

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
UNIFAL-MG**

TAYRA FERREIRA OLIVEIRA DE LIMA

**MODULAÇÃO DA MIELOPEROXIDASE E ELASTASE DE NEUTRÓFILOS PELA
AMINOGUANIDINA**

Alfenas/MG

2016

TAYRA FERREIRA OLIVEIRA DE LIMA

**MODULAÇÃO DA MIELOPEROXIDASE E ELASTASE DE NEUTRÓFILOS PELA
AMINO Guanidina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.
Orientadora: Profa. Dra. Maria Rita Rodrigues

Alfenas/MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Lima, Tayra Ferreira Oliveira.

Modulação da mieloperoxidase e elastase de neutrófilos pela aminoguanidina. / Tayra Ferreira Oliveira Lima. – Alfenas - MG, 2016.
58 f.

Orientadora: Maria Rita Rodrigues.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade
Federal de Alfenas, 2016.
Bibliografia.

1. Degranulação Celular. 2. Peroxidase. 3. Elastase de Leucócito.
4. Neutrófilos. I. Rodrigues, Maria Rita. II. Título.

CDD-615.1


TAYRA FERREIRA OLIVEIRA DE LIMA

MODULAÇÃO DA MIELOPEROXIDASE E ELASTASE DE NEUTRÓFILOS PELA
AMINO Guanidina


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

Aprovada em: 16 de fevereiro de 2016.


Prof. Dr.^a: Maria Rita Rodrigues
Instituição: Universidade Federal de Alfenas -
UNIFAL- MG

Assinatura: 

Prof. Dr.: Iguatemy Lourenço Brunetti
Instituição: Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho" - UNESP

Assinatura: 

Prof. Dr.^a: Fernanda Borges de Araújo Paula
Instituição: Universidade Federal de Alfenas -
UNIFAL- MG

Assinatura: 

A todos que acreditaram em mim e
contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por estar sempre presente em minha vida e me dar forças para concluir essa etapa.

À minha querida orientadora Maria Rita Rodrigues, pela orientação, ensinamentos, paciência, companheirismo e por confiar a mim este trabalho.

À minha amiga Cláudia, que esteve ao meu lado em todos os dias e me fez crescer profissionalmente. Seu companheirismo, inteligência e paciência foram essenciais para que eu pudesse concluir essa etapa.

À minha mãe e avó Enéas que são meu alicerce e sem elas nada seria possível, agradeço pelo amor, apoio, confiança e motivação incondicional. E ao meu irmão Tiago pelo carinho e incentivo.

Ao meu namorado Gabriel pelo amor, carinho, apoio, paciência e por me fazer sempre acreditar que o melhor estava por vir.

À professora Marília Gabriella Alves G. Pereira e ao professor Tomaz Henrique Araújo pelos ensinamentos.

Aos meus familiares e amigos pelo carinho e incentivo de sempre.

As minhas amigas Cristina, Mayara e Giorgia pelo companheirismo, paciência e pelo conforto nas horas difíceis.

Ao André, Gabriel, George, Cleiber e Bruno pela amizade e ajuda com os experimentos.

À Eliane pela amizade, apoio e otimismo nos dias de experimentos.

À Romilda, Lucinda e Márcia pela amizade e por estarem a disposição quando precisei.

À Fabiana, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela disposição e paciência.

À Universidade Federal de Alfenas, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo crescimento pessoal e profissional.

À CAPES pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

Os neutrófilos representam a primeira linha de defesa do organismo contra microrganismos invasores, células infectadas com vírus e células tumorais. Em seres humanos saudáveis eles constituem a população de células brancas mais abundantes do sangue. O reconhecimento de componentes microbianos por neutrófilos desencadeia a fagocitose, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e liberação de proteínas granulares, tais como mieloperoxidase (MPO) e elastase (NE). Essas EROs e enzimas agem como agentes microbicidas e contribuem para os processos inflamatórios. Em trabalho anterior constatamos um aumento da atividade do sistema NADPH oxidase fagocítico (NOX2) e da geração de EROs por neutrófilos de ratos diabéticos e não diabéticos tratados com aminoguanidina (AG), um conhecido inibidor da formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), que culminou num aumento da atividade microbicida destas células. Nosso objetivo é elucidar o mecanismo de ação pelo qual a AG está atuando no nosso modelo. Desta forma, neste trabalho, avaliamos a hipótese que a AG estaria estimulando a degranulação de neutrófilos, portanto, estudamos a modulação da MPO e da NE, principais enzimas presentes nos grânulos azurófilos de neutrófilos. Para isso, utilizamos neutrófilos humanos isolados a partir de sangue periférico colhido por punção venosa de voluntários saudáveis. Os neutrófilos foram incubados ou não com AG 0,5 mM por um período de 18 horas em estufa de cultivo celular. A atividade de MPO foi avaliada através da formação de HOCl e através de quimiluminescência amplificada por luminol. A atividade de NE foi avaliada através da formação do produto da reação *p*-nitroanilida, por espectrofotometria. Avaliamos também a expressão da MPO e NE por *Western blotting* e imunomarcagem. Como controle das reações foi utilizado inibidor de MPO (azida) e de NE (inibidor de tripsina de glycine max (soybean) - (STI)). O isolamento de neutrófilos permitiu obter uma população celular com mais de 95% de neutrófilos, com viabilidade superior a 99%. Nossos resultados mostraram que a AG não foi capaz de influenciar a atividade de cloração e basal da MPO, porém, observamos um aumento de ERO pelo tratamento com a AG após estímulo. Vimos também que a atividade de NE permaneceu inalterada pelo tratamento com a AG. Além disso, a AG não interferiu na expressão e distribuição da MPO e NE. Estes resultados em conjunto nos levam a sugerir que a AG não influencia diretamente no processo de degranulação de neutrófilos, uma vez que este processo é um mecanismo utilizado por fagócitos com o propósito de criar um ambiente totalmente hostil para patógenos invasores. Aparentemente, o aumento da atividade microbicida de neutrófilos tratados com AG, não é via NE ou MPO na atividade clássica desta enzima, ou seja, na produção de HOCl. Entretanto, vimos uma resposta importante na atividade de MPO, que nos permite propor várias atividades para esta enzima, ora como uma atividade oxidativa que pode contribuir para o *killing*, ora como uma atividade antioxidante e desta forma pode proteger outras proteínas granulares antimicrobianas dos danos oxidativos.

Palavras-chave: Degranulação. Mieloperoxidase. Elastase. Aminoguanidina. Neutrófilos.

ABSTRACT

Neutrophils represent the organism's first line of defense against invading microorganisms, infected cells with viruses and tumor cells. In healthy humans, they constitute the most abundant population of white blood cells. The recognition of microbial components by neutrophils initiate phagocytosis, generation of reactive oxygen species (ROS) and release of granular proteins, such as myeloperoxidase (MPO) and elastase (NE). These ROS and enzymes act as microbicidal agents and contribute to the inflammatory processes. In a previous study, we found an increase in phagocyte NADPH oxidase system activity (NOX2) and generation of ROS by neutrophils of diabetic rats and non-diabetics treated with aminoguanidine (AG), a known inhibitor of the formation of advanced glycation end products (AGEs), which resulted in an increased microbicidal activity of these cells. Our aim is to elucidate the mechanism of action by which AG is acting in our model. This way, this study evaluated the hypothesis that AG would be stimulating degranulation of neutrophils, therefore, we studied the modulation of MPO and NE, the main enzymes present in azurophilic granules of neutrophils. For this, we used human neutrophils isolated from peripheral blood collected by venipuncture from healthy volunteers. Neutrophils were incubated or not with AG 0,5 mM for a 18 hour period in cell culture incubator. MPO activity was evaluated through the formation of HOCl and luminol-amplified chemiluminescence. NE activity was evaluated through the formation of the product of p-nitroanilide reaction, by spectrophotometry. We also evaluated the expression of MPO and NE by western blotting and immunostaining. As control of reactions was used inhibitor of MPO (azide) and of NE (trypsin inhibitor from Glycine max (soybean) - (STI)). The neutrophil isolation allowed the achievement of a cell population with over 95% of neutrophils, with viability greater than 99%. Our results showed that AG was not capable of influencing the chlorination and basal activity of MPO, however, an increase of ROS by the treatment with AG after stimulation was noted. We also noted that NE activity remained unaltered by the treatment with AG. In addition, AG did not affect expression and distribution of MPO and NE. These results together lead us to suggest that AG does not influence directly the process of neutrophils degranulation, as this process is a mechanism used by phagocytes in order to create a fully hostile environment for invading pathogens. Apparently, the increase of microbicidal activity of neutrophils treated with AG is not via NE or MPO in the classical activity of this enzyme, in other words, in the production of HOCl. However, we observed a significant response in MPO activity, allowing us to propose various activities for this enzyme, either as a oxidative activity that can contribute to the killing or as an antioxidant activity, and therefore may protect other antimicrobial granular proteins from oxidative damage.

