um desafio para um grande número de pesquisadores, uma vez que estudos nesta área implicam em compreensão de respostas celulares no nível molecular, planejamento e execução de experimentos sob estrito controle.

Recentemente uma nova classe de compostos químicos sintéticos, os nitróxidos, têm se destacado e proporcionado uma melhor abordagem para estudos que envolvem processos oxidativos, devido ao fato de possuírem um considerável potencial terapêutico, antiinflamatório, antioxidante e radioprotetor comprovados em diversos estudos biológicos e químicos já realizados (AUGUSTO, 2008).

A regulação de vias bioquímicas específicas, associadas ao processo inflamatório, foi alvo deste trabalho, especialmente vias que desencadeiam a produção de espécies oxidantes e que modulam a resposta de neutrófilos. Neste trabalho, a resposta oxidativa de fagócitos inflamatórios, previamente tratados com nitróxidos, foi testada, visando estudar a hipótese de que compostos desta classe química atuem como agentes moduladores da resposta inflamatória.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O processo inflamatório

A participação de células no processo inflamatório começou a ser destacada na segunda metade do século XIX, dentre outros, por Virchow, Arnold e Metchnikoff (citado por BECHARA, 1976), os quais descreveram o papel de células inflamatórias locais e migratórias, bem como o fenômeno da fagocitose. Descobertas recentes vieram enriquecer o conhecimento sobre as células participantes da inflamação, tais como o envolvimento de mediadores químicos como as interleucinas e prostaglandinas, que exercem um papel importante na fisiopatologia da inflamação (MOVAT, 1985).

Inflamação, na definição clássica é a resposta vascular e celular dos tecidos vivos frente a uma agressão, sendo caracterizada pela saída de células e líquidos do sangue para o interstício. Essa agressão pode resultar em alterações passivas e químicas nas células ou tecidos agredidos, os quais desencadeiam o processo inflamatório (THOMSON, 1983). Segundo Nathan, (2002), a inflamação pode ser definida como a interação complexa de fatores e sinais celulares e teciduais em resposta a agressões traumáticas, infecciosas, isquêmicas, tóxicas ou autoimunes. Os sinais cardinais clássicos 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 sua funcionalidade (BRASILEIRO FILHO, 2000; COTRAN, 2006).

A capacidade do organismo de desencadear uma resposta inflamatória é fundamental à sobrevivência, embora em algumas situações e doenças, esta resposta possa ser exagerada e persistente, sem qualquer benefício aparente (CARVALHO; SILVA, 2004). O processo inflamatório pode ser classificado como uma resposta celular e humoral de magnitude variável, com repercussões meramente locais, ou sistêmicas, cujo disparo é produtor de uma cascata de eventos que envolvem complementos, cininas, fibrinolíticos e coagulantes estimulados, paralelamente à ativação de fagócitos (SANTOS JÚNIOR, 2003).

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. 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 (OHSHIMA et al, 2005).

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; COTRAN, 2006).

A resposta inflamatória atinge seu pico dentro de 3 a 5 dias após o estímulo, e cessa dentro de 7 ou 10 dias, mas se o estímulo inicial for intenso ou persistente, a resposta do organismo pode ser ampliada, com descontrole do sistema de interação e integração, caracterizando uma reação inflamatória sistêmica generalizada (SANTOS JÚNIOR, 2003).

O processo inflamatório divide-se em padrões agudo e crônico, dependendo da persistência da lesão, dos sintomas clínicos e da natureza da resposta existente.

As características mais importantes da inflamação aguda incluem: acúmulo de líquidos e componentes do plasma no tecido afetado, estimulação intravascular de plaquetas e a migração de leucócitos polimorfonucleares (PMN – principalmente neutrófilos) do espaço intraluminal até o tecido extravascular. Por outro lado, os componentes celulares característicos da inflamação crônica são os linfócitos, plasmócitos e macrófagos. A resposta inflamatória crônica é prolongada, com persistência de células inflamatórias e dano tissular frequentemente resultando em reparo aberrante (RUBIN et al., 2006).

A inflamação aguda tem como objetivo a regeneração da arquitetura normal do tecido, com retorno da função fisiológica, podendo evoluir para um estágio crônico, com conseqüente

formação de tecido fibrótico para substituir o que não pode ser reparado. O processo agudo instalá-se com o início da resposta em virtude da lesão direta ou da estimulação de componentes estruturais ou celulares do sítio de injúria. (BRASILEIRO FILHO, 2004; RUBIN et al., 2006).

Na maioria dos casos as primeiras células a deixar os vasos são os PMN. Por isso mesmo, eles constituem as células predominantes no exsudato nas primeiras 24 horas após o início do processo. Os monócitos começam a sair dos vasos 18 a 24 horas depois de iniciada a exsudação, mas a partir daí se acumulam rapidamente, passando a constituir as células dominantes após 24 horas. Os PMN têm vida média muito curta após a exsudação (oito horas em média), ao passo que os macrófagos, originados dos monócitos, sobrevivem por maior intervalo de tempo. Essa é uma das razões pelas quais nas inflamações agudas, em geral predominam PMN, enquanto nas crônicas os leucócitos mais numerosos são aqueles derivados de mononucleares, linfócitos e plasmócitos (BRASILEIRO FILHO, 2004).

Os neutrófilos medem 10-20  $\mu\text{m}$  de diâmetro e têm núcleo segmentado, com três a cinco lóbulos. No citoplasma, estes exibem dois tipos principais de grânulos (cerca de 600 por célula). Os azurófilos (ou primários), que representam 10-20% do total, são lisossomos verdadeiros e contêm mieloperoxidase, catepsina G, elastase, collagenase, muramidase, várias proteínas catiônicas microbicidas, defensinas, além de hidrolases existentes nos lisossomos das demais células. O segundo tipo, os grânulos específicos (ou secundários), contém lisozima, lactoferrina, ativador de plasminogênio, histaminase e fosfatase alcalina (BRASILEIRO FILHO, 2004; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Estas substâncias contidas nos grânulos são responsáveis pelo metabolismo oxidativo destas células. Ambos os tipos de grânulos podem esvaziar-se em vacúolos fagocíticos que se formam em torno do material engolfado, ou seu conteúdo é liberado após a morte celular. (COTRAN et al., 2006). Esses grânulos não se coram fortemente nem com corante básico nem com corante ácido (hematoxilina e eosina, respectivamente), o que distingue os grânulos dos neutrófilos daqueles de basófilos e eosinófilos.

Em humanos, os neutrófilos constituem a população mais abundante de células sanguíneas brancas circulantes e são produzidos na medula óssea onde se originam de uma linhagem comum à dos fagócitos mononucleares. Um ser humano adulto produz mais de  $1 \times 10^{11}$  neutrófilos/dia, os quais podem migrar para locais de infecção ou lesão poucas horas após a entrada de microrganismos ou o contato com o agente agressor. No entanto, caso não sejam recrutados, sofrem morte celular programada e são normalmente fagocitados por macrófagos residentes no fígado ou baço (BRASILEIRO FILHO, 2004; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Muitas células inflamatórias, incluindo monócitos, macrófagos tissulares, células dendríticas e neutrófilos possuem a capacidade de reconhecer, internalizar e digerir materiais estranhos, como microorganismos ou fragmentos celulares através de um processo conhecido como fagocitose (RUBIN et al., 2006).

A seqüência de eventos na qual estas células fagocitárias reconhecem e eliminam estes agentes estranhos ao organismo é bem conhecida, tendo sido reportada pela primeira vez nos anos finais de 1800 por um cientista russo, Ellie Metchnikoff (METCHNIKOFF, 1883, citado por 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.

Vários estímulos atuam cooperativamente para ativar os fagócitos e seus mecanismos destrutivos durante a fagocitose, em um processo subsequente a ativação de receptores semelhantes ao Toll (TLR), acoplados à proteína G, específicos para região Fc de anticorpos, ou porções C3 e 5a do complemento, ou ainda, pela estimulação direta de componentes celulares por substâncias como os ésteres de forbol. Em decorrência dessas interações, dois tipos de mecanismos comuns a todos os fagócitos podem ser ativados simultaneamente. Os não oxidativos que estão associados à fusão de lisossomos aos vacúolos fagocíticos e os oxidativos que se caracterizam pela produção de espécies reativas oxidantes, dentre elas as derivadas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), no interior dos fagolisossomos, através da ativação de um sistema enzimático denominado Nox2 (GROEMPING et al., 2003; BRASILEIRO FILHO, 2004; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

## **2.2 Sistemas bioquímicos de produção ERO/ERN e seus impactos sobre o organismo**

A existência de espécies químicas na forma de radicais livres foi primeiramente descrita no ano de 1900, quando a decomposição de hexa-feniletano em dois radicais tri-fenilmetil foi demonstrada. Entretanto, reações envolvendo radicais livres no meio biológico foram consideradas de importância após 1940, com a introdução de técnicas que permitiam a detecção destes e os estudos da cinética das reações envolvendo espécies químicas de meia-vida curta. Cita-se, como exemplo, a ressonância paraeletromagnética (EPR) e a radiólise de pulso (BERGENDI et al., 1999).

As células geram energia através da redução do oxigênio molecular em água. Durante esse processo, pequenas quantidades de formas de oxigênio reativas parcialmente reduzidas são produzidas como um subproduto inevitável da respiração mitocondrial. Algumas dessas formas são radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio sendo denominadas respectivamente, (ERO/ERN). Estes podem danificar lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (COTRAN et al., 2006; BARREIROS et al., 2006).

Como a oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo, essencialmente todas as células aeróbicas produzem, naturalmente, ou por alguma disfunção biológica, quantidades significantes de ERO, sendo essa uma condição fisiológica associada a esse tipo de vida (GRISHAM, 2004; BARREIROS et al., 2006).

Os ERO/ERN promovem reações com substratos biológicos podendo ocasionar danos às biomoléculas e, conseqüentemente, afetar a saúde humana. Os danos mais graves são aqueles causados ao DNA, envolvendo clivagem da ligação fosfodiéster, alteração de ribose e oxidação de bases. O acúmulo de lesões no DNA tem conseqüências para a célula, relacionadas à mutagênese e carcinogênese. Uma enzima que tenha seus aminoácidos alterados pode perder ou alterar sua atividade. Ocorrendo na membrana celular, a oxidação de lipídios interfere no transporte ativo e passivo normal através da membrana, ou ocasiona a ruptura dessa, levando à morte celular. A oxidação de lipídios no sangue agride as paredes das artérias e veias, facilitando o acúmulo desses lipídios, com conseqüente aterosclerose, podendo causar trombose, infarto ou acidente vascular cerebral (RIBEIRO, et al., 2005; SIES, 1999; MOREL et al., 2001; NIE et al., 2001).

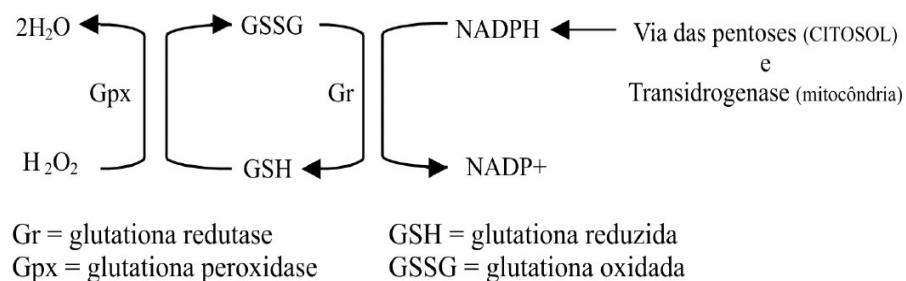
A presença dessas espécies pode ser observada em vias metabólicas como a da cadeia respiratória mitocondrial, do catabolismo de purinas para a formação de ácido úrico, do sistema NADPH citocromo p-450 redutase microsossomal, da síntese de prostaglandinas e isoprostanos, e de especial interesse nessa revisão, no sistema NADPH oxidase, também conhecido como NOX (RIBEIRO et al., 2005).

O organismo apresenta uma série de mecanismos endógenos e exógenos capazes de manter a concentração de ERO dentro de limites fisiológicos, os quais, quando ultrapassados seja por uma disfunção biológica ou por atuação de agentes externos, geram uma condição celular oxidativa associada a diversas patologias como, doenças inflamatórias, vasculares, neurodegenerativas, de origem auto-imune, câncer e acidentes que envolvam isquemia e reperfusão. (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BIANCHI; ANTUNES, 1999; KOJDA; HARRISON, 1999; RIBEIRO et al., 2005; COTRAN et al., 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).



Um dos mecanismos endógenos de controle da concentração de ERO seria a ação de enzimas envolvidas na proteção antioxidante primária do organismo humano, entre elas, cita-se a superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (Se-Gpx), glutathiona redutase (Gr), glutathiona S-transferases (GST), catalase, tiorredoxina redutase (Txr) e as enzimas que catalisam reações geradoras de equivalentes redutores nos compartimentos citosólico e mitocondrial: glicose 6-fosfato desidrogenase, 6-fosfogluconolactona e transidrogenases. Através destas o organismo mantém a concentração de ERO dentro dos limites fisiológicos e através do sistema tiorredoxina regula o nível de alvos moleculares oxidados (RIBEIRO et al., 2005).

GSH é um tripeptídeo, ( $\gamma$ Glu-Cys-Gli) formado por L-ácido glutâmico, L-cisteína e L-glicina e constitui o tiol redutor mais abundante no meio intracelular (SIES, 1999). A manutenção de níveis adequados de GSH é feita às custas da atividade da glutathiona redutase, a qual utiliza equivalentes redutores do NADPH para manter glutathiona na forma reduzida, como substrato para glutathiona peroxidase (Figura 1). Assim, a atuação eficiente de Se-Gpx exige um sistema enzimático seqüencial que envolve a glutathiona redutase e as enzimas que mantêm níveis de NADPH, nos compartimentos citosólicos e mitocondrial (REMACLE et al., 1992).



**Figura 1: Vias enzimáticas de manutenção da glutathiona na forma reduzida.** Adaptado de Remacle et al., 1992.

### 2.3 O complexo Nox2

Em 1935 foi sugerido pela primeira vez que produtos oxigenados estariam envolvidos na capacidade de fagócitos polimorfonucleares (neutrófilos) e mononucleares (monócitos e macrófagos) de exercerem um papel importante na defesa do organismo contra patógenos,

através de um mecanismo denominado de fagocitose (BALDRIDGE; GERARD, 1935 citado por BABIOR, 2000). Trabalhos recentes comprovam que a capacidade de fagocitose dos fagócitos ocorre com um aumento abrupto do consumo de oxigênio, acompanhado por alterações no metabolismo do oxigênio e ativação da via das pentoses-fosfato (BABIOR, 2000).