Keywords: Degranulation. Myeloperoxidase. Elastase. Aminoguanidine. Neutrophils.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 1 - | Reações catalisadas pela MPO no fagossomo de neutrófilos..... | 15 |
| Figura 2 - | Sistema antimicrobiano mediado pela MPO..... | 16 |
| Figura 3 - | Diferentes ciclos catalíticos de MPO..... | 17 |
| Figura 4 - | Função antimicrobiana da NE..... | 19 |
| Figura 5 - | Estrutura molecular da aminoguanidina..... | 21 |
| Figura 6 - | População de células após o isolamento de neutrófilos..... | 31 |
| Figura 7 - | Ensaio de citotoxicidade da AG em neutrófilos humanos..... | 32 |
| Figura 8 - | Efeito do tratamento com a AG (0,5 mM) sobre a produção de HOCl por neutrófilos estimulados com PMA..... | 33 |
| Figura 9 - | Efeito do tratamento com a AG (0,5 mM) sobre a produção de HOCl por neutrófilos estimulados com ZO..... | 34 |
| Figura 10 - | Efeito do tratamento com a AG (0,5 mM) sobre a cinética de produção de HOCl por neutrófilos estimulados com PMA..... | 35 |
| Figura 11 - | Efeito do tratamento com a AG (0,5 mM) sobre a cinética de produção de HOCl por neutrófilos estimulados com ZO..... | 36 |
| Figura 12 - | Efeito do tratamento com a AG (0,5 mM) sobre a atividade de MPO sem estímulo de neutrófilos..... | 38 |
| Figura 13 - | Efeito do tratamento com a AG (0,5 mM) sobre a atividade de MPO de neutrófilos estimulados com PMA..... | 39 |
| Figura 14 - | Efeito do tratamento com a AG (0,5 mM) sobre a atividade de MPO de neutrófilos estimulados com ZO..... | 40 |
| Figura 15 - | Efeito do tratamento com a AG (0,5 mM) sobre a atividade da elastase em neutrófilos..... | 44 |
| Figura 16 - | Western blot para avaliar a expressão de MPO em grupo controle e grupo tratado com AG (0,5 mM)..... | 46 |
| Figura 17 - | Western blot para avaliar a expressão de NE em grupo controle e grupo tratado com AG (0,5 mM)..... | 47 |
| Figura 18 - | Microscopia confocal para avaliar a expressão e a distribuição de MPO em grupo controle e grupo tratado com AG (0,5 mM)..... | 49 |
| Figura 19 - | Microscopia confocal para avaliar a expressão e a distribuição de NE em grupo controle e grupo tratado com AG (0,5 mM)..... | 50 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------------------------|--|
| ·OH | radical hidroxila |
| ¹O₂ | oxigênio singlete |
| AG | aminoguanidina |
| AGEs | produtos finais de glicação avançada |
| DTNB | 5,5'-ditiobis ácido 2-nitrobenzoico |
| EROs | espécies reativas de oxigênio |
| GPx | glutathione peroxidase |
| GSH | glutathione reduzida |
| GStase | glutathione S transferase |
| H₂O₂ | peróxido de hidrogênio |
| HOCl | ácido hipocloroso |
| iNOS | óxido nítrico sintase induzida |
| MGG | May Grunwald e Giemsa |
| MPO | mieloperoxidase |
| NE | elastase |
| NETs | armadilhas extracelulares de neutrófilos |
| n-fMLP | N-formil-metionil-leucil-fenilalanina |
| NOX2 | sistema NADPH oxidase fagocítico |
| O₂⁻ | ânion superóxido |
| PKC | proteína quinase C |
| PMA | forbol-12-miristato-13-acetato |
| SAAVpNA | N-succinil-Ala-Ala-Val <i>p</i> -nitroanilida, substrato da elastase de neutrófilo |
| SOD | superóxido dismutase |
| STI | inibidor de tripsina de glycine max (soybean) |
| TNB | ácido 5-tio-2-nitrobenzoico |
| ZO | zimosan opsonizado |

SUMÁRIO

| | | |
|------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 2 | REVISÃO DA LITERATURA..... | 12 |
| 2.1 | Inflamação, fagocitose e degranulação..... | 12 |
| 2.2 | Mieloperoxidase..... | 13 |
| 2.3 | Elastase..... | 17 |
| 2.4 | Aminoguanidina..... | 20 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 23 |
| 3.1 | Objetivo geral..... | 23 |
| 3.2 | Objetivos específicos..... | 23 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 24 |
| 4.1 | Isolamento de neutrófilos de sangue periférico..... | 24 |
| 4.2 | Contagem das células e avaliação da viabilidade celular..... | 24 |
| 4.3 | Avaliação da citotoxicidade..... | 25 |
| 4.4 | Cultivo celular..... | 25 |
| 4.5 | Atividade de MPO (HOCl)..... | 25 |
| 4.6 | Atividade de MPO sem estímulo por quimiluminescência amplificada por luminol utilizando homogenato celular..... | 26 |
| 4.7 | Atividade de MPO após estímulo por quimiluminescência amplificada por luminol..... | 26 |
| 4.8 | Atividade Elastase..... | 27 |
| 4.9 | <i>Western blotting</i> | 27 |
| 4.10 | Preparo das Lâminas Silanizadas para Microscopia..... | 29 |
| 4.11 | Marcação da MPO e NE por imunofluorescência..... | 30 |
| 4.12 | Análise estatística..... | 30 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 31 |
| 5.1 | Obtenção de neutrófilos..... | 31 |
| 5.2 | Avaliação da citotoxicidade da AG sobre neutrófilos..... | 31 |
| 5.3 | Atividade de MPO..... | 32 |
| 5.4 | Atividade Elastase..... | 43 |
| 5.5 | <i>Western blotting</i> | 45 |
| 5.6 | Conteúdo e distribuição da MPO e NE..... | 48 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 51 |
| | REFERÊNCIAS..... | 52 |

1 INTRODUÇÃO

Os neutrófilos foram originalmente considerados como células "kamikaze", auto destruindo-se rapidamente quando ativados. No entanto, sabe-se hoje que os neutrófilos podem viver por várias horas após a ativação, e contribuem para regulação da inflamação, liberando citocinas e outros mediadores inflamatórios (MANTOVANI et al., 2011). Estas células representam a primeira linha de defesa do organismo contra microrganismos invasores, células infectadas com vírus e células tumorais. Em seres humanos saudáveis eles constituem 40-60% da população de células brancas do sangue. O reconhecimento de componentes microbianos por neutrófilos desencadeia a fagocitose, ativação do sistema NADPH oxidase fagocítico (NOX2), geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e liberação de proteínas granulares, tais como mieloperoxidase (MPO) e elastase (NE). Essas EROs e enzimas agem como agentes microbicidas e contribuem para os processos inflamatórios (KABEYA et al., 2013a).

Os neutrófilos transportam com segurança uma grande quantidade de substâncias potencialmente perigosas através da corrente sanguínea, e em seguida, as liberam precisamente no momento e local apropriado, por isso possuem uma organela de armazenamento especializada, o grânulo. Os grânulos são participantes ativos e indispensáveis em quase todas as atividades de neutrófilos durante a inflamação. Dentre eles, encontram-se os grânulos azurófilos (também conhecidos como grânulos primários) são os maiores e os primeiros formados durante a maturação dos neutrófilos. Eles contêm a MPO, NE, dentre outras biomoléculas. Existem também os grânulos secundários, conhecidos como grânulos específicos; grânulos terciários ou gelatinases; e vesículas secretoras. Estes grânulos são cheios de compostos antimicrobianos e funcionam como o principal depósito para o armamento molecular de neutrófilos (AMULIC et al., 2012).

A ativação completa do neutrófilo acontece no local da inflamação, levando a iniciação do *burst* oxidativo e mobilização dos grânulos azurófilos e específicos. Esses grânulos fundem-se com o fagossomo, contribuindo para as atividades antimicrobianas desse compartimento, ou se fundem com a membrana plasmática, liberando seus potentes agentes antimicrobianos para o tecido. A fusão dos grânulos específicos com a membrana do plasma ou fagossomal possui importância singular para o *burst* oxidativo, uma vez que o flavocitocromo b558, um componente da NOX2, encontra-se na membrana do grânulo específico. Essa fusão permite a montagem da NOX2 e permite a produção de EROs tanto no

interior do fagolisossomo como fora da célula. A degranulação de grânulos primários e secundários contribui para a criação de um ambiente antimicrobiano, no local da inflamação e produz um ambiente não habitável para patógenos invasores (AMULIC et al., 2012).

A aminoguanidina (AG), uma molécula pequena, inibe a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs). Os AGEs apresentam uma diversidade de compostos formados à partir de interações entre açúcares redutores ou lipídeos oxidados e proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucleicos (ENGELLEN; STEHOUWER; SCHALKWIJK, 2013). Deve-se ressaltar que, durante algumas das reações que levam à formação dos AGEs, são geradas EROs, concorrendo paralelamente com o estresse oxidativo e com os danos estruturais e funcionais às macromoléculas (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008). *In vivo*, a formação destes produtos poderia envolver neutrófilos, monócitos e macrófagos, os quais, após estímulo inflamatório, liberam MPO e ativam NOX2, que induzem a formação de AGEs por meio de oxidação de aminoácidos (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008).

Em trabalho anterior desenvolvido pelo laboratório, avaliamos a influência dos AGEs sobre o sistema NOX2 de ratos Wistar. Para isso, comparamos propriedades dos neutrófilos de animais diabéticos tratados ou não com AG. Constatamos um aumento da atividade da NOX2 e na geração de EROs nos neutrófilos de ratos diabéticos, culminando com aumento de fagocitose e *killing ex vivo* de *Candida albicans*, os quais ainda não estavam descritos na literatura. Inicialmente, atribuímos esse efeito à diminuição da formação de AGEs, entretanto, experimentos adicionais demonstraram o mesmo efeito da AG em ratos não diabéticos, onde a formação de AGEs é menor (FERREIRA et al., 2016).

Uma vez que a via de sinalização que gera maior atividade e/ou aumento de NOX2 pela AG ainda não foi elucidada (FERREIRA et al., dados da tese em andamento), uma das hipóteses prováveis para explicar o aumento da capacidade microbicida destas células seria que a AG estaria influenciando o processo de degranulação neutrofílica. Diante do exposto, este trabalho estuda o envolvimento de duas importantes enzimas presentes nos grânulos azurófilos de neutrófilos, MPO e NE em neutrófilos tratados com a AG.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Para melhor compreensão do trabalho segue o referencial teórico.

2.1 Inflamação, fagocitose e degranulação

A inflamação é a primeira resposta do sistema imunológico a um dano tecidual, sendo constituída por um processo biológico complexo que envolve componentes vasculares, celulares e uma diversidade de biomoléculas. A finalidade do processo inflamatório é remover o estímulo lesivo e iniciar a recuperação tecidual local (MESQUITA JR et al., 2008).

Os leucócitos são as principais células sanguíneas envolvidas na resposta inflamatória, embora plaquetas e eritrócitos também participem. A diapedese, migração de células circulantes para os tecidos, é direcionada pela presença de moléculas quimiotáticas no sítio inflamatório. Na inflamação aguda as principais células são os neutrófilos e os macrófagos. A permanência do agente lesivo leva à cronificação do processo inflamatório apresentando células mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos) (MESQUITA JR et al., 2008; FRANCISCHETTI et al., 2010).

Dentre os mediadores da resposta inflamatória encontram-se: aminas vasoativas, metabólitos do ácido aracdônico, proteínas plasmáticas, fator de ativação das plaquetas, citocinas, óxido nítrico, componentes lisossômicos dos leucócitos e EROs (FRANCISCHETTI et al., 2010).

Os neutrófilos são as principais células do sistema imune para combater agentes patogênicos em organismos. Possuem a capacidade de serem recrutados para os locais de infecção e então realizarem suas funções, eles reconhecem e fagocitam patógenos; e através da combinação de mecanismos citotóxicos os matam (MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2014). Eles não dependem de um único mecanismo para combater a diversidade de patógenos que encontram, essa ação está relacionada com a produção de EROs, degranulação e as armadilhas extracelulares de netrófilos (NETs) (WINTERBOURN; KETTLE, 2013).

O processo pelo qual os neutrófilos matam os agentes patogênicos invasores depende de três mecanismos primários: a) fagocitose mediada por receptores do agente patogênico para um vacúolo no interior da célula; b) produção de ERO altamente tóxicas no vacúolo

contendo o agente patogênico; e c) fusão do vacúolo com os grânulos de neutrófilos, contendo vários mediadores antimicrobianos (MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2014).

A fagocitose é estimulada por receptores nos neutrófilos, que reconhecem os padrões moleculares associados aos patógenos e presentes na superfície dos microrganismos, promovem o englobamento do agente patogênico para dentro de um vacúolo, denominado fagossomo. A absorção é seguida por fusão do vacúolo fagocítico com grânulos pré-formados no interior da célula, para formar o fagossomo num processo referido como maturação fagossomal. Esses grânulos contêm enzimas hidrolíticas e subunidades da NOX2, que estabelecem mecanismos microbicidas (MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2014). A ativação de NOX2 gera ERO por um processo denominado “*burst*” oxidativo, acarretando a produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). O $O_2^{\cdot-}$ tem pouca atividade microbicida, entretanto, origina EROs mais potentes, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), radical hidroxila ($\cdot OH$) e oxigênio singlete (1O_2), que podem ser devastadores para microrganismos invasores (BOGDAN et al., 2000; BABIOR, 2002; BEDARD; KRAUSE, 2007).

Os neutrófilos contêm, pelo menos, quatro tipos diferentes de grânulos: grânulos primários, também conhecidos como grânulos azurófilos; grânulos secundários, também conhecidos como grânulos específicos; grânulos terciários ou gelatinases; e vesículas secretoras. Os grânulos azurófilos são os maiores medindo cerca de 0,3 μm de diâmetro e são os primeiros formados durante a maturação dos neutrófilos. Eles são os principais locais de armazenamento dos mediadores mais tóxicos, incluindo a MPO, NE, catepsinas e defensinas (LACY, 2006; AMULIC et al., 2012). Na dinâmica de ativação neutrofilica os grânulos são mobilizados e fundidos quer com a membrana plasmática ou com o fagossomo, libertando seu conteúdo para o respectivo compartimento (AMULIC et al., 2012).

2.2 Mieloperoxidase

A MPO é uma heme proteína, compreendendo cerca de 5% do total de proteínas de neutrófilos, sendo a principal proteína de grânulos azurófilos (DRESCHER; BAI, 2013; KLEBANOFF et al., 2013). Ela é liberada no fagossomo quando bactérias são fagocitadas e representam aproximadamente 25% das proteínas de neutrófilos neste vacúolo. É a única

enzima conhecida no fagossomo que reage com o $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 em velocidade significativa, e por conseguinte, determina a química redox fagossomal (WINTERBOURN; KETTLE, 2013).

A MPO é liberada em compartimentos fagossomais e no meio extracelular por neutrófilos, monócitos e alguns tipos de macrófagos teciduais (RAYNER; LOVE; HAWKINS, 2014).

A maioria dos constituintes dos grânulos azurófilos de neutrófilos encontra-se em estado inativo, onde os grânulos azurófilos permanecem em repouso. Esta condição ocorre devido a MPO e outras proteínas catiônicas estarem sequestradas por proteoglicanos carregados negativamente e em pH baixo dentro dos grânulos; a ausência de H_2O_2 também ocasiona aparentemente a inativação da MPO. Após a fagocitose os grânulos descarregam seus conteúdos no fagossomo formado, com a ativação da NOX2 e o influxo de íons no fagossomo as condições locais são alteradas consideravelmente e favorecem a ativação da MPO e outros constituintes azurófilos (ARNHOLD; FLEMMIG, 2010).

Os oxidantes gerados pela MPO desempenham um papel fundamental na morte de células bacterianas e, assim, defendem o organismo contra a doença. O HOCl é o mais usualmente implicado como espécie reativa responsável pela morte celular bacteriana mediada por neutrófilo (RAYNER; LOVE; HAWKINS, 2014). A dismutação do $O_2^{\cdot-}$ origina H_2O_2 que então reage com a MPO para gerar HOCl e cloraminas, dismutação do $O_2^{\cdot-}$ ocorre espontaneamente ou através das reações catalisadas pela superóxido dismutase (SOD) ou pela MPO. Quando a MPO reage com o H_2O_2 converte a enzima para um radical catiônico chamado composto I e este quando reage com o cloreto forma o HOCl e a enzima volta na sua forma férrica nativa (FIGURA 1; Reações 1 e 2) (KLEBANOFF et al., 2013; WINTERBOURN; KETTLE, 2013).

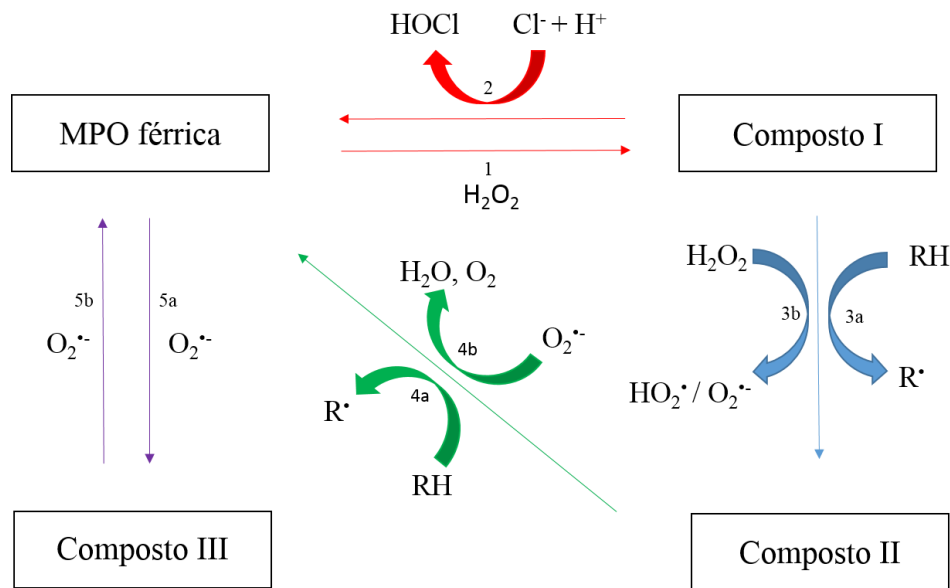


Figura 1 - Reações catalisadas pela MPO no fagossomo de neutrófilos.

Fonte: Do Autor.

A Figura 2 mostra o sistema antimicrobiano mediado pela MPO de neutrófilos, onde o contato com uma partícula fagocitada desencadeia a montagem da NOX2, que transfere elétrons do NADPH citoplasmático (cinza) ao oxigênio molecular dissolvido no fagossomo (azul) gerando o O₂•⁻. Um canal de prótons permite simultaneamente a transferência de H⁺ para equilibrar as cargas e fornecer prótons para as reações seguintes. Os grânulos (verde) contendo MPO fundem com o fagossomo e liberam seus conteúdos. A MPO reage com o H₂O₂, gerado pela dismutação do O₂•⁻. O cloreto está disponível para o fagossomo devido uma combinação de pinocitose durante a fagocitose e o transporte por meio de canais de cloro. A MPO então catalisa a oxidação para formar HOCL, o qual reage com a bactéria (amarelo) ou com as proteínas de neutrófilos para produzir cloraminas citotóxicas (KLEBANOFF et al., 2013).

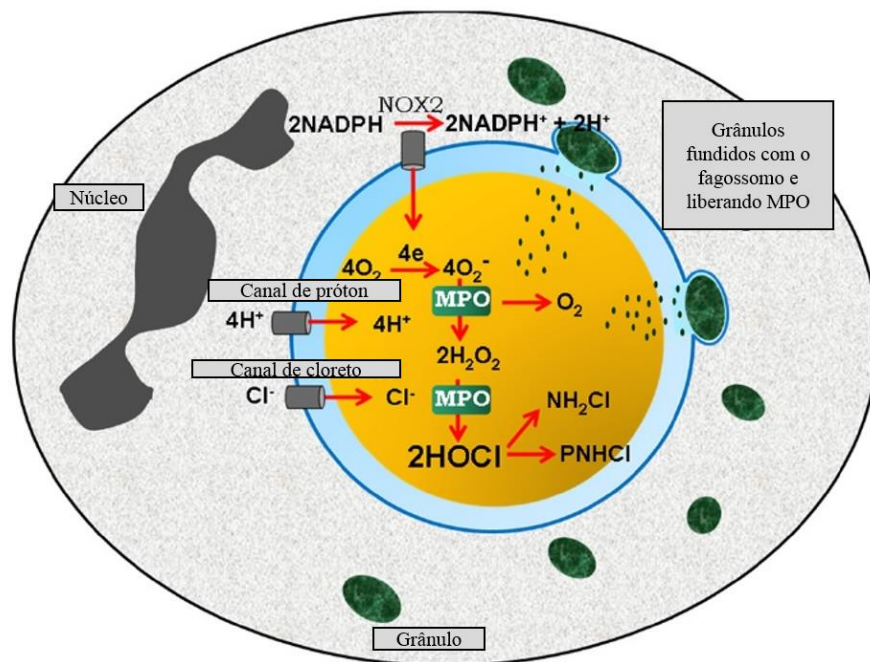


Figura 2 - Sistema antimicrobiano mediado pela MPO.
 Fonte: Adaptado de KLEBANOFF et al., 2013.

Embora não exista dúvida de que o HOCl produzido pela MPO é essencial para a morte microbiana e inativação viral, esta espécie reativa também tem sido implicada como mediadora de danos oxidativos dos tecidos e disfunção celular. Realmente, existe uma grande diversidade de espécies oxidativas dependente de MPO no meio extracelular, em comparação com o ambiente intracelular fagossomal, devido à disponibilidade de substratos mais limitados no último caso (RAYNER; LOVE; HAWKINS, 2014).

Além da formação de HOCl, a MPO é capaz de entrar em ciclo peroxidásico, que envolve a ação de outra forma da MPO, o composto II. Nessa reação a MPO férrica reage com o H_2O_2 formando o composto I, que então é reduzido em passo de um elétron ao composto II que oxida vários substratos aos seus radicais correspondentes (FIGURA 1; Reações 1, 3a e 3b). Para que o ciclo seja completo, o composto II também reage com substratos formando seus radicais correspondentes, em passo de um elétron, levando a enzima ao seu estado férrico (FIGURA 1; Reações 4a e 4b) (OKADA, 2010; KLEBANOFF et al., 2013; WINTERBOURN; KETTLE, 2013).