Na inflamação, a produção de ERO inicia-se quando o fagócito recebe estímulos para o englobamento, originando uma série de alterações metabólicas coordenadas, as quais geram um aumento abrupto do consumo de oxigênio, aproximadamente 30 segundos após a estimulação. A ativação do processo de fagocitose estimula no PMN o evento referido na literatura como “burst” oxidativo ou respiratório, o qual é caracterizado pelo aumento do consumo de oxigênio, aumento da glicólise anaeróbica e geração de radicais livres, derivados do oxigênio (BABIOR, 2004; SEGAL, 2008).

O metabolismo oxidativo dos neutrófilos é mediado por um complexo enzimático, associado à sua membrana citoplasmática e à membrana dos grânulos específicos, chamado NADPH (nicotinamida, adenina, dinucleotídeo reduzido) oxidase ou Nox2. Em células não estimuladas o sistema Nox2, está dormente e dissociado, com componentes presentes tanto no citosol quanto na membrana de grânulos secretórios, podendo ser rapidamente ativado quando os fagócitos são expostos a estímulos adequados. A ativação do “burst” respiratório envolve profundas mudanças de localização e atividades de diferentes componentes deste complexo enzimático (BABIOR, 2004).

Entretanto, o “burst” respiratório ou oxidativo, não utiliza o  $O_2$  para a síntese de ATP, através da respiração mitocondrial. O oxigênio consumido é transformado em metabólitos muito reativos, como o  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  e uma grande variedade de radicais livres que, por apresentar grande reatividade com macromoléculas, são potencialmente capazes de desencadear efeitos lesivos (BABIOR, 1973; BABIOR, 1984; BRASILEIRO FILHO, 2004).

Dentre a vasta gama de ERO/ERN, produzidos neste processo, a primeira espécie reativa a ser formada é o  $O_2^{\bullet-}$ , gerado por uma reação entre o oxigênio extracelular e o NADPH, que resulta da atividade catalítica do complexo enzimático Nox2. 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 (MOREL et al., 1991; BABIOR, 1992). O “burst” respiratório ocorre conforme a estequiometria da reação abaixo:



A família das NOX oxidases pode ser dividida em 7 isoformas, Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, DUOX1 e DUOX2, que diferem bioquimicamente em relação à regulação e expressão da atividade enzimática. As isoformas Nox1 e Nox4 estão associadas com a produção de  $\text{O}_2^{\bullet}$  em células musculares lisas e diretamente relacionadas com processos inflamatórios vasculares (CSÁNYI, C. et al., 2009).

A isoforma Nox2 de fagócitos possui componentes presentes no citossol (p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>) e outros localizados em membranas de vesículas secretórias (gp91<sup>phox</sup> e p22<sup>phox</sup>) (BABIOR, 1999). O primeiro componente descrito como associado à membrana foi o citocromo b<sub>245</sub>, na década de 60. Posteriormente, suas subunidades foram identificadas como duas proteínas, gp91<sup>phox</sup> e p22<sup>phox</sup>, que, juntas, formam a heme proteína redenominada citocromo b<sub>558</sub>, que apresenta um baixo potencial de redução (-245 mV). A proteína gp91<sup>phox</sup> 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<sub>558</sub>, a proteína não glicosilada p22<sup>phox</sup>, apresenta apenas um domínio hidrofóbico que constitui sua região transmembrana. O citocromo b<sub>558</sub>, 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<sup>phox</sup> e p22<sup>phox</sup>, posição não usual para proteínas desta classe, e outro ligado às histidinas 94 e 116 da p22<sup>phox</sup>, posição semelhante àquelas ocorrentes em outras heme proteínas como mioglobina e citocromo b<sub>5</sub>. 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, ou ao fagossoma (JESIAITIS et al., 1991; ROTROSEN et al., 1992; KOBAYASHI et al., 1998).

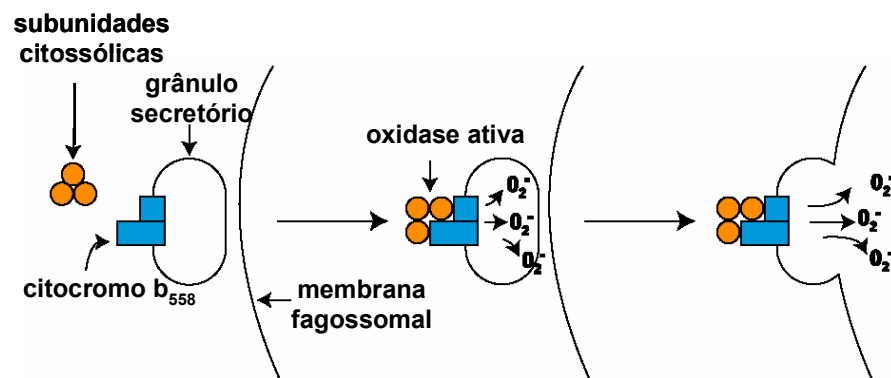
Entre os componentes citossólicos do Nox2, um grupo de fosfoproteínas de migração relativa entre 45-49 kDa foram identificadas. Estas proteínas foram extensamente estudadas, e hoje são designadas p47<sup>phox</sup>, são mostradas como oito isoformas de fosfoproteínas com pI na faixa de 6,8 a 10, com um único precursor não fosforilado que pode ser detectado por “immunoblotting”. Encontrada exclusivamente no citossol em fagócitos não estimulados, a p47<sup>phox</sup> fosforilada é parcialmente transferida para a membrana quando as células recebem diferentes estímulos que determinam a produção de  $\text{O}_2^{\bullet}$  (LOMAX et al., 1989; VOLPP et al., 1989).

Um segundo componente citossólico desta oxidase, denominado p67<sup>phox</sup>, 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 do Nox2, ligando-se a p47<sup>phox</sup> através de sua região carboxiterminal (BABIOR, 1992; VAN BRUGGEN et al., 2003; BABIOR, 2004).

Mais recentemente, a investigação da função da proteína citossólica p40<sup>phox</sup> no complexo Nox2 apontou-a como um regulador da atividade do complexo enzimático, paralelamente à fosforilação do resíduo 154 de treonina pela proteína quinase C (PKC) (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 Nox2. Estas se associam à membrana, e, paralelamente à proteína Rap 1A, regulam a polimerização da actina (SEGAL et al., 2000). A função da Rac 2 na ativação do complexo Nox2 é dependente da translocação das frações p47<sup>phox</sup> e p67<sup>phox</sup>, 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<sup>phox</sup> (TSUNAWAKI et al., 1994; MATUTE et al., 2005).

A importância deste complexo pode ser notada na 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 Nox2, e não enzimas degranuladas, como mieloperoxidase (MPO), tem o papel central na defesa das células em condições de linfopenia contra infecções espontâneas (OSTANIN et al., 2007).

A Figura 2 ilustra a ativação do complexo Nox2, destacando-se a liberação do O<sub>2</sub><sup>•</sup> no fagossoma.

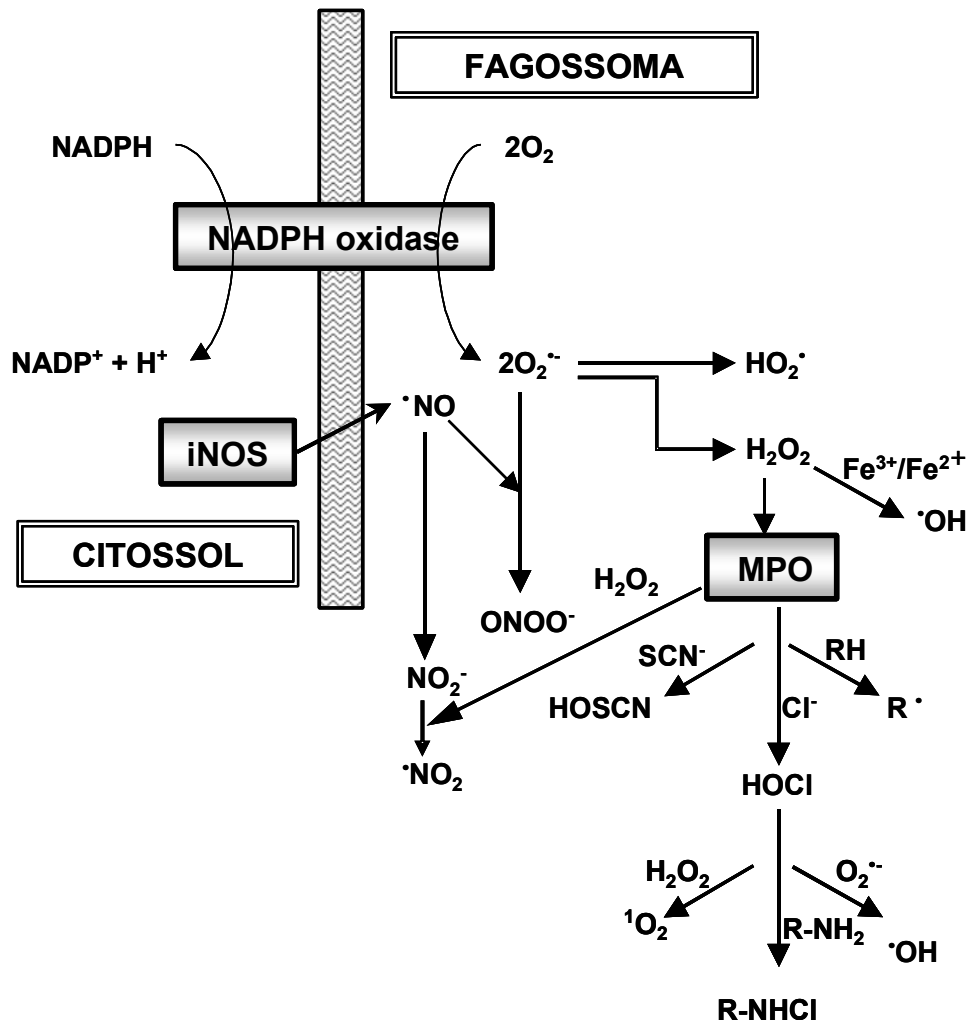


**Figura 2: Ativação do complexo Nox2.** Adaptado de BABIOR, 2000.

Embora sejam altamente reativas, com potencialidade deletéria ao organismo, as ERO/ERN quando produzidas em pequena quantidade, são toleradas e encontram-se envolvidas em inúmeros processos de sinalização que regulam o crescimento, diferenciação, proliferação e morte celular. Assim, o equilíbrio entre a formação e remoção destas espécies reativas no organismo, deve ser regulado de forma que as reações e processos metabólicos dependentes das mesmas possam ocorrer em um nível adequado para a manutenção da fisiologia das células (SIES, 1986; CADENAS, 1989; DI MASCIO et al., 1995; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

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, por exemplo, o  $H_2O_2$  e  $HO^{\bullet}$ . 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- $\kappa$ 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  $\text{HO}^\bullet$  e  $^1\text{O}_2$  (HAMPTON et al., 1998, HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007) (Figura 3).



**Figura 3. Produção de ERO/ERN por fagócitos.** Ressaltam-se os doadores citossólicos de elétrons para o sistema Nox2 que produz  $\text{O}_2^{\bullet-}$  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 Nox2 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).

Vias bioquímicas diferentes são ativadas na produção de  $O_2^{\bullet-}$  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 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 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<sup>phox</sup> é, *in vitro*, substrato para PKC, e que a fosforilação nos seus diferentes resíduos de serina inicia a ativação do complexo Nox2 (BABIOR, 2000; SEGAL, 2008).

## 2.4 ERO/ERN como sinalizadores celulares

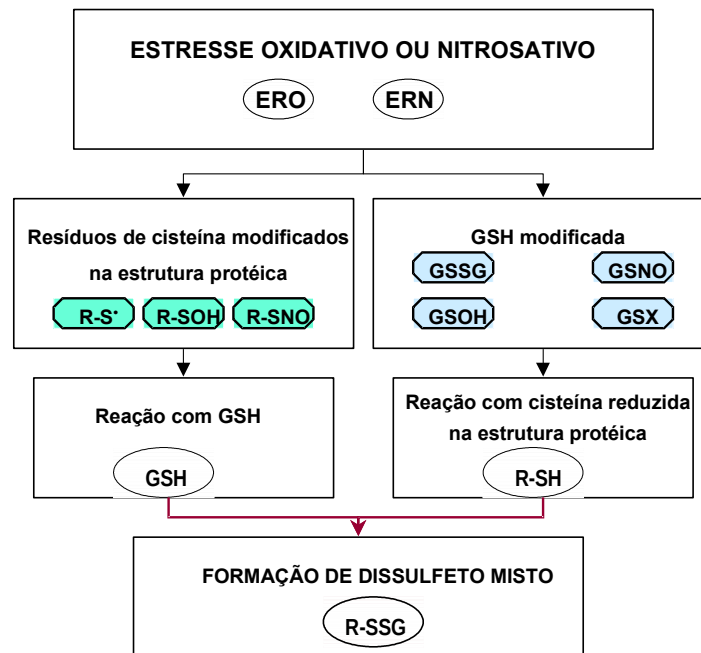
A habilidade das células de comunicarem entre si e responder a um ambiente bioquímico específico constitui o mecanismo biológico designado transdução de sinal. Inicialmente, as vias de transdução de sinal eram descritas como sendo lineares e compostas de poucos componentes: geralmente um receptor, um segundo mensageiro e um efetor, responsável pela fosforilação de um grupo restrito de substratos. Porém, estudos posteriores revelaram vias de sinalização extremamente complexas, com inúmeros pontos de integração química composta de concentrações variadas de uma grande quantidade de sinais (BHALLA; YENGAR, 1999).

Diversos autores apontam para o fato de que algumas moléculas oxidantes funcionam como sinalizadores celulares, dentre as quais existem aquelas suscetíveis a sofrer modificações de acordo com o estado redox da célula. 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, ésteres de 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).

Existem evidências de que modificações pós-traducionais induzidas pelo estado redox da célula podem alterar a fosforilação de diversas proteínas e enzimas. Uma dessas modificações seria a formação de dissulfetos mistos proteicos, em um procedimento denominado *S*-tiolação proteica, que ocorre através de ligação de compostos tiólicos a resíduos de cisteína na estrutura de uma proteína. Dentre os tióis celulares que se destacam nessa função está a GSH, que funciona como um potente agente nucleófilo e redutor, sendo o composto sulfidrílico mais abundante na célula, quando então esse processo é denominado *S*-glutathionilação proteica (SIES, 1999; KLATT ; LAMAS, 2000; ROVER JUNIOR et al., 2001; CRUZ et al., 2007).