A MPO pode ainda ser convertida a composto III pela ação de O_2^- . A concentração de MPO e O_2^- estão elevadas e duas reações catalisadas pela MPO são prováveis. A MPO férrica reage com o O_2^- formando o composto III, que então reage com o O_2^- e a enzima volta ao estado férrico (FIGURA 1; Reações 5a e 5b). Além disso, o O_2^- pode também reagir com o

composto II reciclando a enzima para sua forma nativa (FIGURA 1; Reação 4b) (OKADA, 2010; KLEBANOFF et al., 2013).

Sendo assim, as reações mais favoráveis catalisadas pela MPO no fagossomo devem ser a dismutação de $O_2^{\cdot-}$ e a reação com H_2O_2 produzindo HOCl (KLEBANOFF et al., 2013).

A MPO é uma enzima intrigante, porque tem várias atividades e vários substratos. Enquanto normalmente observada como uma enzima pró-oxidante que catalisa a produção de ácido hipocloroso e radicais livres, também consome o $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 através de três ciclos enzimáticos diferentes que correspondem as atividades antioxidantes (atividade de catalase, superoxidase e superóxido dismutase) (FIGURA 3) (WINTERBOURN; KETTLE, 2013).

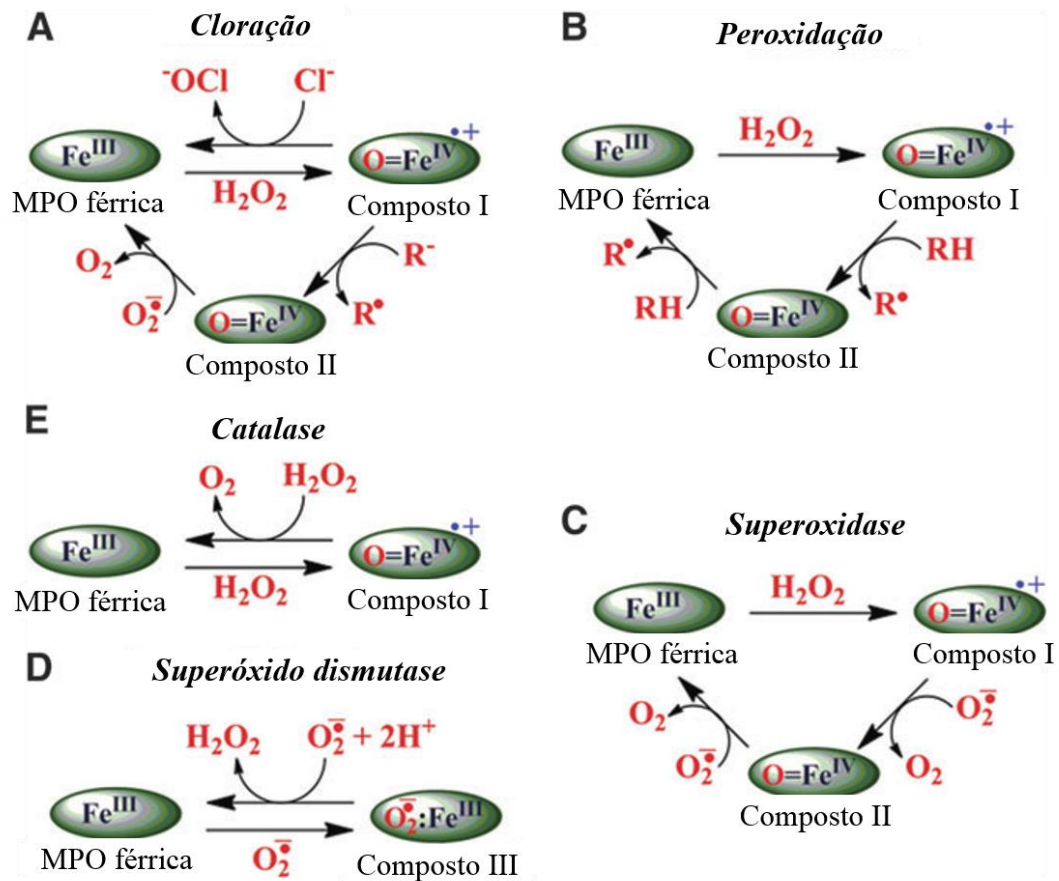


Figura 3 - Diferentes ciclos catalíticos de MPO.

Nota: (A) Atividade de cloração (B) Atividade de peroxidação (C) Atividade de superoxidase (D) Atividade de superóxido dismutase (E) Atividade de catalase.

Fonte: Adaptado de WINTERBOURN; KETTLE, 2013.

2.3 Elastase

A NE é uma serino-protease que é armazenada em grânulos azurófilos de neutrófilos. As principais classes de proteases, enzimas proteolíticas que catalisam a quebra de proteínas em peptídeos menores e aminoácidos, são diferenciadas com base nos resíduos específicos envolvidos na catálise. NE possui como sítio catalítico His-Asp-Ser, este arranjo de aminoácidos no sítio ativo, presumivelmente, permite o ataque nucleofílico pela Ser no carbono da carbonila (C=O) dos substratos, portanto, desencadeando o processo de catálise. As proteases são importantes em muitos aspectos para a saúde humana e para biotecnologia (KORKMAZ et al., 2010).

A NE participa da via intracelular não oxidativa e destruição extracelular de patógenos. Ela é considerada uma enzima multifuncional envolvida na morte do agente patogênico e na regulação do processo inflamatório, e também está envolvida em uma variedade de doenças inflamatórias como na doença pulmonar obstrutiva crônica e fibrose cística (KORKMAZ et al., 2010). NE apresenta uma larga gama de substratos e possui a capacidade de ser rapidamente liberada em elevadas concentrações, a partir de grânulos de neutrófilos nos locais de inflamação (ALAM; NEWBY; HENRIKSEN, 2012).

A NE participa de morte intracelular direta de bactérias fagocitadas em combinação com a MPO e EROs. Além da morte intracelular, a morte extracelular pode ocorrer através de NETs, onde as serino-proteases de neutrófilos associadas aos NETs participam da morte do patógeno extracelularmente através da degradação dos fatores de virulência da bactéria (KORKMAZ et al., 2010). Além disso, a própria NE pode atenuar a virulência bacteriana por inativação de fatores necessários para a patogênese (FIGURA 4A) (STAPELS; GEISBRECHT; ROOIJAKKERS, 2015).

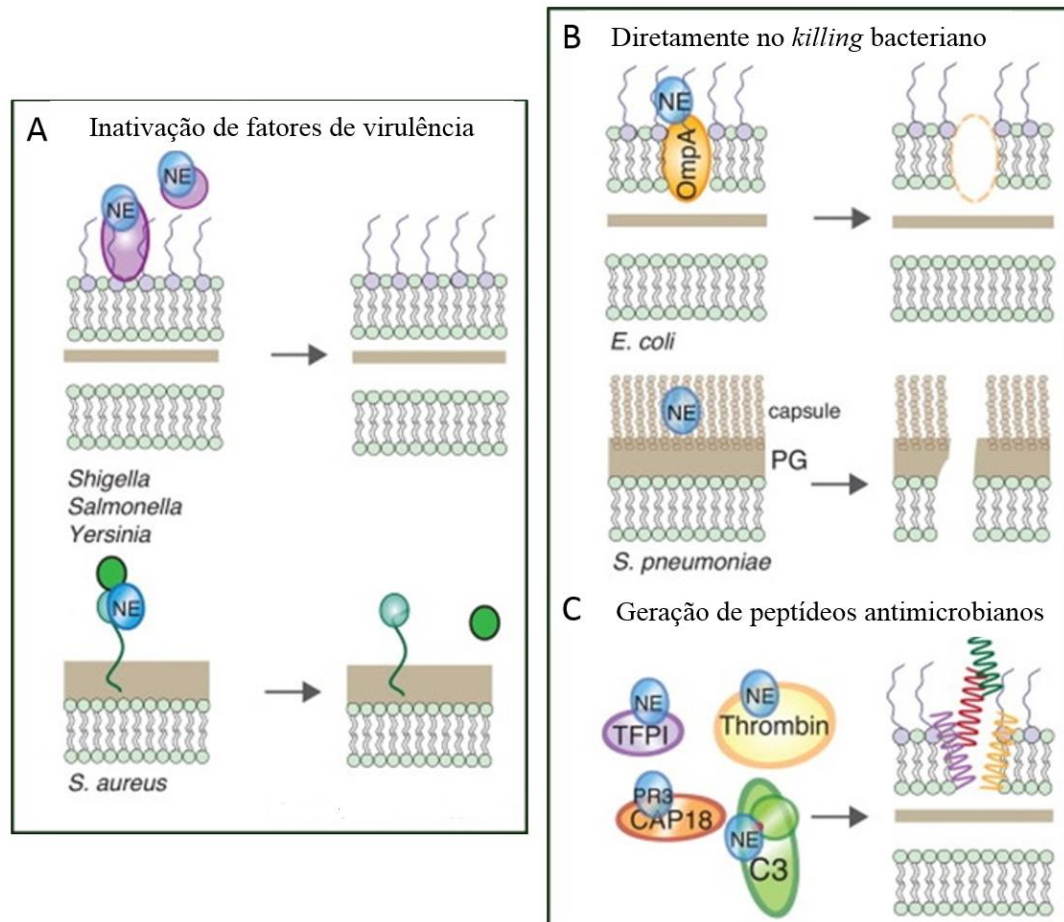


Figura 4 - Função antimicrobiana da NE.

Nota: (A) Inativação de fatores de virulência (B) Diretamente no *killing* bacteriano (C) Geração de peptídeos antimicrobianos.

Fonte: Adaptado de STAPELS; GEISBRECHT; ROOIJAKKERS, 2015.

NE tem ação antimicrobiana direta contra algumas bactérias gram-negativas tais como *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, através da degradação da proteína A da membrana externa da bactéria (OmpA), resultando em perda da integridade da membrana e morte celular (FIGURA 4B). Também possui atividade direta antifúngica contra *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* (ALAM; NEWBY; HENRIKSEN, 2012; STAPELS; GEISBRECHT; ROOIJAKKERS, 2015).

NE intracelular quebra as proteínas do patógeno, enquanto a NE extracelular principalmente as ligadas à membrana plasmática de neutrófilos são liberadas, auxiliando na sua migração para sítios de inflamação por várias proteínas do hospedeiro, tais como a degradação de proteínas da matriz extracelular (FENG et al., 2013). E ainda, mais indiretamente, a NE pode clivar as proteínas do hospedeiro para gerar peptídeos antimicrobianos que contribuem para a morte do patógeno (FIGURA 4C) (STAPELS; GEISBRECHT; ROOIJAKKERS, 2015).

Em condições fisiológicas normais a NE é controlada pelos seus inibidores endógenos, como α_1 -antitripsina, inibidor de protease secretória de leucócitos, α_2 -macroglobulina e elafina. Porém, esses inibidores endógenos podem ser inativados devido a grandes quantidades de EROs e proteases liberadas pelos leucócitos recrutados para os sítios de inflamação. Além disso, a forte ligação da NE extracelular na membrana de neutrófilos pode diminuir os inibidores endógenos circulantes. Portanto, um desequilíbrio entre NE e seus inibidores endógenos podem estimular desordens inflamatórias (FENG et al., 2013).

Catelicidinas são peptídeos antimicrobianos que são armazenadas e liberadas dos lisossomos dos neutrófilos, NE e a proteinase 3 regulam a atividade das catelicidinas. Assim, elastase derivada de neutrófilos pode afetar a morte microbiana por mecanismos diretos e indiretos. Estas enzimas (NE e proteinase 3) também degradam os componentes da matriz extracelular, e a lista de substratos para a NE é extensa incluindo fibrina, fibronectina, colágeno, receptor da glicoproteína IIb / IIIa, elastina e as caderinas (ALAM; NEWBY; HENRIKSEN, 2012).

2.4 Aminoguanidina

A AG, também conhecida como pimagedina (FIGURA 5), foi a primeira droga testada com o propósito de inibir as reações que levam à formação de AGEs, sendo seguido pela piridoxamina e alagebrium, drogas que atuam nos AGEs já formados (GOH; COOPER, 2008). Os AGEs apresentam uma diversidade de compostos formados à partir de interações entre açúcares redutores ou lipídeos oxidados e proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucleicos. (ENGELN; STEHOUWER; SCHALKWIJK, 2013).

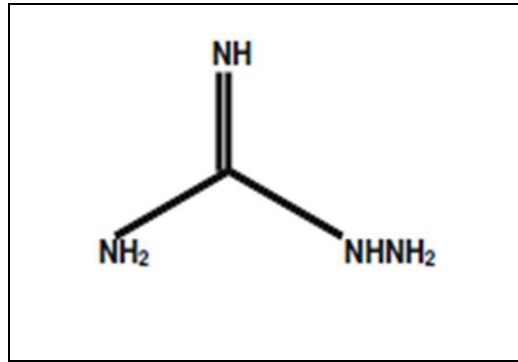


Figura 5 - Estrutura molecular da aminoguanidina.
Fonte: SLIMAN et al. (2010, p.10).

Várias drogas já incorporadas ao arsenal terapêutico do dia a dia têm demonstrado atuar também na inibição da formação dos AGEs, como a metformina, os bloqueadores do receptor AT1 da angiotensina II e até alguns inibidores da enzima conversora de angiotensina, como o temocaprilat, quelantes de íons metálicos (desferroxamina e penicilamina), antioxidantes (vitamina C ou E) e o grupo agentes amino (aspirina) (GOH; COOPER, 2008).

Em modelos animais, um dos agentes mais notáveis usado para prevenir a formação de AGEs é a AG, que inibe tanto a formação de AGEs, e, em doses mais altas, também inibe a atividade da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (SLIMAN et al., 2010).

Em sistemas modelo, o mecanismo pelo qual a AG inibe a formação de AGEs demonstrou envolver a captura de compostos dicarbonílicos intermediários reativos formados a partir de rearranjos de oxidação de enediol de produtos de Amadori, tais como metilglioal, glioal, e 3-deoxiglicosona (GIARDINO et al., 1998; THORNALLEY, 2003).

Já foi descrito que a AG pode atuar como um antioxidante *in vivo*, extinguindo os radicais hidroxila e inibindo peroxidação lipídica em células e tecidos e impedindo oxidação induzida por apoptose (SLIMAN et al., 2010). Devido a sua atividade antioxidante a AG ajudou na recuperação bioquímica e histopatológica do pulmão em ratos com pneumonia aspirativa induzida por ácidos biliares (KARLI et al., 2012). Foi descrito ainda que a administração de AG em ratos diabéticos reduz AGEs e limita alterações estruturais e funcionais nos tecidos (GIARDINO, 1998; GOH; COOPER, 2008).

Numa linha contrária aos que mostram um efeito nefrotóxico da AG (PHILIS-TSIMIKAS et al., 1995; SKAMURAUSKAS; MCKAY; HUNT, 1996), estudos mais recentes, demonstraram que a AG, em ratos, atenuou o dano renal induzido por ciclofosfamida pela inibição do estresse oxidativo, além de impedir a peroxidação lipídica induzida pela ciclofosfamida, oxidação de proteínas, a depleção de glutathiona reduzida (GSH), e também impedir a perda das atividades das enzimas antioxidantes incluindo

glutathione peroxidase (GPx), catalase, e glutathione S transferase (GSTase) e ainda diminuir a atividade de MPO nos rins (ABRAHAM; RABI, 2011).

Du et al. (2013) demonstraram uma ação protetora da AG em neurônios da retina de camundongos com retinopatia induzida por oxigênio pela inibição da apoptose. Ozturk et al. (2012), em estudo com ratos diabéticos, demonstraram o efeito protetor da AG sobre a sobrevivência de ratos diabéticos com feridas aleatórias dorsais. Luo et al. (2013), verificaram que AG aliviou significativamente o aumento da produção e aliviou o congestionamento de reperfusão do miocárdio. E Nico et al. (2013), mostram que a AG não é hepatotóxica, quando utilizada em dose de 1g/L para o tratamento de complicações decorrentes da diabetes, e confirmou que a associação da AG com a prática de exercício físico moderado ameniza os danos causados pela diabetes, sem a utilização de insulina.

3 OBJETIVOS

Segue abaixo os objetivos deste trabalho.

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi substanciar processos para elucidar o papel da aminoguanidina na degranulação de neutrófilos, em especial na modulação da mieloperoxidase e da elastase.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar se AG modula a atividade, a expressão e a distribuição da mieloperoxidase em neutrófilos;
- b) Avaliar se AG modula a atividade, a expressão e a distribuição da elastase em neutrófilos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Abaixo se encontra listada a metodologia utilizada neste trabalho.

4.1 Isolamento de neutrófilos de sangue periférico

Foi utilizado sangue periférico de 30 doadores aparentemente saudáveis. Como critérios de inclusão dos doadores foram considerados os seguintes parâmetros: aparência de boa saúde em geral e idades entre 20 e 40 anos que tenham assinado o TCLE. E os critérios de exclusão dos doadores foram: história de qualquer doença aguda ou crônica; uso recente de qualquer tipo de medicação; uso recente de álcool, drogas ou o tabagismo ativo. O procedimento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Humanos (CEP) parecer n° 774.106.

O sangue foi colhido em tubos plásticos citratados (3,2 mL), e posteriormente diluído na proporção 1:2 com PBS 10 mM estéril, pH 7,4. A solução diluída foi colocada sobre 5 mL de Histopaque-R (densidade: 10771). O material então foi centrifugado a 2500 rpm à temperatura ambiente por 20 minutos. Ao infranadante foram adicionados 20 mL de Dextrano 5%, diluído em PBS 10 mM estéril, pH 7,4, para sedimentação de eritrócitos. O material foi mantido em banho de gelo por 45 minutos, sendo o sobrenadante centrifugado a 1500 rpm à temperatura ambiente por 5 minutos.

Infranadante foi submetido à hemólise em 5 mL de água gelada com agitação constante por 1 minuto. A isotonicidade foi restabelecida com 5 mL de NaCl 2.7% e 15 mL de PBS 10 mM estéril, pH 7,4 (BOYUM, 1976). O material restante foi centrifugado em 1500 rpm à temperatura ambiente por 5 minutos, e o infranadante ressuspendido em 1 mL de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com L-glutamina 0,3 g/L, Hepes 2,32 g/L, bicarbonato de sódio 2,0 g/L, estreptomicina 100 µg/mL, penicilina 100 UI/mL e 10% soro fetal bovino.

4.2 Contagem das células e avaliação da viabilidade celular

Para a contagem das células, foram utilizadas 9 partes de PBS 10 mM estéril, pH 7,4 e 1 parte da suspensão celular (diluição 1/10). As células foram contadas em aparelho automatizado Counter 19 (Wiener lab.). A viabilidade celular foi avaliada com Azul de Tripán 0,1%. Para avaliação da morfologia celular as lâminas foram coradas pelo método May Grunwald e Giemsa (MGG) modificado por Rosenfeld (ROSENFELD, 1947).

4.3 Avaliação da citotoxicidade

Foi realizado um ensaio citotoxicidade pelo método MTT. As doses de AG encontradas na literatura foram: 100 µM, 250 µM, 500 µM, 5 mM e 10 mM (KELSO et al., 2011; PINTO et al., 2012).

4.4 Cultivo celular

A padronização da concentração (0,5 mM) e a citotoxicidade da AG foram previamente avaliadas pelo nosso grupo (FERREIRA et al., dados da tese em andamento). Os neutrófilos foram cultivados em meio RPMI 1640 suplementado com L-glutamina 0,3 g/L, HEPES 2,32 g/L, bicarbonato de sódio 2,0 g/L, estreptomicina 100 µg/mL, penicilina 100 UI/mL e 10% soro fetal bovino, em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C. Os cultivos foram realizados em placas de cultura de 96 ou 24 poços por um período de 18 horas na presença ou ausência da AG 0,5 mM. Após 18 horas de incubação as células foram centrifugadas 10 minutos, 1200 rpm, 10 °C e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas e utilizadas nos experimentos abaixo. Em alguns ensaios foram adicionados inibidores enzimáticos no momento da reação, azida 1 mM para MPO (RODRIGUES et al., 2002), inibidor de tripsina de glycine max (soybean) - (STI) 0,3 mg/mL para NE (RIBEIRO et al., 2010) e apocinina 100 µM para NOX2 (STEFFEN et al., 2012).

4.5 Atividade de MPO (HOCl)

A formação de HOCl reflete a atividade de MPO e foi acompanhada por espectrofotometria baseada na formação de taurina-cloramina resultante da reação de ácido hipocloroso com taurina (KETTLE; WINTERBOURN, 1994). Neutrófilos ($2,0 \times 10^6$ células/mL) estimulados com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) 16 ng/mL ou zimosan opsonizado (ZO) 2×10^7 partículas/reação, em tampão fosfato 10 mM (pH 7,4) contendo NaCl 140 mM, KCl 3 mM, CaCl_2 1 mM, MgCl_2 0,5 mM e glicose 1 mg/mL foram incubados com taurina 15 mM durante 30 minutos a 37°C sob agitação suave. Após a incubação a reação foi interrompida pela adição de catalase 20 µg/mL e a mesma foi mantida em gelo por 5 minutos e em seguida foi centrifugada (10 minutos, 12.000 rpm, 4°C). A concentração de taurina-cloramina presente no sobrenadante foi estimada pela oxidação do ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) a 5,5'-ditiobis ácido 2-nitrobenzoico (DTNB) medindo o decréscimo da absorbância de TNB a 412 nm.