Dois mecanismos bioquímicos através dos quais a GSH liga-se a um resíduo de L-cisteína, em resposta aos estresses oxidativo ou nitrosativo, têm sido apontados. A adição covalente de GSH a um resíduo de L-cisteína poderia ocorrer após modificação prévia desse aminoácido na estrutura proteica por ERO/ERN, com formação de um radical tiila proteico (R-S $\cdot$ ), de ácido sulfênico (R-SOH) ou de S-nitrosol (R-SNO). De forma inversa, a modificação química por oxidação ou nitração de GSH, que tornaria esse peptídeo mais reativo pela formação de glutathiona oxidada (GSSG), S-nitrosoglutathiona (GSNO), sulfenato de glutathiona (GSOH), ou outro intermediário reativo que pode ser formado pela quebra de espécies anteriores (GSX, especialmente radical glutathionila, GS $\cdot$ ), o qual propiciaria reatividade química suficiente para a formação da ligação proteína-GSH (R-SSG) (KLATT; LAMAS, 2000; POMPELLA et al., 2003). Estes dois possíveis mecanismos estão esquematizados na Figura 4.



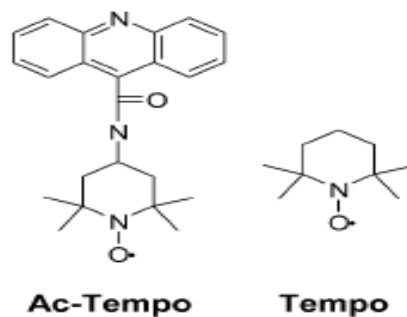


**Figura 4. Mecanismos propostos para o processo de *S*-glutationilação proteica.** Adaptado de KLATT; LAMAS, 2000.

A PKC representa uma família de mais de onze serina/treonina quinases de origem fosfolipídica, as quais estão envolvidas em inúmeras vias de regulação do crescimento e morte celular, bem como as respostas ao estresse oxidativo. Logo, existe a hipótese de que a *S*-glutationilação proteica, ao ocorrer nas isoformas da PKC, presentes em células fagocíticas, poderia alterar o estado de fosforilação de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo (GOPALAKRISHNA; JAKEN, 2000). Cruz e colaboradores (2007) mostraram que a ativação do complexo Nox2 determina *S*-glutationilação de fosfatases inativando-as, o que prolonga o estado de fosforilação de diversas proteínas envolvidas na montagem e sustentação da atividade do complexo. Esse fato fortalece a hipótese de que radicais derivados de GSH e tiol proteínas podem desempenhar um papel crucial na sinalização celular, especialmente em células fagocitárias que produzem grandes quantidades de ERO/ERN. Estudos detectaram a ocorrência de *S*-glutationilação proteica como um processo pós-traducional em macrófagos inflamatórios. Resultados prévios demonstram que o tratamento de PMN com um composto alquilante, a lactona licnofolido, que forma aduto com GSH, indisponibiliza esse tripeptídeo para o processamento pós-traducional, sem, no entanto gerar acúmulo da forma oxidada GSSG (BRIGAGÃO et al., 2004). Além disso, existem indícios que a *S*-glutationilação ocorra em



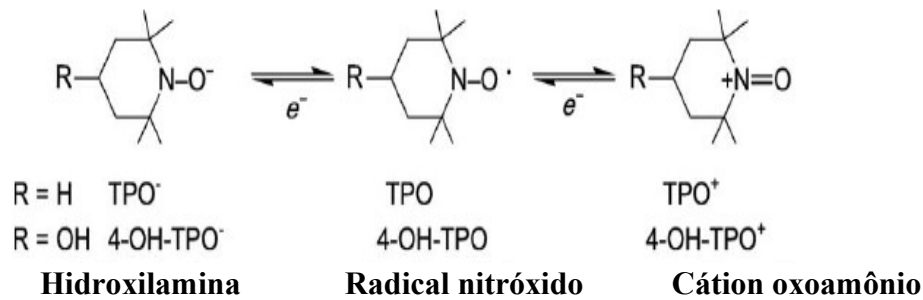
Os diferentes tipos de anéis e substituintes produzem diferentes nitróxidos com propriedades físico-químicas distintas (KROLL et al., 1999). Por apresentarem estabilidade química e propriedades paramagnéticas permanentes, os nitróxidos são empregados como sondas em estudos envolvendo Ressonância Paraeletromagnética (EPR) e são usados como agentes de contraste para imagem de ressonância magnética (MRI) (SOULE et al., 2007). Estudos apontam os primeiros usos dos nitróxidos como sondas biofísicas e marcadores para estudos de membranas e proteínas (FEDELI et al., 2003). A Figura 6 ilustra a estrutura química dos dois nitróxidos usados neste trabalho.



**Figura 6: Estruturas químicas de nitróxidos.** Ac-Tempo e Tempo constituem exemplos de estruturas com anéis de seis membros (piperidina). Adaptado de: BORISENKO et al., 2004.

### 2.5.1 Metabolismo dos nitróxidos

Através de processos metabólicos celulares ou reações não enzimáticas, nitróxidos são metabolizados produzindo hidroxilaminas ou cátion oxoamônio (Figura 7). A atividade antioxidante dos nitróxidos está associada com a troca de um elétron envolvendo sua forma reduzida (hidroxilamina) e oxidada (cátion oxoamônio). 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 (ISRAELI et al., 2005). 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).

### 2.5.2 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 (<sup>•</sup>OH) na reação de Fenton. Além disso, possuem atividade superóxido dismutase mimética ou SOD “like” (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 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e oxigênio. Nesta reação o nitróxido age como catalisador e não é consumido (SOULE et al., 2007).

A atividade antioxidante e protetora dos nitróxidos foi comprovada em diferentes células, sob condições de estresse oxidativo/nitrosativo diversas. Estudos recentes envolvendo o nitróxido Tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidina-1-oxila), um composto análogo do Tempo, cuja única diferença encontra-se na presença de uma hidroxila na sua estrutura química, e fibroblastos humanos apontaram que o nitróxido 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; KRISHNA et al., 1994 ).

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  $\cdot\text{OH}$ , esse composto bioquímico é degradado provocando processos fisiopatológicos como a artrite reumatóide. Nestes casos, em que  $\cdot\text{OH}$  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. Recentemente demonstrou-se que o nitróxido Ac-Tempo foi capaz de inibir o “burst” respiratório de macrófagos estimulados pela via da PKC e consequentemente a formação de radicais tiila produzidos durante a ativação do complexo Nox2 (LAIGNIER et al, 2007). O papel dos nitróxidos na inibição de enzimas marcadoras do processo inflamatório, como a mieloperoxidase (MPO) presente nos grânulos azurofilos de neutrófilos é responsável pelo desencadeamento de danos tissulares por meio da produção de ácido hipocloroso também foi mostrado recentemente (AUGUSTO, 2008).

Sabendo-se que o metabolismo oxidativo de fagócitos (neutrófilos e macrófagos) assume comportamentos diferentes e que os neutrófilos por possuírem diferentes tipos de grânulos citoplasmáticos são considerados células mais responsivas e capazes de liberar uma quantidade superior de espécies radicalares durante a ativação do “burst” respiratório, foi o proposto o estudo de vias de sinalização celular em neutrófilos tratados previamente com nitróxidos Tempo e Ac-Tempo.

### 3 OBJETIVOS

Os objetivos deste projeto foram verificar a capacidade de nitróxidos em modular o “burst” respiratório de neutrófilos inflamatórios através da inibição do complexo Nox2 e avaliar o envolvimento de radicais tiila, especialmente glutathionila, na sinalização celular durante a produção de ânion superóxido, visando determinar uma possível via bioquímica para controle da liberação de oxidantes por fagócitos inflamatórios.

Para tanto pretendeu-se especificamente:

- Caracterizar a produção de radicais tiila, especialmente glutathionila, em neutrófilos inflamatórios durante a ativação do complexo Nox2;
- Determinar se os nitróxidos atuam como “scavengers” de radicais tiila em neutrófilos inflamatórios modulando a sinalização celular;
- Verificar o efeito de nitróxidos no processo pós-traducional de *S*-glutathionilação proteica em neutrófilos inflamatórios associado à ativação do complexo Nox2.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

A fim de atingir os objetivos propostos, as seguintes etapas de trabalho foram executadas:

### 4.1. Isolamento de neutrófilos peritoneais

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

As células inflamatórias foram isoladas da cavidade peritoneal conforme metodologia descrita por Rabadji et al. (1996). A inflamação aguda 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 4 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  $4^{\circ}\text{C}$ .

O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão 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  $1\times 10^6$  células por mL em todos os experimentos, exceto quando o experimento requeria condições diferentes. As suspensões celulares receberam tratamentos diferentes, constituindo basicamente quatro grupos experimentais:

1-Grupo Controle: neutrófilos ressuspensos em PBS;

2-Grupo Estimulado: neutrófilos estimulados com PMA (100 ng, solubilizado em dimetil sulfóxido-DMSO, concentração final 0,05% v/v).



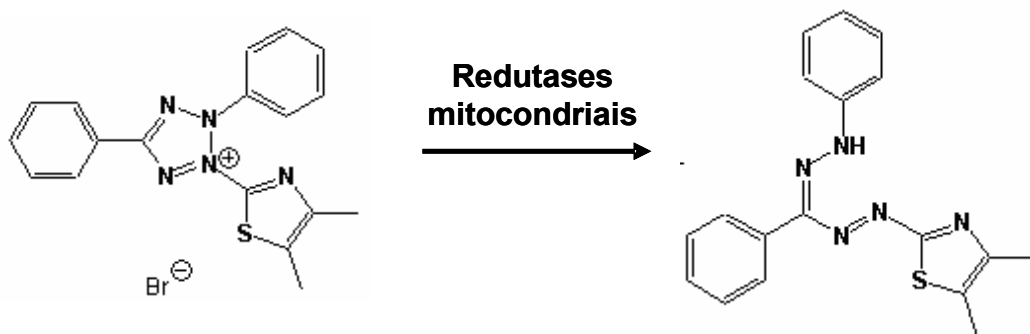
3-Grupo Nitróxido: neutrófilos incubados com Tempo e Ac-Tempo (dissolvido em metanol, em diferentes concentrações, 5 minutos, 37°C);

4-Grupo Nitróxido Estimulado: neutrófilos incubados com Tempo e Ac-Tempo (dissolvido em metanol, em diferentes concentrações, 5 minutos, 37°C) e posteriormente estimulados com PMA (100 ng, solubilizado em DMSO, concentração final 0,05% v/v, 37°C, 5 minutos).

#### 4.2. Viabilidade celular

O teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) foi o teste usado para avaliar viabilidade celular. O MTT, quando incubado com células vivas, tem seu substrato quebrado por enzimas mitocondriais, transformando-se de um composto amarelo em um composto azul escuro (formazana). A produção de formazana reflete o estado funcional da cadeia respiratória. Este método envolve a conversão do MTT (12 mM), que é hidrossolúvel, em uma formazana insolúvel, que, após solubilização com (DMSO), é determinada a densidade óptica a 540 nm, 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.**

Neutrófilos, em número definido dentro dos padrões de linearidade do método, foram incubados por 45 minutos a 37°C com diferentes concentrações dos nitróxidos em estudo, e, após centrifugação (500xg, temperatura ambiente), o sobrenadante foi descartado e ao

precipitado foram acrescentados 250  $\mu$ L de DMSO. A densidade óptica (540nm, espectrofotômetro Spectronic GENESYS 5) foi determinada e comparada com os demais grupos celulares. Experimentos controles foram feitos com incubação dos neutrófilos apenas com o veículo de dissolução dos nitróxidos e/ou do PMA.

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

### **4.3 Determinação da concentração proteica total**

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

### **4.4 Efeito dos nitróxidos Tempo e Ac-Tempo sobre a atividade do complexo Nox2**

A porcentagem de inibição do Nox2 de neutrófilos foi calculada por técnica indireta através do acompanhamento da cinética de redução do ferro III do citocromo *c* pelo ânion superóxido liberados após a estimulação das células com PMA durante 120 segundos no comprimento de onda de 550 nm. A liberação de ânion superóxido foi calculada com base na variação da densidade óptica nos primeiros 20 segundos, respeitando a lei de Beer a partir do cálculo da equação de mols de ânion superóxido liberados por minuto.

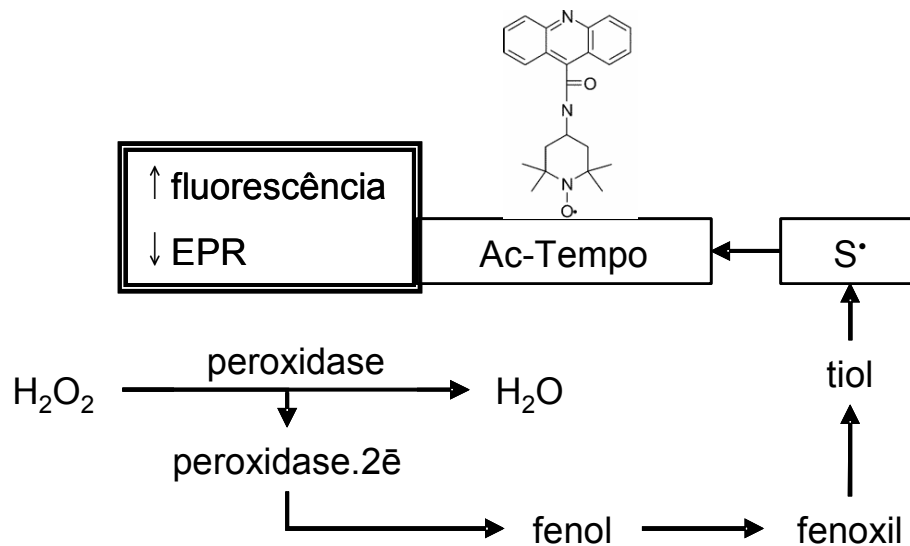
Foram testadas as seguintes concentrações de Tempo, 100, 200, 300 e 400  $\mu$ M e 10  $\mu$ M de Ac-Tempo.

### **4.5 Verificação da produção de radicais tiila por neutrófilos**

A produção de radicais tiila em neutrófilos foi monitorada utilizando-se, os nitróxidos Tempo e Ac-Tempo, sendo este último composto paramagnético, uma espécie radicalar estável, que 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, ( $\lambda_{exc}$  361 nm,  $\lambda_{em}$  440 nm)

(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 químico modelo já padronizado anteriormente composto pelos seguintes constituintes: fenol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/peroxidase/GSH, onde a peroxidase catalisa a decomposição do peróxido, em cujo ciclo catalítico é gerado um composto intermediário 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<sup>•</sup>. Os radicais tiila reagem então com Ac-Tempo, apagando o sinal de EPR e aumentando a fluorescência conforme esquematizado na Figura 9.