Este mesmo protocolo foi utilizado para avaliar a cinética de formação de HOCl nos tempos de 30, 45, 60 ou 90 minutos.

4.6 Atividade de MPO sem estímulo por quimiluminescência amplificada por luminol utilizando homogenato celular

A atividade de MPO, sem estímulo, por quimiluminescência amplificada por luminol utilizando homogenato celular foi avaliada conforme Rodrigues et al. (2002) com modificações. Neutrófilos ($1,0 \times 10^6$ células/mL) em PBS 10 mM (pH 7,4) foram submetidos à sonicação em desruptor de células ultrassônico (Unique). As células foram mantidas em gelo e foram sonicadas em três ciclos de 5 segundos utilizando-se frequência de 30 kHz. A reação foi realizada com o homogenato celular, luminol 1 mM e H_2O_2 0,1 mM. A intensidade de quimiluminescência foi acompanhada em luminômetro Geomax 20/20 durante 30 minutos em um volume final de 0,3 mL.

4.7 Atividade de MPO após estímulo por quimiluminescência amplificada por luminol

A atividade de MPO utilizando quimiluminescência amplificada por luminol foi avaliada utilizando ensaio descrito anteriormente por Mendonça et al. (2014) com modificações. Neutrófilos ($2,0 \times 10^6$ células/mL) estimulados com PMA 53 ng/mL ou ZO 2×10^7 partículas/reação em PBS 10 mM (pH 7,4) foram incubados durante 30 minutos a 37°C. Após a incubação as células foram mantidas em gelo por 5 minutos e em seguida foram centrifugadas (10 minutos, 500 g, 4°C). A reação foi realizada com o sobrenadante, luminol 1 mM e H₂O₂ 0,1 mM. A intensidade de quimiluminescência foi acompanhada em luminômetro Geomax 20/20 durante 30 minutos em um volume final de 0,3 mL (MENDONÇA et al., 2014).

4.8 Atividade Elastase

A atividade da NE foi avaliada utilizando ensaio descrito anteriormente por Kabeya et al. (2013b) com modificações. Neutrófilos ($1,0 \times 10^6$ células/mL) em tampão fosfato 10 mM (pH 7,4) contendo NaCl 140 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 0,5 mM e glicose 1 mg/mL foram tratados com citocalasina B 4,8 µg/mL e *n*-formil-metionil-leucil-fenilalanina (n-fMLP) 50 µM para obter-se um sobrenadante rico em elastase, como descrito por Johansson et al. (2002). Alíquotas do sobrenadante foram misturadas com o substrato de elastase de neutrófilos, N-succinil-Ala-Ala-Val *p*-nitroanilida (SAAVpNA), 800 µM e incubadas durante 30 minutos a 37°C. Após a incubação, a absorvância do produto da reação *p*-nitroanilida foi medida espectrofotometricamente a 405 nm. O branco de amostra, sem o substrato, foi subtraída de todas as amostras.

4.9 Western blotting

A) Preparo das amostras

Neutrófilos ($3,0 \times 10^6$ células/mL) em tampão Ripa (pH 7,4) contendo pool de inibidores de protease comercial, benzamidina 1 mg/mL, PMSF 100 mM e leupeptina 1

mg/mL foram submetidos à sonicação em desruptor de células ultrassônico (Unique). As células foram mantidas em gelo e foram sonicadas em três ciclos de 5 segundos utilizando-se frequência de 30 kHz. Após a sonicação as células foram centrifugadas por 10 minutos, 14.000 rpm, 4°C. O sobrenadante foi armazenado em freezer -20°C e utilizado para os ensaios.

A concentração de proteínas das amostras foi dosada de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

B) Eletroforese de proteína em gel de policrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas foi realizada em gel de policrilamida 12%. As amostras contendo 50 µg de proteínas foram desnaturadas por fervura em banho-maria em tampão de amostra e em PBS 10 mM (pH 7,4) por 3 minutos. A eletroforese foi realizada em cuba vertical miniVE da GE[®] a 150 V e 15 mA durante 2 horas. Foi utilizado um padrão de alto peso molecular (200, 116, 97, 66, 55, 45, 36, 29, 24, 20, 14,2 e 6,5 kDa). Os géis foram submetidos à transferência para membrana de nitrocelulose.

C) *Western blotting*

As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (com poros de 0,45 µm de diâmetro). As membranas, as esponjas e os papéis de filtro ficaram imersos no tampão de transferência até serem montados na placa do sistema de transferência (blot module miniVE da GE[®]). A transferência foi realizada a 25 V e 400 mA durante 2 horas. Após a transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau 0,1% por aproximadamente 2 minutos. As membranas foram descoradas com água deionizada até completa visualização das bandas protéicas e lavadas com tampão TBS-T. Os géis foram corados com *Coomassie blue* e descorados até visualização ou não das bandas protéicas, para verificar se a transferência foi eficaz.

Após a lavagem as membranas foram bloqueadas com BSA 3% para β-actina, BSA 6% para MPO e BSA 3% para NE por 1 hora em temperatura ambiente, sob agitação leve e

constante.

Em seguida, as membranas foram lavadas com tampão TBS-T e incubadas com o anticorpo primário específico produzidos em coelho para β -actina (*Anti-beta Actin, clone EP1123Y*, Millipore, 1:500), MPO (*Anti-Myeloperoxidase (human white cells)*, Millipore, 1:2000) e NE (*Anti-Neutrophil elastase (N-term)*, Sigma, 1:2000) *overnight* a 4°C.

No dia seguinte as membranas foram lavadas com tampão TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com HRP (Sigma) (diluído 1:3000 para β -actina, 1:4000 para MPO e 1:5000 para NE em TBS-T) por 1 hora em temperatura ambiente, sob agitação leve e constante. O anticorpo secundário é responsável pela identificação do anticorpo que reagiu com as proteínas na membrana.

Por fim, as membranas foram lavadas com tampão TBS-T e a reação foi amplificada pelo ECL Prime (GE®) e revelada em filme Amersham Hyperfilm™ ECL (GE®). As bandas foram quantificadas pelo programa ImageJ®.

4.10 Preparo das Lâminas Silanizadas para Microscopia

As lâminas foram lavadas com detergente neutro, mantidas em água corrente por 30 minutos e em água destilada por mais 30 minutos, foram secas e passaram por uma bateria de banhos:

- 1º) Água destilada : 15 segundos com 5 mergulhos
- 2º) Acetona pura : 15 segundos com 5 mergulhos
- 3º) Acetona pura : 15 segundos com 5 mergulhos
- 4º) Silano 4% em solução de acetona : 10 segundos
- 5º) Acetona pura : 15 segundos com 5 mergulhos
- 6º) Acetona pura : 15 segundos com 5 mergulhos
- 7º) Água destilada : 15 segundos.

Após a sequência de banhos as lâminas foram secas em estufa (60°C) e armazenadas até o momento do uso.

4.11 Marcação da MPO e NE por imunofluorescência

Para avaliarmos o conteúdo e a forma de distribuição das enzimas MPO e NE foram realizados ensaios de imunofluorescência usando anticorpos específicos para as enzimas em estudo.

Após a incubação dos neutrófilos ($1,0 \times 10^6$ células/mL) com AG 0,5 mM por 18 horas, os mesmos foram estimulados ou não com PMA 20 nM ou ZO 2×10^7 partículas/reação durante 4 horas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C (PARKER et al., 2012). Posteriormente os neutrófilos foram centrifugados, ressuspensos em PBS 10 mM (pH 7,4) e aplicados sobre as lâminas silanizadas. As lâminas foram mantidas em câmara úmida por 30 minutos para adesão e logo depois foram incubadas com o fixador paraformaldeído comercial 4% por 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS e em seguida incubadas em PBS com 0,2% tween 20 e BSA 1% por 1 hora para bloqueio e torná-las mais permeáveis.

Em seguida as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo primário específico produzidos em coelho para MPO (*Anti-Myeloperoxidase (human white cells)*, Millipore, 1:500) e NE (*Anti-Neutrophil elastase (N-term)*, Sigma, 1:500) *overnight* a 4°C.

No dia seguinte as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a fluoresceína isotiocianato (FITC), Millipore, 1:200 e DAPI 1:10 para corar o DNA do núcleo das células, por 1 hora e 30 minutos a temperatura ambiente em câmara úmida.

Por fim, as lâminas foram lavadas com PBS e foram montadas com lamínulas contendo glicerol tamponado com pH alcalino e 0,1% de parafenileno-diamino (PPD), um inibidor do decaimento de fluorescência e observadas em microscópio confocal.

4.12 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão, de no mínimo três experimentos independentes feitos em duplicata. Os dados foram analisados por meio de comparações utilizando análise de variância *one way* (ANOVA) e o teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas no programa estatístico Graph Pad Instat® (1993) considerando diferença significativa quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Abaixo se encontra os resultados e a discussão deste trabalho.

5.1 Obtenção de neutrófilos

Foi realizada inicialmente a padronização do isolamento de neutrófilos de sangue periférico e cultivo celular em nosso laboratório (BOYUM, 1976). O isolamento de neutrófilos permitiu obter uma população celular com mais de 95% de neutrófilos (FIGURA 6), com viabilidade superior a 99%.