**Figura 9. Esquema mostrando a produção de radicais RS<sup>•</sup> através de catálise de peroxidase.**

Este sistema químico foi executado para validação da metodologia, com um composto tiólico, GSH (10μM), acrescidos de fenol (50μM), peroxidase (HRP 0,2 U/mL), o nitróxido Ac-Tempo(10μM), e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (10μM), 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 Varian Cary Eclipse). 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 200  $\mu$ L 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 seguindo as mesmas condições experimentais. A análise de fluorescência foi realizada usando-se  $\lambda_{exc}$  361 nm e  $\lambda_{emi}$  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 neutrófilos 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 PMA 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 5 minutos a 37°C com o agente alquilante *N*-etilmaleimida 50  $\mu$ M (NEM), um bloqueador de grupamentos tióis. Desta forma, foi possível diferenciar o radical glutationila dentre outros radicais tiila produzidos durante a ativação de neutrófilos, bem como realizar sua quantificação e associação à ativação do complexo Nox2.

Para confirmar a geração de RS' durante a ativação do complexo Nox2, utilizou-se o agente captador de spin DMPO 100 mM Este foi adicionado às alíquotas celulares e o tratamento foi feito por 5 minutos a 37°C. O sinal característico do aduto DMPO/GS' foi monitorado por EPR.

#### **4.6 Determinação da concentração de GSH intracelular**

Uma das maneiras mais eficientes de avaliar os danos celulares causados pelo estresse oxidativo é monitorar a concentração de GSH intracelular, que dependendo da intensidade e duração do estímulo, tende a declinar bruscamente, podendo levar a degenerações irreversíveis e até mesmo à morte celular. Com o objetivo de analisar o efeito protetor do nitróxido Tempo na manutenção da taxa de GSH, foi feita sua quantificação.

No método usado, a GSH reage com o monobromobimano (mBBr) formando um aduto fluorescente, que pode ser analisado por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

através de um detector de fluorescência. Os adutos formados entre tióis e mBBR foram separados por HPLC em coluna C-18 (Shim-pack VP-ODS, 4,6mm x 25cm, 5 $\mu$ m, conectada em série com pré-coluna C18 modelo Shim-pack GVP-ODS, 4,6mm x 10mm).

Os diferentes grupos experimentais tratados previamente com *N*-etilmaleimida (NEM), foram neutralizados por um tampão constituído de *N*-etil-morfolina (1 M, pH 8,0), NaOH (0,05 M). O agente redutor tris-2-(carboxi-etil)fosfina 0,75 mM (TCEP) foi adicionado às amostras, seguido da adição de mBrB (0,1 M). A reação de derivatização foi feita por 20 minutos sob proteção da luz, e esta foi interrompida com a adição de ácido perclórico 5,8 M. Decorrido este tempo, foi acrescentado uma solução de ácido sulfossalicílico 5% m/v (padrão interno de referência), e as amostras foram filtradas em membrana (Millipore, 0,45  $\mu$ m) (ANDERSON, et al., 1999).

A eluição foi feita com Tampão A (87% de tampão acetato e 14% de metanol) e tampão B (10% de tampão acetato e 90% de metanol). A coluna foi pré-equilibrada com 100% do Tampão A e 0% do Tampão B, em fluxo de 1ml/minuto durante 5 minutos. Após injeção de 20  $\mu$ l da amostra a eluição ocorreu em duas etapas: 75% de A e 25% de B durante os 10 minutos iniciais e 25% de A e 100% B nos próximos 20 minutos (ANDERSON, et al., 1999).

A identificação de GSH foi realizada pela comparação com o tempo de retenção de padrões autênticos (0,01-0,3  $\mu$ M) através de detector de fluorescência (modelo RF-10AXL) utilizando-se  $\lambda_{\text{ex}}=360\text{nm}$  e  $\lambda_{\text{em}}=470\text{nm}$ , e a quantificação foi feita através de análise da integral das respectivas áreas (Software "LC-Solution Multi").

#### 4.7 Determinação de *S*-glutacionilação proteica

O perfil de *S*-glutacionilação proteica foi determinado através de análise por “dot blotting” para a verificação dessa modificação pós-traducional durante a ativação do complexo Nox2 de neutrófilos, bem como o efeito do nitróxido Tempo sobre esse processo, segundo método previamente descrito (ROSSI et al., 2006).

Às alíquotas de suspensões celulares controle ou tratadas com Tempo 100  $\mu$ M, não estimuladas ou após estimulação com PMA, foram acrescentados inibidores de proteases como, PMSF 0,2mM, leupeptina 1  $\mu$ g/mL, aprotinina 2  $\mu$ g/mL, pepstatina 1  $\mu$ g/mL, benzamidina 17  $\mu$ g/mL, seguindo-se adição de NEM, 50  $\mu$ M ou ditioneitol (DTT, 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 lisadas por

sonicação, 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 (2 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-GSH, (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<sup>®</sup> 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 Análise Estatística**

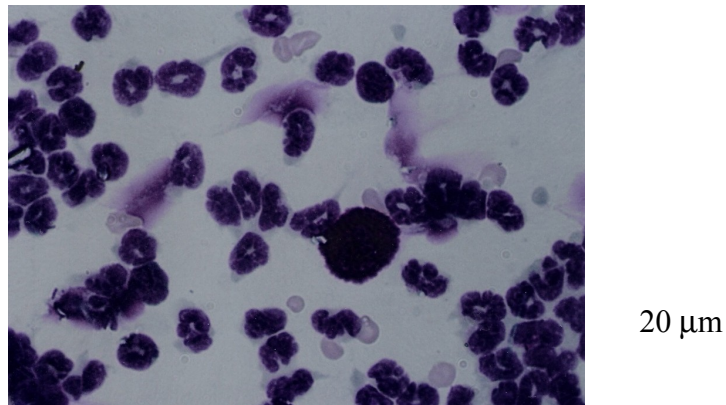
Todos os resultados foram expressos como média±dp de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata. Os resultados foram submetidos à análise estatística para testes de variância utilizando-se o teste ANOVA e o teste de Tukey para comparações múltiplas de médias (ZARR, 1996). Valores de *p* iguais 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 neutrofílica isolada de foco inflamatório agudo de lavado peritoneal

O processo inflamatório pode ser desencadeado tanto por microorganismos quanto por substâncias estranhas ao organismo como caseinato de sódio, tioglicolato e carragenina. Inicialmente o foco inflamatório é povoado predominantemente por neutrófilos, caracterizando o processo inflamatório agudo.

O processo inflamatório agudo foi induzido em camundongos pela injeção intraperitoneal de caseinato de sódio. Após 4 horas da injeção do indutor, uma população significativa de neutrófilos foi elicitada por lavagem peritoneal com PBS. As lâminas foram coradas por May-Grünwald-Giemsa e analisadas por microscopia óptica. A Figura 10 mostra um campo microscópico com predomínio de 95% de neutrófilos.



**Figura 10.** Campo microscópico mostrando a identificação de polimorfonucleares de focos inflamatórios induzidos na cavidade peritoneal de camundongos. Coloração May-Grünwald-Giemsa, 100x.

### 5.2. Viabilidade celular de neutrófilos inflamatórios tratados com Tempo e Ac-Tempo

A viabilidade celular analisada pelo método de redução do MTT que determina a funcionabilidade das desidrogenases, mostrou que o tratamento das células fagocitárias com os nitróxidos Tempo e Ac-Tempo e/ou a estimulação do complexo Nox2, nas condições testadas, não afetou a viabilidade.

Células do grupo controle e tratadas com os nitróxidos 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 dos nitróxidos e do PMA (metanol 1% e DMSO 0,05% v/v, respectivamente) não modificaram a atividade das desidrogenases mitocondriais testadas, excluindo a possibilidade de citotoxicidade destes compostos sobre os fagócitos testados.

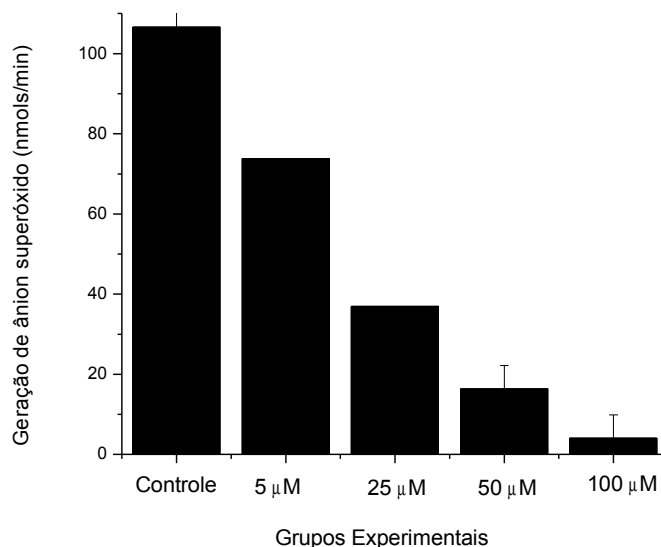
### 5.3 Efeito dos nitróxidos Tempo e Ac-Tempo sobre a atividade do complexo Nox2

Para distinguir a capacidade de inibição do complexo Nox2 da atividade SOD mimética apresentada pelos nitróxidos, o efeito destes sobre a dismutação de  $O_2^{\cdot-}$  gerados pelo sistema enzimático xantina/xantina oxidase foi avaliado e os resultados encontram-se expressos abaixo.

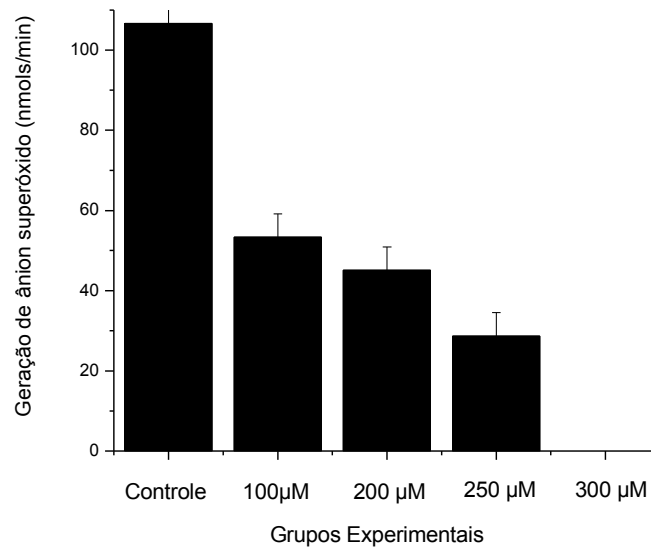
Observou-se que tanto o nitróxido Tempo, quanto Ac-Tempo apresentaram atividade SOD mimética sendo capazes de promover 100% da dismutação do  $O_2^{\cdot-}$ , detectados pela redução do ferro do citocromo *c*.

No gráfico A, pode-se observar que a dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  ocorreu de forma dose-dependente, sendo necessária uma concentração de 100  $\mu$ M do nitróxido Tempo para promover a completa dismutação desse radical. Já no gráfico B, nota-se que o efeito dose-dependente se repetiu no tratamento com Ac-Tempo, porém neste caso foi necessário uma concentração três vezes maior (300  $\mu$ M) deste composto para promover a completa dismutação.

**A**





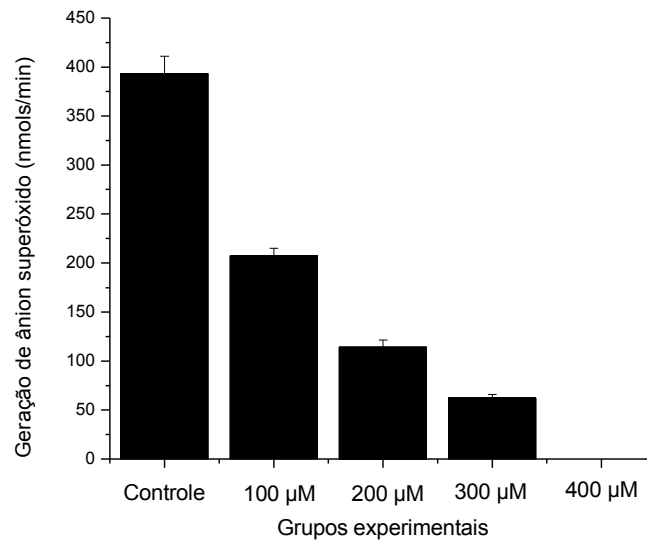
**B**

**Figura 11. Efeito do tratamento com os nitróxidos Tempo (A) e Ac-Tempo (B) sobre a geração de ânion superóxido gerados pelo sistema xantina/xantina oxidase.** O nitróxido Tempo (gráfico A) nas seguintes concentrações 5, 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$  promoveu uma inibição de respectivamente 31; 65; 85; 99% da atividade enzimática. Já o Ac-Tempo (gráfico B), nas concentrações de 100, 200, 250 300  $\mu\text{M}$ , inibiu respectivamente 50; 59; 73 e 100% da atividade enzimática.

A geração de espécies radicalares em neutrófilos inflamatórios ocorreu frente ao estímulo com PMA e a capacidade de inibição do complexo Nox2 pelo nitróxido Tempo foi analisada. As concentrações do composto utilizadas foram 100, 200, 300 e 400  $\mu\text{M}$ .

O tratamento com Tempo nas diferentes concentrações proporcionou uma inibição no complexo Nox2 e conseqüentemente, uma diminuição da produção de espécies radicalares de maneira dose-dependente, sendo necessária uma concentração de 400  $\mu\text{M}$  para promover a completa inibição do complexo Nox2.

As concentrações de 100, 200 e 300  $\mu\text{M}$  proporcionaram uma inibição da geração de espécies radicalares em torno de 47; 71 e 84%, respectivamente, comparadas com o controle que corresponde ao grupo experimental composto por células estimuladas com PMA, representando 100% de liberação dessas espécies. Estes resultados podem ser observados na Figura 12.

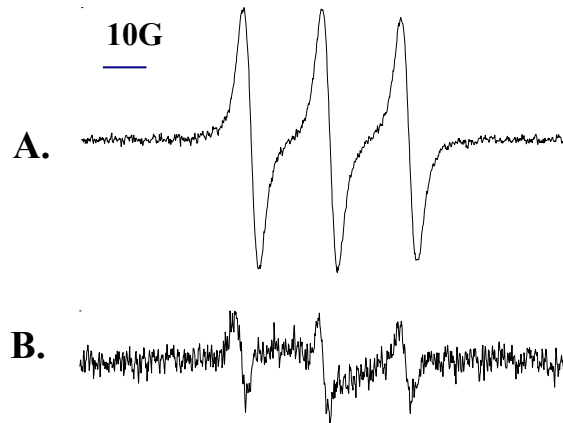


**Figura 12. Efeito do nitróxido Tempo sobre a atividade do complexo Nox2.** Os grupos experimentais diferem entre si num nível de significância de 5%. n=3.

#### **5.4 Verificação da produção de radicais tiila por neutrófilos durante a ativação do complexo Nox2**

No sistema químico modelo (fenol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/peroxidase/GSH) as reações foram preparadas com Ac-Tempo, HRP, fenol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e GSH. Neste sistema foi avaliada a produção de GS<sup>•</sup> que, ao interagir com o Ac-Tempo resulta em decaimento do sinal característico em EPR e aumento na fluorescência ( $\lambda_{\text{ex}}$ 361nm  $\lambda_{\text{em}}$ 440nm) (BORISENKO et al., 2004).

A calibração do equipamento de EPR foi feita com o nitróxido Tempol cuja concentração usada foi de 36 µM, em seguida o espectro característico do nitróxido Ac-Tempo foi acompanhado por 10 minutos e registrado conforme ilustra a Figura 13A. No espectro B, pode-se observar o sistema químico completo na presença de Ac-Tempo, neste caso nota-se que frente ao estímulo disparado pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tendo como consequência a produção de GS<sup>•</sup>, houve um consumo significativo de Ac-Tempo.



**Figura 13. Espectros de EPR do sistema químico modelo.** A: Espectro característico do nitróxido Ac-Tempo (10  $\mu$ M); B: Sistema químico completo (fenol/ $H_2O_2$ /peroxidase/GSH) na presença de Ac-Tempo (10  $\mu$ M).

Suspensões celulares de neutrófilos foram incubadas com Tempo ou Ac-Tempo por 5 minutos a 37°C e estimuladas ou não com PMA. Os espectros de EPR foram acompanhados por 10 minutos e posteriormente registrados. A Figura 14 mostra os espectros característicos dos nitróxidos Tempo (A) e Ac-Tempo (B).

Os espectros 1a e 1b correspondem respectivamente ao grupo de células tratadas com Ac-Tempo e Tempo (10  $\mu$ M). Comparando estes resultados com o espectro de Ac-Tempo no sistema químico mostrado acima, observa-se um decréscimo de aproximadamente 50% no sinal de EPR no sistema biológico, indicando um consumo de nitróxidos pelas células.

Nos grupos experimentais tratados com Ac-Tempo (2a) e Tempo (2b) e posteriormente estimulados com PMA observou-se um decaimento de aproximadamente 52% do sinal de EPR, indicando que os nitróxidos foram capazes de reagir no meio celular indisponibilizando espécies radicalares.

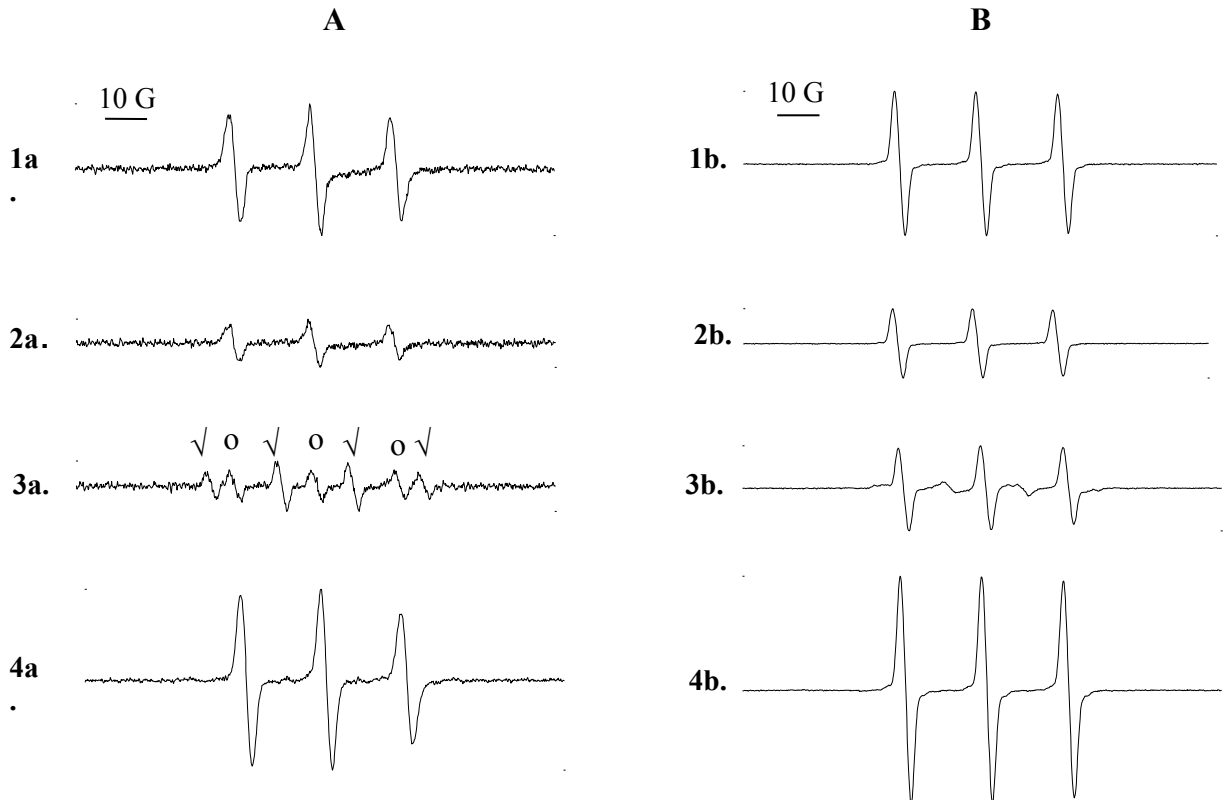
Para explorar o envolvimento de radicais tiila frente ao tratamento com nitróxidos em neutrófilos, foram feitos dois tratamentos específicos. Primeiramente usou-se DMPO e o aparecimento do aduto DMPO/GS $\cdot$  foi sondado e, para certificar que entre as espécies radicalares formadas estaria a presença de GS $\cdot$ , grupamentos tiólicos foram bloqueados com o NEM.

No grupo 3b tratado com DMPO pode-se observar o aparecimento de novas bandas sugestivas do aduto DMPO/GS $\cdot$  (espectros marcados com  $\surd$ ). O tratamento com NEM (4b)

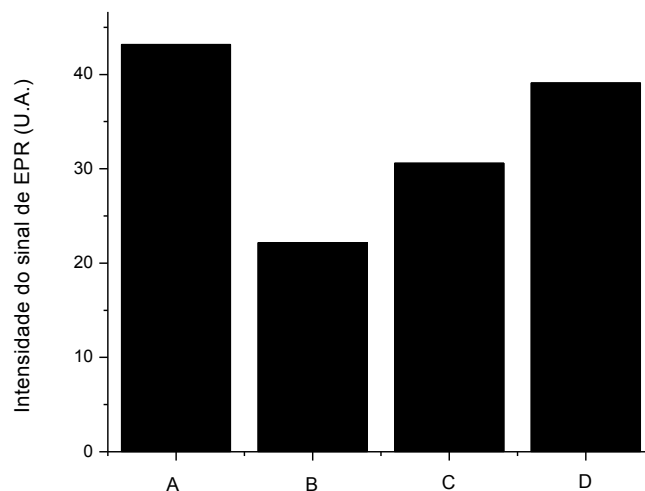
aboliu totalmente essas bandas, conservando apenas o sinal característico do nitróxido, confirmando a presença de radicais tiila gerados em neutrófilos estimulados com PMA.

Nota-se ainda que a intensidade do sinal sofreu um acréscimo quando comparado com os espectros mostrados nas figuras 1a e 1b. Este acréscimo ocorreu devido ao fato dos grupamentos tiólicos estarem bloqueados, o que impede a reação dos nitróxidos no meio celular.

Na figura 14 encontram-se os resultados quantitativos das medidas espectrais referentes ao nitróxido Tempo.



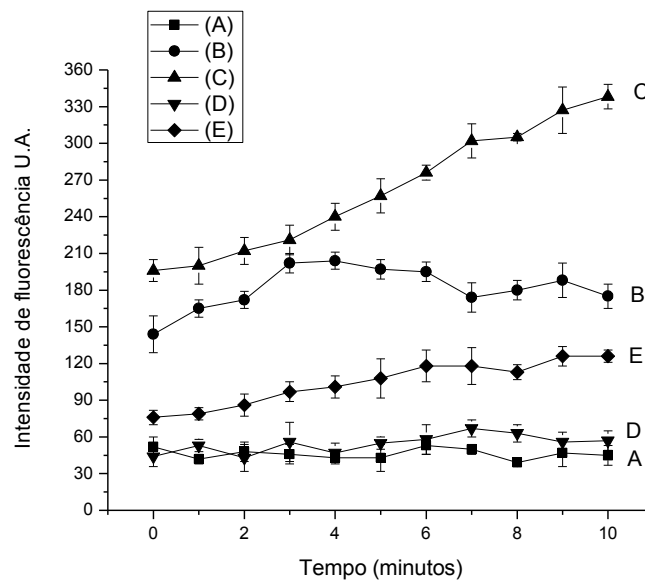
**Figura 14. Espectros de EPR em sistema biológico.** A: Grupos experimentais tratados com o nitróxido Ac-Tempo (10  $\mu\text{M}$ ); 1a: Somente células e Ac-Tempo; 2a: Células estimuladas com PMA e posteriormente tratadas com Ac-Tempo; 3a: Células estimuladas e tratadas com Ac-Tempo e DMPO; 4a: Células bloqueadas com NEM, estimuladas e tratadas com Ac-Tempo. B: Grupos experimentais tratados com o nitróxido Tempo (10  $\mu\text{M}$ ); 1b: Somente células e Tempo; 2b: Células estimuladas com PMA e posteriormente tratadas com Tempo; 3b: Células estimuladas e tratadas com Tempo e DMPO; 4b: Células bloqueadas com NEM, estimuladas e tratadas com Tempo. Todos os espectros foram acompanhados por 10 minutos.



**Figura 15. Quantificação da intensidade do sinal de EPR do nitróxido Tempo em neutrófilos.** A: Células tratadas com Tempo (10  $\mu\text{M}$ ); B: Células estimuladas com PMA demonstraram um consumo de nitróxido e um decréscimo de 52% da intensidade do sinal de

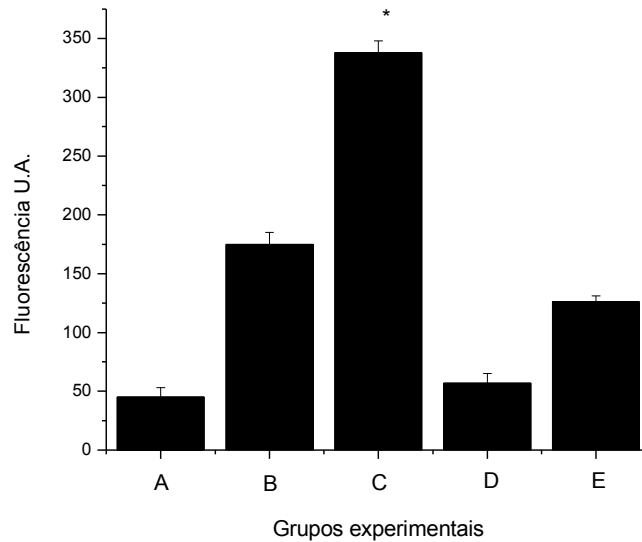
EPR foi observada; C: Células tratadas com Tempo e DMPO apresentaram um decréscimo de 29% da intensidade do sinal, pois houve uma competição entre DMPO e Tempo; D: Células bloqueadas com NEM não mostraram um consumo significativo de Tempo.

Para análise de fluorescência foram feitos os mesmos tratamentos citados anteriormente e as medidas foram acompanhadas por 10 minutos (Figura 16). De forma coerente com os resultados de EPR, o grupo controle (A) apresentou uma intensidade baixa e não significativa de fluorescência. As células tratadas com Ac-Tempo (B) demonstraram um nível basal de fluorescência. A fluorescência atingiu um nível máximo quando as células foram estimuladas com PMA (C), este resultado encontra-se em concordância com os dados do EPR que apresentaram um decréscimo significativo no sinal. O tratamento com NEM foi feito em células sem e com estímulo e, observa-se que em células não estimuladas (D) a fluorescência foi estatisticamente igual ao grupo controle (A), em resposta ao estímulo (E) esta sofreu um pequeno aumento.



**Figura 16. Cinética da emissão de fluorescência de suspensões celulares de neutrófilos tratados com Ac-Tempo.** A: Fluorescência característica do grupo controle representado apenas por células. B: Células tratadas com Ac-Tempo (10  $\mu$ M); C: Células estimuladas com

PMA; D: Células tratadas com NEM; E: Células tratadas com NEM e posteriormente estimuladas com PMA. A intensidade de fluorescência foi acompanhada por 10 minutos. O grupo (C) difere estatisticamente dos demais ( $p \leq 0,05$ ).

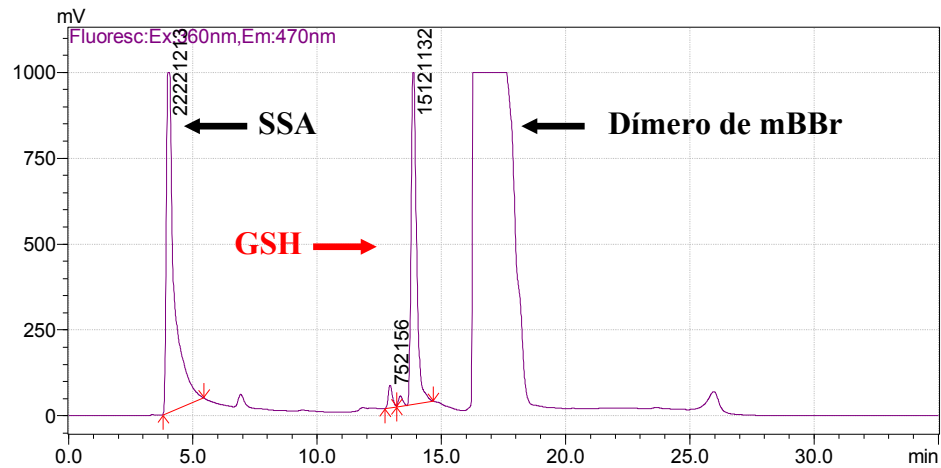


**Figura 17. Intensidade de fluorescência (U.A.) de suspensões celulares de neutrófilos tratados com Ac-Tempo.** A: Fluorescência característica do grupo controle. B: Células tratadas com Ac-Tempo (10  $\mu\text{M}$ ); C: Células estimuladas com PMA, observou-se um aumento de significativo de aproximadamente 80 unidades ; D: Células tratadas com NEM; D: Células tratadas com NEM e posteriormente estimuladas com PMA. A intensidade de fluorescência foi acompanhada por 10 minutos. O grupo (C) difere estatisticamente dos demais ( $p \leq 0,05$ ).