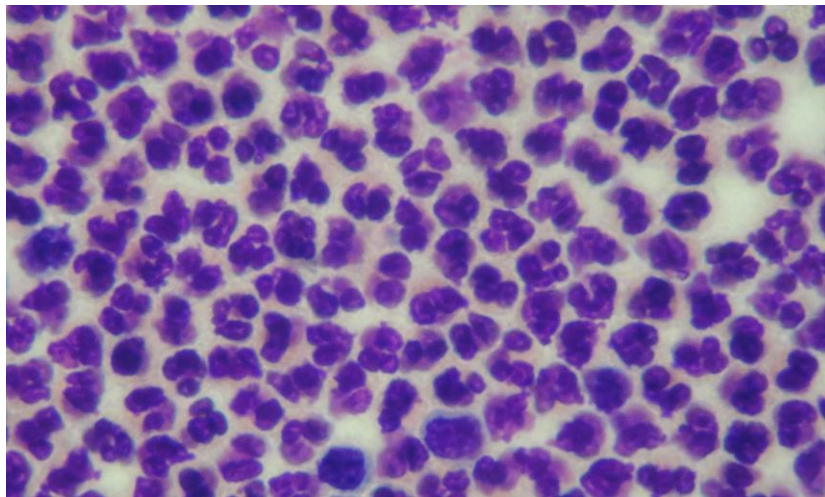


Figura 6 - População de células após o isolamento de neutrófilos.
Nota: Coloração de MGG (microscopia de luz com aumento de 1000x).
Fonte: Do autor

5.2 Avaliação da citotoxicidade da AG sobre neutrófilos

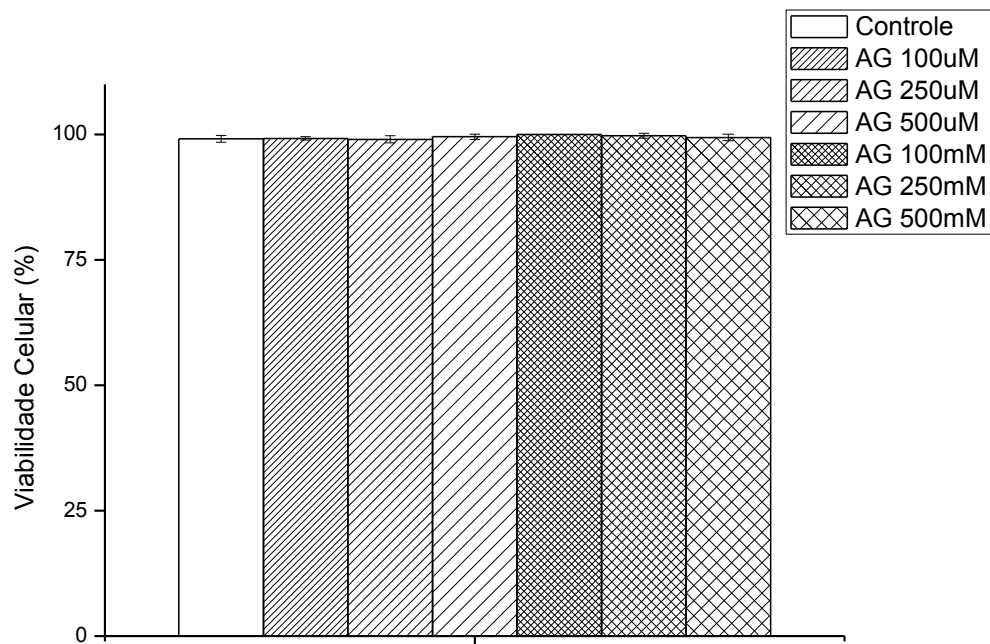


Figura 7 - Ensaio de citotoxicidade da AG em neutrófilos humanos.
 Fonte: FERREIRA et al., dados da tese em andamento.

Foi realizado um ensaio de citotoxicidade para a AG até a concentração de 500 mM, e não houve morte celular em cultivo de 24 horas. Como pode ser visualizado na Figura 7, a viabilidade foi maior que 99%.

5.3 Atividade de MPO

Para avaliarmos a influência da AG na degranulação de neutrófilos analisamos as enzimas MPO e NE, que estão presentes em grande quantidade nos grânulos azurófilos (AMULIC et al., 2012).

Aqui, a atividade de MPO foi avaliada pela geração de HOCl, através da formação de taurina-cloramina por neutrófilos estimulados com PMA ou ZO (item 4.5). Essa atividade de MPO corresponde a sua atividade oxidativa.

Como pode ser observado na Figura 8 e 9, não houve diferença entre o grupo controle e o grupo tratado com AG, na produção de HOCl por neutrófilos estimulados com PMA ou ZO, respectivamente. A azida, um inibidor inespecífico da MPO, inibiu eficientemente a formação do HOCl.

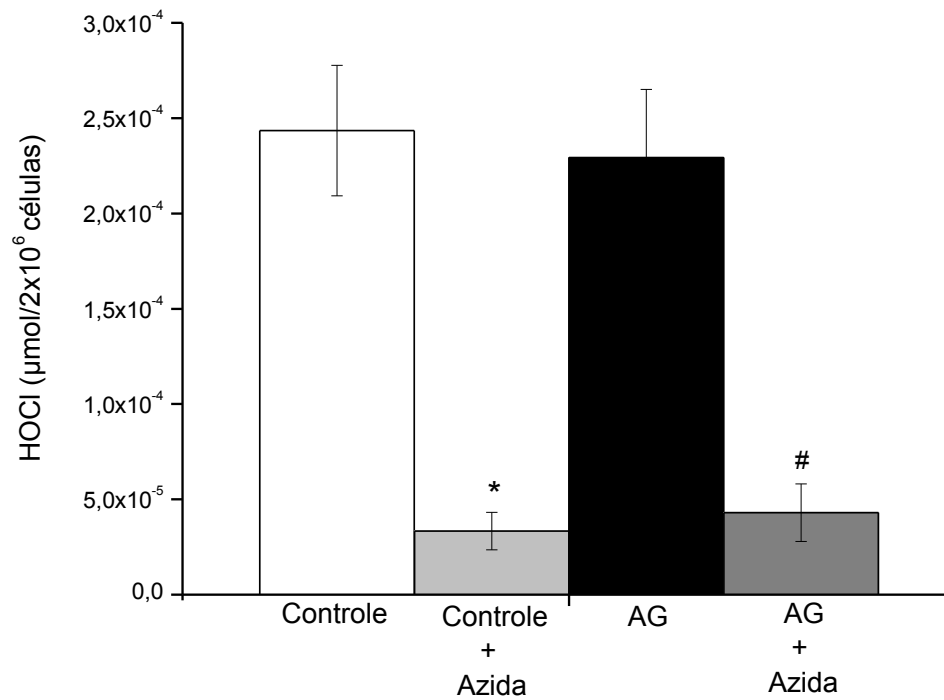


Figura 8 - Efeito do tratamento com a AG (0,5 mM) sobre a produção de HOCl por neutrófilos estimulados com PMA.

Nota: Valores da oxidação do TNB obtidos quando neutrófilos humanos (2×10^6 células/mL) tratados ou não com AG (0,5 mM), Azida (1 mM) ou AG (0,5 mM) + Azida (1 mM) foram incubados com taurina (15 mM) e PMA (0,16 ng/mL) por 30 min. O meio da reação foi em PBS 10 mM (pH 7,4), num volume final de 1 mL. Os dados representam a média \pm SD de cinco experimentos independentes feitos em duplicata. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle e # $P < 0,05$ comparado ao grupo tratado com AG.

Fonte: Do Autor

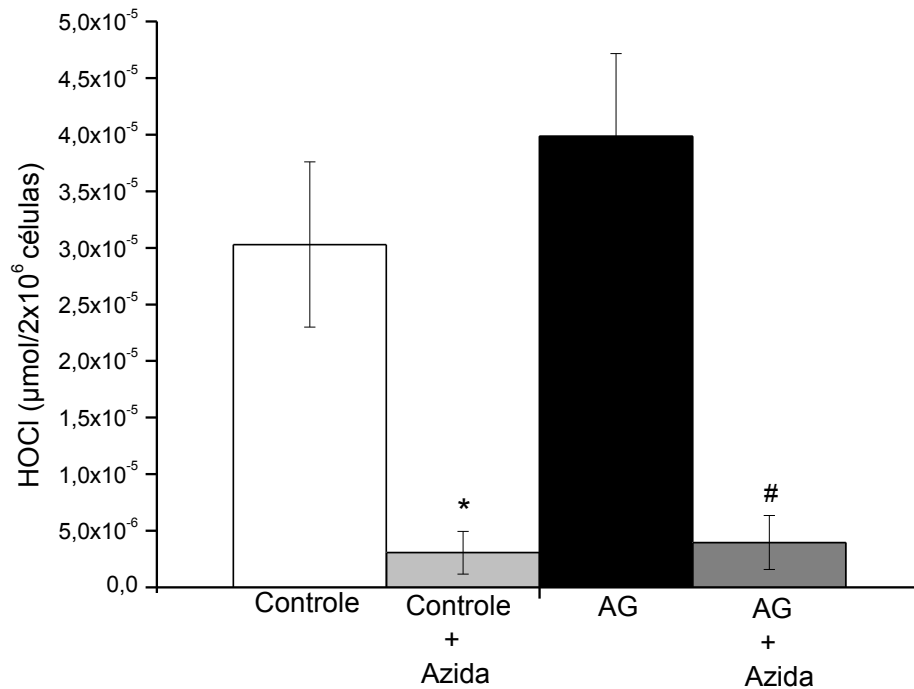


Figura 9 - Efeito do tratamento com a AG (0,5 mM) sobre a produção de HOCl por neutrófilos estimulados com ZO.

Nota: Valores da oxidação do TNB obtidos quando neutrófilos humanos (2×10^6 células/mL) tratados ou não com AG (0,5 mM), Azida (1 mM) ou AG (0,5 mM) + Azida (1 mM) foram incubados com taurina (15 mM) e ZO (2×10^7 partículas/reação) por 30 min. O meio da reação foi em PBS 10 mM (pH 7,4), num volume final de 1 mL. Os dados representam a média \pm SD de três experimentos independentes feitos em duplicata. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle e # $P < 0,05$ comparado ao grupo tratado com AG.

Fonte: Do Autor

Nesse ensaio, utilizamos o PMA (Figura 8) ou ZO (Figura 9) como estimuladores das funções dos neutrófilos. O PMA, estímulo solúvel, dispara a explosão respiratória pela ativação direta da proteína quinase C (PKC) (EDWARDS, 1996; PAVELKOVA; KUBALA, 2004). Já o ZO, partícula opsonizada, induz a fagocitose e ativa a explosão respiratória nos neutrófilos pela sua ligação com receptores de complemento e imunoglobulinas, que induz a transdução de sinal e leva à ativação da PKC com ativação da NOX2. E ainda, a estimulação pelo ZO leva à ativação da fosfolipase A₂, que produz ácidos graxos insaturados como o ácido araquidônico que leva a ativação da NOX2 (PAVELKOVA; KUBALA, 2004; FUZISSAKI, 2009).

A cinética de formação de HOCl por neutrófilos estimulados com PMA ou ZO também foi avaliada (item 4.5). Avaliamos os tempos de 30, 45, 60 e 90 minutos de incubação dos neutrófilos com os estímulos, baseado nos tempos utilizados no ensaio do

killing (FERREIRA et al., 2012). Como pode ser observado nas figuras 10 e 11, independente dos estímulos utilizados (PMA ou ZO) e dos tempos analisados não houve diferença entre o grupo controle e o grupo tratado com a AG na formação de HOCl.