### 5.5 Determinação da concentração intracelular de GSH

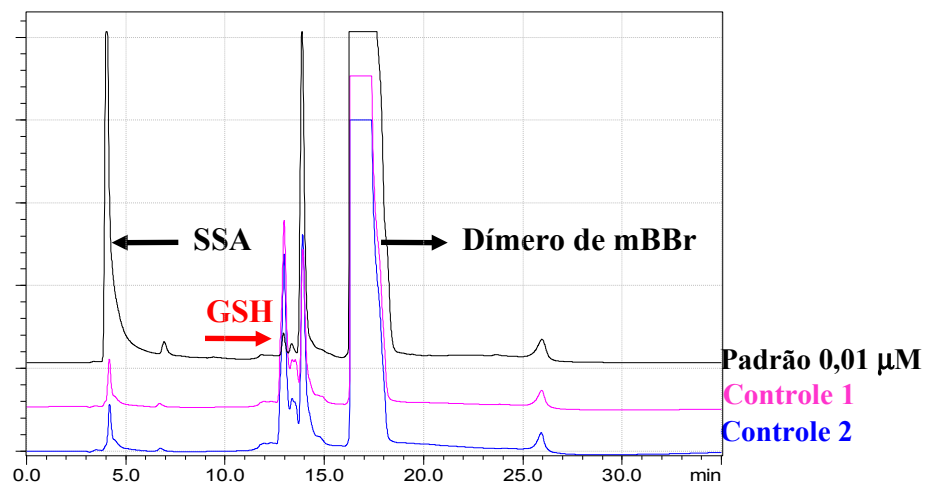
Assim como muitos tióis, a GSH reage com mBBr formando um aduto fluorescente e estável. Com base nesta derivatização fez-se a separação e quantificação usando detector de fluorescência acoplado ao HPLC. Para padronização do método foi feita uma curva de calibração usando padrões de GSH com concentrações de 0,01-0,3  $\mu\text{M}$ . Estes padrões foram preparados conforme o protocolo descrito anteriormente tendo como mBBr o agente derivatizante (ANDERSON, et al., 1999).

Na Figura 18 pode-se observar o cromatograma representando a corrida cromatográfica com o padrão na concentração de 0,01  $\mu\text{M}$ .



**Figura 18. Cromatograma característico de detecção de GSH após derivatização com mBBR.** Solução padrão de GSH ( $0,01 \mu\text{M}$ .) foi derivatizada e injetada em cromatógrafo, sendo a detecção feita por fluorescência. Nessas condições, o tempo de retenção (TR) deste analito foi 12,5 minutos.

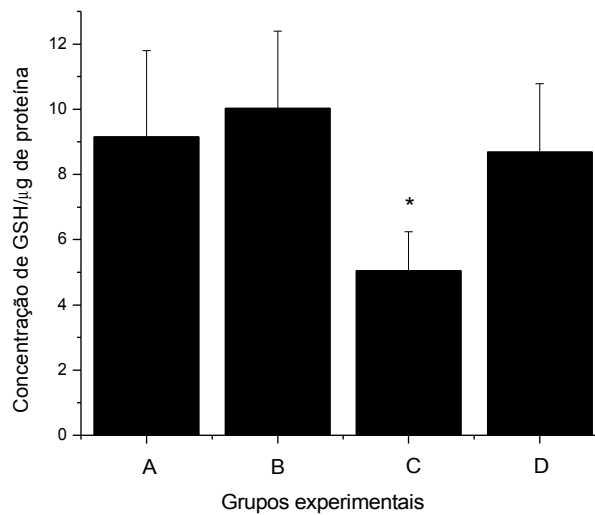
Imediatamente após os tratamentos celulares, as amostras foram derivatizadas e preparadas para a análise cromatográfica. Na Figura 19 mostrada abaixo, encontram-se a sobreposição dos registros característicos de três corridas cromatográficas: padrão na concentração de  $0,01 \mu\text{M}$  e de duas amostras provenientes do grupo controle (neutrófilos dormentes).





**Figura 19. Cromatogramas característicos de amostras do padrão (0,01  $\mu\text{M}$ ) e de dois grupos controles (neutrófilos dormentes).** Observa-se que os picos característicos da identificação de GSH em todas as amostras apresentam o mesmo tempo de retenção relativo a 12,5 minutos.

A concentração de GSH intracelular encontrada nos diferentes grupos experimentais pode ser observada na Figura 20.



**Figura 20. Determinação da concentração de GSH intracelular.** A: Grupo controle composto por apenas células; B: Células tratadas com Tempo 100  $\mu\text{M}$ . C: Células estimuladas com PMA; D: Células tratadas com Tempo e estimuladas com PMA. Todos os grupos experimentais foram previamente tratados com NEM. O grupo C difere significativamente dos demais ( $p \leq 0,05$ ).

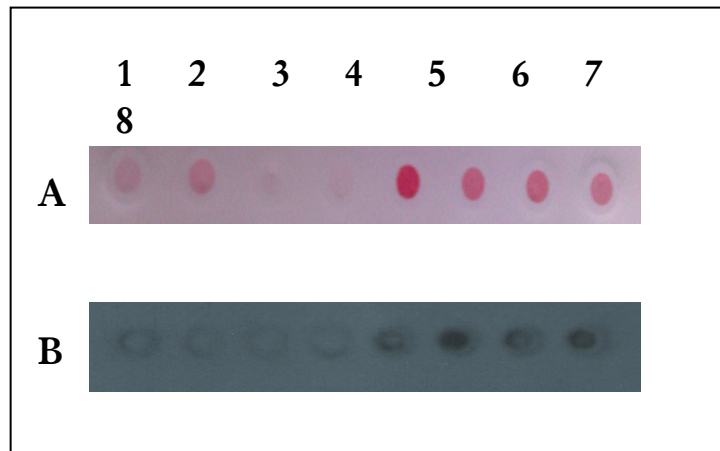
### 5.6 Determinação da S-glutationilação proteica em neutrófilos

A modificação proteica por S-glutationilação foi determinada usando anticorpo anti-GSH. As alíquotas das amostras com diferentes grupos de tratamento contendo 2  $\mu\text{g}$  de proteína foram transferidas para a membrana de nitrocelulose e para confirmar a eficiência da transferência a membrana foi corada com Vermelho de Ponceau (Figura 21A).

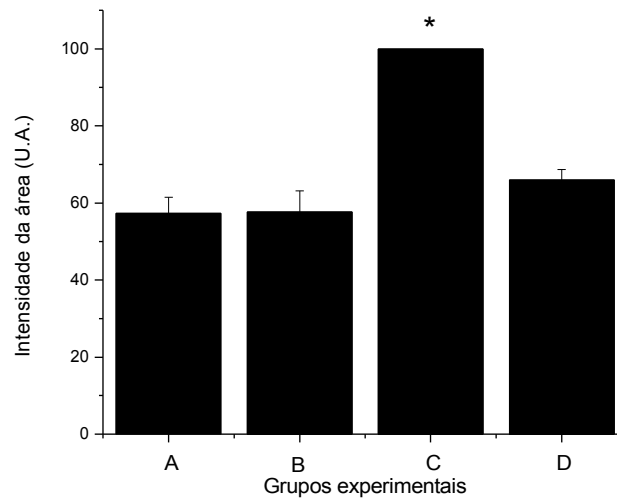
Confirmada a transferência seguiu-se a realização do “dot blot” conforme estabelecido anteriormente. Após a revelação, a intensidade de S-glutationilação proteica foi confirmada

visualmente (Figura 21B) e analisada por densitometria para que fosse feita a quantificação (Figura 22).

No grupo controle (A) observou-se um nível basal de *S*-glutathionilação. Em células dormentes tratadas com o Tempo, esse processo foi estatisticamente igual ao grupo controle, indicando que o tratamento com nitróxido em neutrófilos não interferiu no nível de *S*-glutathionilação. As células estimuladas com PMA (C) revelaram uma quantidade maior de ocorrência de *S*-glutathionilação, (aumento de 43% comparando-se com células dormentes). Nas amostras tratadas com Tempo e posteriormente estimuladas, houve decréscimo de 34% da marcação com anticorpo anti-GSH (Santa Cruz, CA), indicando claramente a interferência desse nitróxido no processo pós-traducional de ligação de GSH a estruturas protéicas. O tratamento das amostras com DTT aboliu a marcação com o anticorpo anti-GSH, resultado coerente com a ação desse redutor químico sobre a ligação proteínas-GSH.



**Figura 21. Determinação da *S*-glutathionilação proteica em neutrófilos.** A: Membrana de nitrocelulose corada com Ponceau para simples conferência da transferência. B: Filme radiográfico demonstrando a marcação dos diferentes tratamentos; De 1 a 4 encontram-se os grupos tratados com DTT, pode-se observar que este tratamento aboliu toda a marcação; de 5 a 8 encontram-se os diferentes grupos tratados com NEM.



**Figura 22. Quantificação da S-glutathionilação proteica em neutrófilos por densitometria.** A: Grupo controle (células dormente), B: Células tratadas com Tempo; C: Células estimuladas com PMA; D: Células tratadas com Tempo e estimuladas com PMA. Todos os grupos experimentais receberam tratamento com NEM. O grupo C difere significativamente dos demais ( $p \leq 0,05$ ).

## 6 DISCUSSÃO

Os fagócitos são componentes celulares da imunidade inata responsáveis pela primeira linha de defesa do organismo contra infecções, capazes de eliminar uma ampla variedade de patógenos que continuamente colocam em risco a integridade dos sistemas hospedeiros através de um mecanismo efetor denominado fagocitose (HENDERSON; CHAPPELL, 1996).

Nas últimas décadas, estudos examinaram em detalhes as ações específicas dos elementos do sistema imune, em especial, a resposta hospedeira aguda, caracterizada pela presença de células que atuam nas fases iniciais da resposta inflamatória, os neutrófilos. Estas células, frente a uma agressão, migram do sangue periférico para o tecido lesado através de um gradiente de concentração de fatores quimiotáticos, com o objetivo de engolfar e destruir microorganismos, evitando o estabelecimento da inflamação (HENDERSON; CHAPPELL, 1996).

O processo da fagocitose é acompanhado por uma intensa atividade metabólica celular caracterizada por um grande consumo de oxigênio, conhecido como “burst” respiratório. Durante este processo ocorre a ativação do complexo enzimático Nox2 e, conseqüentemente, a formação de diferentes espécies reativas como, por exemplo, o  $O_2^{\bullet-}$  e seus derivados, capazes de causar uma série de efeitos deletérios ao organismo (BABIOR, 2000).

Diferentes agentes são capazes de ativar o complexo Nox2 de neutrófilos levando a uma produção de  $O_2^{\bullet-}$ . Entre os agentes mais conhecidos encontra-se o éster de forbol co-carcinogênico PMA (ROY, et al., 1995). Estudos anteriores demonstraram que este é capaz de estimular o “burst” respiratório de macrófagos diretamente pela via PKC gerando um consumo máximo de  $O_2$  estequiometricamente igual à produção do radical  $O_2^{\bullet-}$ . (LAIGNIER et al, 2007).

A produção de ERO/ERN por fagócitos é um processo que ocorre sob um refinado controle fisiológico (BRIGAGÃO; COLEPICOLO, 1996). Se, de um lado esse evento representa uma resposta essencial ao organismo contra agentes estranhos, por outro, quando produzidos de forma descontrolada, podem desencadear danos oxidativos irreversíveis. Essa produção exacerbada de ERO/ERN liberados por fagócitos é uma observação frequente em diversas condições patológicas como artrite reumatóide, lesão por isquemia, reperfusão e doenças neurodegenerativas (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 sustentar o equilíbrio entre a produção de oxidantes e a ação de antioxidantes em focos inflamatórios.

Em consequência à diversidade de substâncias e à multiplicidade de vias de transdução de sinais bioquímicos capazes de ativar e sustentar a atividade catalítica do complexo Nox2, uma variedade de compostos com maior ou menor especificidade, têm sido relatados por apresentarem capacidade de exercer efeito inibitório sobre esse sistema.

Baseados em alvos bioquímicos, estes compostos são divididos em duas grandes classes: as 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 as 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).

Neste contexto, os tióis em geral, mostram-se como importantes alvos do controle celular oxidativo por entrarem com relativa facilidade em ciclos de oxidação e redução. Está bem estabelecido que a atividade do complexo Nox2 é inibida por reagentes oxidantes ou alquilantes de tióis (WINTERBOURN; HAMPTON, 2008). Akard e colaboradores, 1988, mostraram que NEM, um alquilante de tióis, impede o acoplamento ou a ativação da Nox2, mas não inibe a atividade de complexos já formados, em um sistema “cell free”. Por outro lado, quando adicionado a neutrófilos íntegros pré ativados, NEM induziu a desativação do “burst” desencadeado tanto por PMA quanto por fMLP (DAHLGREN; SUNDQVIST, 1991).

Trabalhos recentes estenderam estas observações para as isoformas vasculares da NADPH oxidase (JANISZEWSKI et al., 2000). As oxidoredutases ditiólicas, especialmente aquelas pertencentes à superfamília das tiorredoxinas, são proteínas reconhecidas importantes para os mecanismos de sinalização redox (ARRIGO, 2000; CLISSOLD; BICKNELL, 2003; WILKINSON; GILBERT, 2004). Entre os muitos membros da superfamília tiorredoxina, encontra-se a proteína dissulfeto isomerase (PDI) que está relacionada com a regulação da atividade das isoformas Nox1 e Nox4, em células musculares lisas vasculares (JANISZEWSKI et al, 2005).

Dentre alguns compostos capazes de suprimir o “burst” respiratório de fagócitos por vias bioquímicas específicas destacam a toxina pertússica, (CASEY; GILMAN, 1988), capaz de inibir a transdução de sinal via proteína G, a aspirina, o diclofenaco e a indometacina que inibem a atividade catalítica de proteínas quinases ou ativam fosfatases (CHAN et al., 2001).

Entre os inibidores diretos do complexo Nox2 encontram-se 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 Nox2, 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).

Mais recentemente, foi demonstrado que aminoácidos sulfurados, tais como L-cisteína, N-acetil-L-cisteína e L-cistationina, suprimem a geração de  $O_2^{\bullet-}$  por inibirem a translocação das subunidades  $p67^{phox}$  e  $p47^{phox}$  para a membrana (KITAOKA et al., 2005).

Dada a relevância das ERO/ERN oriundas de leucócitos circulantes em diferentes mecanismos fisiopatológicos aliada à atividade SOD mimética dos nitróxidos nos propusemos a investigar a capacidade deste composto de catalisar a atividade de dismutação do  $O_2^{\bullet-}$ , gerado pelo sistema xantina/xantina oxidase.

Os resultados mostraram que tanto o Tempo como Ac-Tempo apresentaram atividade SOD mimética, sendo capazes de promover 100% da dismutação do  $O_2^{\bullet-}$ , porém em concentrações diferentes (Figura 11).

A concentração de Tempo necessária para inibir 100% da atividade enzimática foi de 100  $\mu M$ , já para o Ac-Tempo foi necessário uma concentração três vezes maior (300  $\mu M$ ). Essa diferença pode estar associada à lipofilicidade e ao tamanho da molécula. A estrutura química do Tempo confere a este composto maior lipofilicidade e conseqüentemente melhor permeabilidade na membrana celular, além do fato deste composto não apresentar em sua estrutura química o anel de acridina presente no Ac-Tempo.

Trabalhos recentes do nosso grupo de pesquisa mostraram que a modulação do “burst” respiratório de neutrófilos pelos nitróxidos estaria associada à capacidade destes compostos em inibir indiretamente a atividade da enzima PKC e modular processos pós-traducionais impedindo a fosforilação de determinadas proteínas (RIBEIRO, 2009).

Os resultados mostrados na Figura 12 estão de acordo com os dados citados acima. Observou-se que a incubação prévia das suspensões celulares de neutrófilos com o nitróxido Tempo em diferentes concentrações, determinou uma inibição no “burst” respiratório com uma correlação direta entre a dose do nitróxido e a quantidade de  $O_2^{\bullet-}$  liberada pelos fagócitos, sendo necessária uma concentração de 400  $\mu M$  para inibir totalmente a atividade do complexo Nox2.

A resposta do sistema Nox2 frente ao tratamento com nitróxido aponta para uma ação que provavelmente não depende de uma inibição direta dos componentes do complexo. Possivelmente, os nitróxidos, por serem capazes de permear a membrana celular, agem alterando a sustentação da atividade enzimática, inibindo a geração intracelular de espécies radicalares e oxidantes como  $GS^{\bullet}$ ,  $O_2^{\bullet}$  e  $H_2O_2$  que sustentam o “burst” respiratório e desencadeiam modificações proteicas pós-traducionais como fosforilação de proteínas e *S*-glutathionilação. Dessa forma, estes compostos atuam protegendo as células contra produção de oxidantes, evitando danos oxidativos.

A sondagem de radicais  $GS^{\bullet}$  gerados em sistema químico e biológico foi realizada utilizando o composto Ac-Tempo, que, por possuir em sua estrutura química um esqueleto de Tempo que confere a este uma natureza paramagnética conjugada a um anel de acridina que, frente a um estímulo é capaz de emitir fluorescência (BORISENKO et al., 2004), permitiu a detecção destes radicais através de duas metodologias diferentes: EPR e espectroscopia de fluorescência.

Os radicais  $GS^{\bullet}$  foram gerados primeiramente em um sistema químico onde, peroxidases catalizam a oxidação de fenóis formando um produto intermediário, o radical fenoxil que, reduzidos pela GSH ou outros tióis originam  $GS^{\bullet}$  (BORISENKO et al., 2004) e, posteriormente em sistema biológico, onde suspensões celulares de neutrófilos foram estimuladas com PMA.

Comparando os dois espectros da Figura 13, nota-se uma diminuição significativa do espectro B, indicando que houve um consumo do nitróxido devido a sua interação com  $GS^{\bullet}$ , geradas frente ao estímulo com  $H_2O_2$  no sistema químico.

A diminuição da banda de EPR aliada ao consumo de Ac-Tempo está de acordo com os dados da literatura e diretamente associada a desoxigenação dos nitróxidos e com a capacidade destes de atuarem como “scavenger” de  $GS^{\bullet}$ , envolvidos em diversas condições patológicas (BORISENKO et al., 2004).

Em sistema biológico, suspensões celulares de neutrófilos foram tratadas com Ac-Tempo e Tempo e o sinal de EPR de ambos foram acompanhados, assim como a fluorescência de células tratadas com Ac-Tempo.

Na Figura 14 observam-se os espectros dos nitróxidos em condições experimentais diferentes. Nota-se que nos dois casos houve uma diminuição pequena, porém significativa do sinal de EPR indicando um consumo dos nitróxidos em células dormentes, não estimuladas com PMA (1a e 1b). Este resultado está possivelmente relacionado com o efeito “priming” característico dos neutrófilos.

Segundo HATANAKA (2003), o termo “priming” pode ser entendido como um estado de pré ativação de neutrófilos dormentes. O processo inflamatório, desencadeado pelo caseinato de sódio promoveu o aparecimento de neutrófilos, que por quimiotaxia chegaram até o local da inflamação induzida, assim como a liberação de diferentes mediadores químicos como interleucinas e fator de necrose tumoral (TNF) (HATANAKA, et al.,2003). Em resposta a este estímulo, mesmo que pequeno quando comparado com o PMA, os neutrófilos por possuírem uma intensa atividade metabólica oxidativa produziram uma pequena quantidade de espécies oxidantes, não suficientes para desencadear o “burst” respiratório, mas capazes de interagir com os nitróxidos provocando uma diminuição da intensidade do sinal de EPR.

Em estudos anteriores envolvendo condições experimentais semelhantes, porém utilizando macrófagos este efeito “priming” não foi observado, visto que não houve diferença na intensidade dos sinais de EPR do sistema químico e do sistema biológico em células dormentes (LAIGNIER et al, 2007). Já em células estimuladas com PMA o consumo de nitróxidos foi significativamente maior (Figura 14; 2a e 2b), indicando uma liberação máxima de espécies radicalares pelo complexo Nox2. A diminuição do sinal de EPR nestes dois casos pode estar relacionada com a propriedade já conhecida dos nitróxidos de atuarem como “scavenger” de espécies radicalares e também na sua possível capacidade, ainda em estudo, de inibir indiretamente a PKC.

O envolvimento de  $GS^{\bullet}$  gerados pelo estímulo do complexo Nox2 foi avaliado utilizando-se DMPO e a hipótese da formação do aduto entre DMPO/  $GS^{\bullet}$  foi confirmada adicionado-se ao tratamento um alquilante de grupamentos tiólicos, NEM. Nos espectros 3a e 3b, nota-se o aparecimento de novas bandas espectrais sugestivas do aduto DMPO/  $GS^{\bullet}$ , que desaparecem frente ao bloqueio com NEM.

Os resultados de fluorescência em células tratadas com Ac-Tempo mostrados na Figura 16 encontram-se em sincronia com os dados do EPR, pois a medida em que há um decaimento o sinal de EPR, observa um aumento da intensidade de fluorescência.

Estes resultados podem ser explicados devido à estrutura química conjugada da molécula química de Ac-Tempo. O esqueleto do nitróxido Tempo por possuir características paramagnéticas, em resposta ao estímulo pelo PMA, emite um sinal radicalar captado pelo EPR, já o anel de acridina, frente ao estímulo, se desliga da molécula emitindo fluorescência, o que torna o Ac-Tempo uma sonda útil para determinar a presença de radicais tiila através de duas metodologias distintas.

Os tióis celulares, entre outras moléculas bioquímicas, desempenham um papel significativo na vida celular por serem capazes de minimizar conseqüências deletérias de um



desbalanço entre oxidantes e antioxidantes, além de prover uma resposta celular adaptativa aos estresses oxidativo e/ou nitrosativo. Em células de mamíferos, GSH é o mais abundante tiol de baixo peso molecular (SIES, 1986; FILOMENI et al., 2002), que além da forma reduzida, está presente como duas formas oxidadas: GSSG e como tiol protéico misto R-SSG. Ambas as formas oxidadas podem ser reduzidas de volta a GSH pela catálise das enzimas glutathiona redutase e pelo sistema tioredoxina/glutaredoxina. Além de suas ações como um composto que ajuda a manter o balanço redox celular, GSH funciona como um modulador da atividade de enzimas dependentes de tióis, e atua como cofator de enzimas antioxidantes como a glutathiona peroxidase (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; FILOMENI et al., 2002).

As propriedades multifuncionais da GSH estão refletidas num interesse crescente por esta molécula como parte integrante das mais diversas investigações, incluindo mecanismos enzimáticos de regulação antioxidante, biossíntese de macromoléculas, câncer, toxicidade devido à oxigenoterapia prolongada e, mais recentemente, doença de Alzheimer, Parkinson.

Já está bem estabelecido pela literatura que a GSH, por estar presente de forma abundante nas células e ser um potente agente redutor é responsável por uma das principais defesas antioxidantes endógenas de diferentes organismos (HALLIWELL; GUTERIDGE, 2007). Frente a estresses oxidativo/nitrosativo ocorre uma diminuição da proteção antioxidante caracterizada principalmente pela depleção de GSH intracelular (CZUCZEJKO, et al., 2003). Esta diminuição de GSH pode levar a um desequilíbrio da razão GSH/GSSG, favorecendo um aumento de GSSG, que posteriormente pode reagir com grupos tióis de proteínas, formando dissulfetos mistos, processo denominado *S*-tiolação de proteínas (WINTERBOURN; HAMPTON, 2008).

Os resultados demonstrados na Figura 20 corroboram com os dados da literatura e reforçam o papel da GSH durante a manutenção do “burst” respiratório, onde, em células estimuladas com PMA nota-se uma queda significativa (55%) de GSH intracelular, sugerindo que este processo é decorrente da produção de ERO/ERN em fagócitos estimulados pela via da PKC. Posteriormente em células tratadas com Tempo, observou-se que este preveniu a depleção de GSH, levando a uma proteção celular contra danos oxidativos induzidos pelo PMA, sendo capaz de manter as concentrações de GSH intracelular em níveis estatisticamente iguais ao controle.

Resultados semelhantes foram relatados por CHAI et al. (1994), que detectaram concentrações médias de 2,7 nmol de GSH e 0,18 nmol de GSSG/ $2 \times 10^6$  neutrófilos humanos não estimulados, com uma queda de GSH após 5 minutos de estimulação com PMA, sem variação significativa na concentração de GSSG. Perda de GSH da ordem de 30-40% em

neutrófilos estimulados com PMA foi relatada por CARR; WINTERBOURN (1997), quando apresentaram fortes evidências que esse processo é decorrente da produção de ERO/ERN pelas células estimuladas. No citado trabalho, HOCl exógeno adicionado aos neutrófilos produziu o mesmo efeito, enquanto que metionina e tiodipropionato, ambos “scavengers” de HOCl, preveniram a queda do nível de GSH celular.

Dentre as modificações reversíveis de pós-transcrição e pós-tradução que podem ocorrer nas estruturas proteicas, como modificações da resposta adaptativa celular ao ambiente, destacam-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. Além destas pode-se citar, ainda, a *S*-tiolação e *S*-glutacionilação (THOMAS et al., 1995; KLATT; LAMAS, 2000).

Durante a fagocitose ou sob estímulos específicos, os fagócitos profissionais são capazes de produzir grande quantidade de espécies oxidantes, onde o  $O_2$  é convertido a  $O_2^{\bullet-}$  e, posteriormente, a  $H_2O_2$ , HClO e  $HO^{\bullet}$ , oxidantes mais potentes que  $O_2^{\bullet-}$ . O complexo enzimático Nox2 de membrana é internalizado durante a formação do fagossoma, e as espécies oxidantes, especialmente  $H_2O_2$ , entram no citoplasma celular. Assim, 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 (Babior, 2000; Babior, 2002).

O mecanismo reversível de *S*-glutacionilação proteica 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 (CARR; WINTERBOURN, 1997).

A *S*-tiolação é considerada como um mecanismo protetor para prevenir a oxidação irreversível dos grupamentos -SH proteicos. Atualmente, postula-se que este processo aja como um mecanismo redox-regulador da cascata de transdução de sinal (DIXON et al., 2005). O mecanismo reversível de *S*-glutacionilação proteica 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 (RINNA et al., 2006; DALLE-DONNE et al., 2007; GALLOGLY; MIEYAL, 2007).

No presente trabalho foi estudado o processo de *S*-glutathionilação proteica em neutrófilos inflamatórios com a finalidade de verificar se o efeito do nitróxido Tempo sobre o “burst” respiratório estimulado por PMA correlacionava com esse processo de modificação proteica. A análise por “dot blot” da *S*-glutathionilação em neutrófilos apresentou diferenças entre os diferentes grupos de tratamento (Figura 22).

Amostras do grupo controle apresentaram um nível basal de *S*-glutathionilação já que este processo ocorre em condições fisiológicas. Em neutrófilos estimulados, foi detectado um aumento significativo de 43% no nível de *S*-glutathionilação, indicando uma resposta ao estímulo externo com PMA, paralelo à ativação do “burst” respiratório de neutrófilos. Este resultado é coerente com relatos da literatura, onde o mecanismo reversível de *S*-glutathionilação proteica 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., 1994; RAVICHANDRAN et al., 1994; WINTERBOURN, 1997).

De forma marcante, a análise das suspensões celulares tratadas com Tempo e posteriormente estimulados pela via PKC, mostra claramente que esse agente foi capaz de alterar a resposta das células com significativa diminuição (34%) do processo de *S*-glutathionilação. Todos os grupos experimentais tratados com um agente redutor, DTT, quando analisados, mostraram supressão praticamente completa da marcação com o anticorpo anti-GSH, o que comprova que este é um processo oxidativo, reversível por redução química.

O processo de *S*-glutathionilação é um mecanismo de sinalização celular que ocorre em resposta ao meio ambiente celular ou a um 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*-glutathionilação constitui um mecanismo de proteção às estruturas proteicas contra danos irreversíveis em condições de elevado estresse oxidativo/nitrosativo. Quando este sítio proteico é uma enzima, poderá ocorrer alteração da atividade enzimática (DALLE-DONNE et al., 2007; GHEZZI; DI SIMPLICIO, 2007). Alguns fármacos como o dissulfiram, usado para o tratamento do alcoolismo, mostrou-se capaz de provocar um desequilíbrio no estado redox de GSH intraplaquetária induzindo *S*-glutathionilação reversível (ROSSI et al., 2006).

Os tióis ou proteínas que contêm 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*-glutathionilação é uma modificação proteica pós-traducional que pode modificar a atividade de algumas proteínas que possuem um resíduo de cisteína em sua estrutura química. 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).

A 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 a Proteína Fosfatase 2 (isoforma PP2A), embora existam poucos estudos mostrando esta regulação que envolve o resíduo de cisteína 273. Além disso, em células Caco-2 esta regulação de PP2A e aumento na fosforilação da treonina é gerada pela presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que poderia ser causada por ativação de uma ou mais isoformas de PKC (RAO; CLAYTON, 2002).

Outro fator importante para a reatividade de tióis proteicos é o valor de pK<sub>a</sub>. Quando desprotonados (tiolatos) a reatividade dos tióis é maior. Em tióis proteicos e em GSH o valor de pK<sub>a</sub> gira em torno de 8,5. Porém, em PTP que são as fosfatases mais susceptíveis à oxidação o pK<sub>a</sub> fica em 4,7-5,4. Esse baixo valor de pK<sub>a</sub> 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).

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 Nox2 estariam sofrendo regulação por *S*-glutathionilação, mas a confirmação desta hipótese só seria possível com testes em sistema “cell-free” ou através de imunoprecipitação.

O processo de *S*-glutathionilação protéica é metabolicamente relevante, tanto por constituir-se um mecanismo de proteção aos estresses 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 (BABIOR, 1984; CHAN et al., 2001) e síntese proteica (EDWARDS et al., 1989; STRINGER et al., 1995; BRIGAGÃO; COLEPICOLO, 1996; BRIGAGÃO; COLEPICOLO, 1998), a *S*-glutathionilação está intrinsecamente ligada à resposta de neutrófilos ao estímulo do complexo Nox2.

Com base nestes dados e nos resultados apresentados no presente trabalho, sugere-se que os nitróxidos, em particular o Tempo, ajam por diferentes mecanismos modulando a resposta inflamatória e prevenindo contra danos oxidativos. As possíveis hipóteses do mecanismo de ação destes compostos estão relacionadas com a inibição indireta do complexo Nox2, que por possuírem propriedades paramagnéticas, são capazes de interagir e indisponibilizar espécies radicalares e oxidantes produzidas no compartimento intracelular como  $GS^{\bullet}$ ,  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$ , evitando a ativação da PKC, modulando o “burst” respiratório de neutrófilos e prevenindo modificações proteicas pós traducionais como a *S*-glutathionilação.

## 7 CONCLUSÃO

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

1. O nitróxido Tempo e Ac-Tempo inibem o “burst” respiratório de neutrófilos estimulados pela via de PKC.
2. A formação de radicais tiila durante a ativação do complexo Nox2 é um alvo preponderante para reação dos nitróxidos.
3. O efeito do nitróxido Tempo é exercido através da diminuição do processo de *S*-glutathionilação proteica associada ao “burst” respiratório.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2005.
- ANDERSON, M.T. et al. An Improved Monobromobimane Assay for Glutathione Utilizing Tris-(2-carboxyethyl)phosphine as the Reductant. **Analytical Biochemistry**, v. 272, p. 107-109, 1999.
- ARRIGO, A.P. Gene expression and the thiol redox state. **Free Radical in Biology & Medicine**, v. 27, p. 936-944, 1999.
- AUGUSTO, O. et al. Cyclic nitroxides inhibit the toxicity of nitric oxide-derived oxidants: mechanisms and implications. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.80, p. 179-189, 2008.
- BABIOR, B.M.; KIPNES, R.S.; CURNUTTE, J. The production by leucocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 52, p. 741-744, 1973.
- BABIOR, B.M. NADPH oxidase. **Current Opinion in Immunology**, v. 16, p. 42-47, 2004.
- 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, 1999.
- BABIOR, B.M. The Respiratory Burst of phagocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 73, p. 599-601, 1984.
- BABIOR, B.M. The respiratory burst oxidase. **Adv. Enzymol.**, v. 65, p. 49-95, 1992.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p.113-123, 2006.
- BARTOSZ, G. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? **Biochemical Pharmacology**, doi: 10.1016/j.bcp.2008.11.009, 2008.
- BECHARA, G.H. et al. Modulation by lymphocytes o the vascular effects caused by inflammatory mediators and carragenin in the rat. **Br. J. Exp. Path.**, v. 57, p. 497-504, 1976.

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

BERGENDI, L., et al. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sciences**, v. 65, p. 1865-1874, 1999.

BHALLA, U.S., YENGAR, R. Emergent properties of networks of biological signaling pathways. **Science**, v. 283, p. 381-387, 1999.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista Nutrição**, v. 12, p. 123-130, 1999.

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

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

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., LOPES, N.P., COLEPICOLO, P. Inhibitory mechanism of leukocyte respiratory burst by the sesquiterpene lactone lychnopholide through protein S glutathionylation decrease. **Society for Free Radical Research International 12<sup>th</sup> Biennial Meeting. Buenos Aires, Free Radical Biology & Medicine**, v.36, p. 57-58, 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, p. 269-280, 1996.



BRIGAGÃO, M.R.P.L., COLEPICOLO, P. Activation of neutrophils is daily inhibited by saliva. **Biol. Rhythm. Res.**, v. 29, p. 598-605, 1998.

CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 58, p. 79-110, 1989.

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

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, 1994.

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 Radical Research**, 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.

CLISSOLD, P.M, BICKNELL, R, The thioredoxin-like fold: hidden domains in protein disulfide isomerases and other chaperone proteins. **Bioessays**, v. 25, p. 603-11, 2003.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins Patologia Estrutural e Funcional**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

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

CRUZ, C.M. et al. ATP Activates a Reactive Oxygen Species-dependent Oxidative Stress Response and Secretion of Proinflammatory Cytokines in Macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 2871-2879, 2007.

CSÁNYI, C. et al. NOX and inflammation in the vascular adventitia. **Free Radical Research**, v. 47, p.1254-1266, 2009.

DAHLGREN, C., SUNDQVIST, T. The effects of N-ethylmaleimide on extracellularly and intracellularly generated chemiluminescence in neutrophils indicate that the rate of deactivation of NADPH-oxidase is higher when the oxidase system is localized on the plasma membrane than when it is localized on the phagosomal membrane. **J. Biolumin. Chemilumin.**, v.2, p. 81-86, 1991.

- DALLE-DONE, I. et al. Reversible S-glutathionylation of Cys<sup>374</sup> regulated actin filament formation by inducing structural changes in the actin molecule. **Free Radical Biology & Medicine**, 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.
- DI MASCIO,P. et al. Diurnal rhythm of  $\beta$ -catorene in photosynthetic alga *Gonyaulax polyedra*. **Biol Chem Hoppe-Seyler**, v. 376, p. 297-301, 1995.
- DIXON, D.P. et al. Stress-induced protein S-glutathionylation in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 138, p.2233-2244, 2005.
- 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.
- 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.
- ELLGAARD, L.; RUDDOCK, L.W. The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. **EMBO Rep**, v. 6, p. 28-32, 2005.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p. 61-68, 1997.
- 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.
- 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 A<sub>2</sub> and other leukocyte functions. **J. Nat. Prod.**, v. 64, p. 612-615, 2001.

GOLDSTEIN, S., SAMUNI, A., MERENYI, G. Reactions of Nitric Oxide, Peroxynitrite, and Carbonate Radicals with Nitroxides and Their Corresponding Oxoammonium Cations. **Chemical Research in Toxicology**, v. 17, p. 250-257, 2003.

GOLDSTEIN, S. et al., Kinetics of the Reaction between Nitroxide and Thiyl Radicals: Nitroxides as Antioxidants in the Presence of Thiols. **J. Phys. Chem. A**, v.112, p.8600-8605, 2008.

GOPALAKRISHNA, R.; JAKEN, S. Protein Kinase C Signaling and oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 1349-1361, 2000.

GRISHAM, M.B. Reactive oxygen species in immune responses. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, p. 1479-1480, 2004.

GROEMPING, Y. et al. Molecular basis of the phosphorylation-Induced Activation of the NADPH Oxidase. **Cell**, v. 113, p. 343-355, 2003.

HAHN, S. M. et al. Potential Use of Nitroxides in Radiation Oncology. **Cancer Research**, v. 54, p. 2006-2010, 1994.

HAHN, S.M.; MITCHELL, J.B.; SHACTER, E. Tempol inhibits neutrophil and hydrogen peroxide-mediated DNA damage. **Free Radical & Medicine**, v. 38, p. 879-884, 1997.  
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.

HANDELMAN, G.J. High-performance liquid chromatography analysis of cholesterol linoleato in oxidized low density lipoproteins: calibration by conjugated diene internal standard. **Methods in Enzymology**, v. 300, p. 43-50, 1999.

HATANAKA, E.; RIBEIRO, F.P.; CAMPA, A. The acute phase protein serum amyloid A primes neutrophils. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.38, 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.

HENSERSON, L. CHAPPEL, J. NADPH oxidase of neutrophils. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.15, p. 87-107, 1996.

ISOGAI, Y. et al. Superoxide production by cythchrome b558 purified from neutrophils in a reconstituted system with an exogenous reductase. The **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p.13481-13484, 1991.

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

JANISZEWSKI, M., et al., Inhibition of vascular NADH/NADPH oxidase activity by thiol reagents: lack of correlation with cellular glutathione redox status. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, p. 889-99, 2000.

JANISZEWSKI, M. et al. Protein disulfide isomerase acts as a novel regulatory subunit of vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase. **J Biol Chem.**, v. 280, p. 40813-40819, 2005.

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

KHAN, A.U., WILSON, T. Reactive oxygen species as cellular messengers. **Chemistry & Biology**, v. 2, p. 437-445, 1995.

KITAOKA, N., et al. Effect of sulfur amino acids on stimulus-induced superoxide generation and translocation of p47<sup>phox</sup> and p67<sup>phox</sup> to cell membrane in human neutrophils and the scavenging of free radical. **Clinica Chimica Acta**, v. 353, p.109-116, 2005.

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

KOBAYASHI, T. et al. Identification of intracellular sites of superoxide production in stimulated neutrophils. **Journal of Cell Science**, v. 111, p. 81-91, 1998.

KOJDA, G.; HARRISON, D. Interactions between NO and reactive species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. **Cardiovascular Research**, v.43, p. 562-571, 1999.

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.

KRISHNA, M. C. et al. Modulation of streptonigrin cytotoxicity by nitroxide sod mimics. **Free Radical Biology & Medicine**, v.17, p. 379-388, 1994.

KROLL, C., LANGNER, A., BORCHERT, H. H. Nitroxide metabolism in the human keratinocyte cell line HaCaT. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 850-857, 1999.

LAIGNIER, E. P. et al. Thiyl Radicals Trapp Correlates with Macrophage Respiratory Burst Inhibition. In: V MEETING OF SOCIETY FOR FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE – SOUTH AMERICAN GROUP AND V INTERNATIONAL CONFERENCE ON PEROXYNITRITE AND REACTIVE NITROGEN SPECIES, 2007, Montevideo. **Anais**. Montevideo: V Meeting of Society for Free Radical Biology and Medicine – South American Group and V International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species – Book of Abstracts: Imprenta Gega s.r.l., v. único, p. 19-19, 2007.

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.

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

LOPES, L.R. et al. Phosphorylated p40<sup>PHOX</sup> as a negative regulator of NADPH oxidase. **Biochemistry**, v. 43, p. 3723-3730, 2004.

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

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

MOREL, I., et al. Repair of oxidized DNA by flavonoid myricetin. **Methods in Enzymology**, v. 335, p. 308-316, 2001.

MOVAT, H.Z. **The inflammatory reaction**. Elsevier. Amsterdam. p.203-229, 1985.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v.420, n.6917, p.846-852, 2002.

NIE, G., et al. Polyphenol protection of DNA against damage. **Methods in Enzymology**, v. 335, p. 232-244, 2001.

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.

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.

POMPELLA, A. et al. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1499-1503, 2003.

RABADJI, R. C. et al. Oscillation of reactive oxygen species released by activated neutrophils. **Journal of Biological Rhythms**, 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. **The Biochemical Journal.**, v. 269, n. 40, p. 25010-25015, 1994.

REMACLE, J. et al. Importance of various antioxidant enzymes for cell stability: confrontation between theoretical and experimental data. **The Biochemical Journal**, v. 286, p. 41, 1992.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Journal of Biosciences**, v. 21, p. 133-149, 2005.

RIBEIRO, A.C.G. Nitróxidos como reguladores do estado de fosforilação proteica associado a atividade do complexo NADPH oxidase de fagócitos. In: II Jornada de Iniciação Científica da UNIFAL-MG, 2009. **Anais da II Jornada de Iniciação Científica da UNIFAL-MG, 2009**.

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.

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

ROLLET-LABELLE, E. et al. Hydroxyl radical as a potential intracellular mediator of polymorph nuclear neutrophil apoptosis. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 24, 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**, v. 265, p. 1459-1462, 1992.

ROVER JUNIOR, L. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, p. 112-119, 2001.

RUBIN, E. et al. **Patologia: Bases Clinicopatológicas da Medicina**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SAMUNI, A. et al. Kinetics and Mechanism of Hydroxyl Radical and OH-Adduct Radical Reactions with Nitroxides and with Their Hydroxylamine's. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, p. 8719-8724, 2002.

SAMUNI, A.M., BARENHOLZ, Y., SAMUNI, A. Site-activity relationship of nitroxide radical's antioxidative effect. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 34, p. 117-185, 2003.

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

SEGAL, A.W. The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to other NOXs in plants, invertebrates, and mammals. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.40, p.604-618, 2008.

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.

THOMSON, R.G. Inflamação e reparação. In:**Patologia geral Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.144-250, 1983.

TIMONER, B.E. et al. Efeito do nitróxido Ac-Tempo sobre o burst respiratório e S-glutathionação de proteínas de macrófagos. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE ESTRESSE OXIDATIVO, 1, 2008, Alfenas. **CD-ROM**.

TRACEY, K.J. The inflammatory reflex. **Nature**, v.420, p.853-859, 2002.



TSUNAWAKI, S. et al. A novel cytosolic component, p 40<sup>phox</sup>, of respiratory burst oxidase associates with p67<sup>phox</sup> and is absent in patients with chronic granulomatous disease who lack p67<sup>phox</sup>. **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<sup>phox</sup> during phagocytosis. **J. Biol. Chem.**, v. 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 and 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.

WILKINSON, B., GILBERT H.F. Protein disulfide isomerase. **Biochim Biophys Acta**, v. 1699, p. 35-44, 2004.

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

YAN, S. 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.

ZAAR, J. H. **Bioestatistical analysis**. 3. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996.