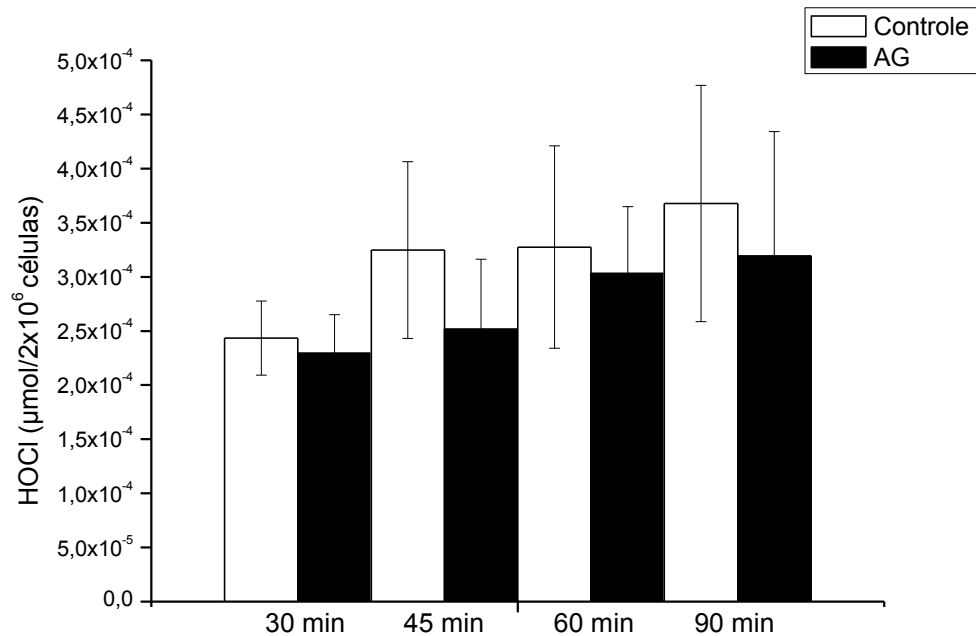


Figura 10 - Efeito do tratamento com a AG (0,5 mM) sobre a cinética de produção de HOCl por neutrófilos estimulados com PMA.

Nota: Valores da oxidação do TNB obtidos quando neutrófilos humanos (2x10⁶ células/mL) tratados ou não com AG (0,5 mM), foram incubados com taurina (15 mM) e PMA (0, 16 ng/mL) por 30, 45, 60 ou 90 min. O meio da reação foi em PBS 10 mM (pH 7,4), num volume final de 1 mL. Os dados representam a média ± SD de três experimentos independentes feitos em duplicata.

Fonte: Do Autor

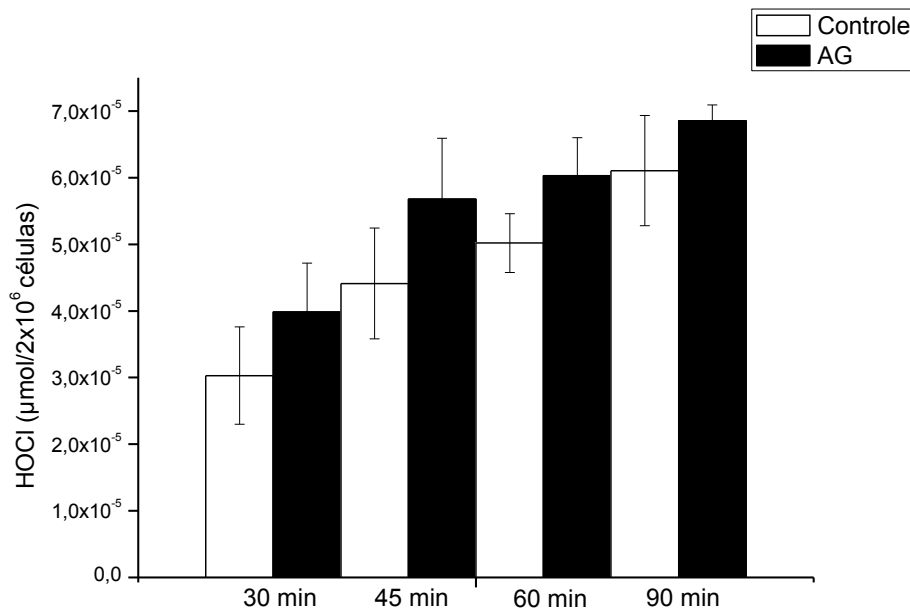


Figura 11 - Efeito do tratamento com a AG (0,5 mM) sobre a cinética de produção de HOCl por neutrófilos estimulados com ZO.

Nota: Valores da oxidação do TNB obtidos quando neutrófilos humanos (2×10^6 células/mL) tratados ou não com AG (0,5 mM), foram incubados com taurina (15 mM) e ZO (2×10^7 partículas/reação) por 30, 45, 60 ou 90 min. O meio da reação foi em PBS 10 mM (pH 7,4), num volume final de 1 mL. Os dados representam a média \pm SD de três experimentos independentes feitos em duplicata.

Fonte: Do Autor

A MPO é uma enzima muito intrigante, pois possui várias atividades e vários substratos. Enquanto normalmente é vista apenas como uma enzima pró-oxidante, responsável pela formação de HOCl e espécies oxidantes, ela também consome $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 que correspondem à atividade antioxidante (WINTERBOURN; KETTLE, 2013).

A MPO utiliza os produtos da ativação de NOX2, $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , como substratos para gerar outras espécies oxidantes. O objetivo das principais reações fagossomais da MPO é promover a formação eficiente de HOCl. O HOCl é um potente oxidante que ataca microrganismos numa variedade de formas, contribuindo significativamente para a morte microbiana (ROSEN et al., 2009; KLEBANOFF et al., 2013; RAYNER; LOVE; HAWKINS, 2014). Porém, esta espécie reativa também tem sido implicada como mediadora de danos oxidativos dos tecidos e disfunção celular como pode ser visto em trabalhos anteriores (CHURG et al., 2012; RAYNER; LOVE; HAWKINS, 2014; WANG et al., 2015).

Diante destes resultados podemos sugerir que a AG, nas condições experimentais deste estudo, não tem efeito na atividade de cloração da MPO, uma vez que o tratamento não alterou a formação do HOCl, conseqüentemente não influencia o dano tecidual e celular

causado por este potente microbicida, como já descrito em outros trabalhos (GRANTHAM et al., 2015; WANG et al., 2015).

Existe uma maior diversidade de espécies oxidativas dependentes de MPO no meio extracelular do que comparado ao ambiente intracelular fagossomal, devido à quantidade limitada de substrato disponível no fagossomo. Isto pode desencadear processos patológicos ou mesmo acelerá-los (RAYNER; LOVE; HAWKINS, 2014). Existe uma forte evidência da MPO e de seus oxidantes associados no desenvolvimento de aterosclerose. O HOCl, tem sido implicado como um dos mais importantes intermediários reativos envolvido na oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), um dos eventos mais precoces na gênese da aterosclerose (HEINECKE, 2003; SPICKETT et al., 2007). Além disso, o HOCl está envolvido em outros estados inflamatórios, doenças neurodegenerativas, doença renal, distúrbios pulmonares e câncer (RAYNER; LOVE; HAWKINS, 2014).

Apesar da maioria de microrganismos fagocitados por neutrófilos serem mortos por um mecanismo dependente de MPO e é quase totalmente devido ao HOCl, indivíduos que apresentam deficiência de MPO raramente apresentam complicações com infecções. Uma possível explicação é que o HOCl fornece uma primeira resposta que elimina a maior parte dos microrganismos, e os microrganismos sobreviventes são mortos por processos não oxidativos. Este último pode lidar adequadamente com infecção de menor intensidade, mas numa infecção de maior proporção, o HOCl torna-se necessário para uma resolução mais eficiente (WINTERBOURN; KETTLE, 2013).

A atividade de MPO sem estímulo, que reflete a capacidade oxidativa da MPO, também foi avaliada neste trabalho (item 4.6). Para isto, utilizamos homogenato de neutrófilos humanos cultivados na presença ou não da AG, numa reação iniciada pela adição de H₂O₂. Aqui também não houve diferença entre o grupo controle e o grupo tratado com AG, como pode ser observado na Figura 12. Da mesma forma vista na atividade de cloração, a azida inibiu a atividade basal da MPO utilizando homogenato celular.

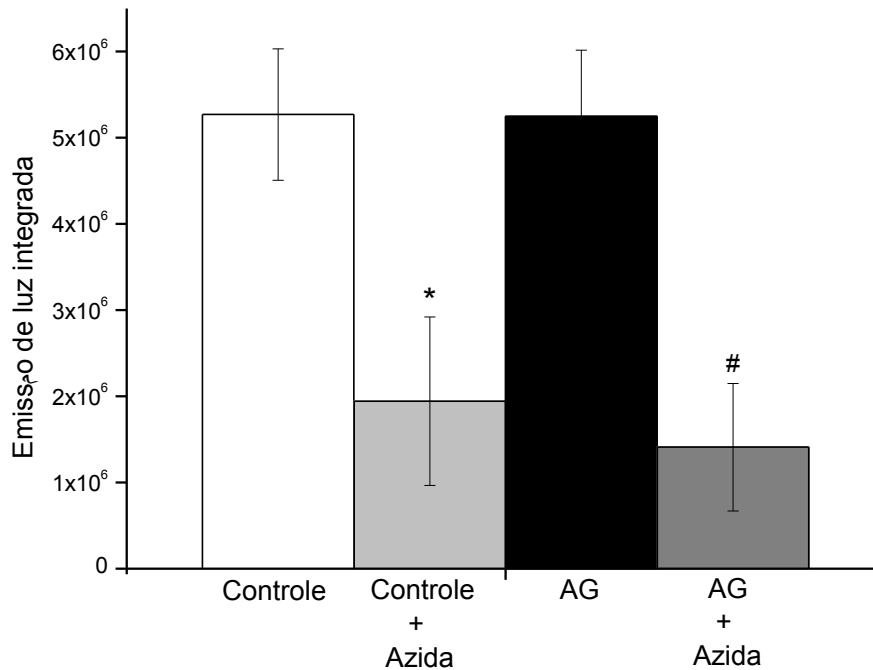


Figura 12 - Efeito do tratamento com a AG (0,5 mM) sobre a atividade de MPO sem estímulo de neutrófilos.

Nota: Valores da área integrada de emissão de luz (RLU/s) obtidos quando homogenatos de neutrófilos humanos (1×10^6 células/mL) tratados ou não com AG (0,5 mM), Azida (1 mM) ou AG (0,5 mM) + Azida (1 mM) foram incubados com luminol (1 mM) e H_2O_2 (0,1 mM). O meio da reação foi PBS 10 mM (pH 7,4), num volume final de 300 μ L. Os dados representam a média \pm SD de três experimentos independentes feitos em duplicata. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle e # $P < 0,05$ comparado ao grupo tratado com AG.

Fonte: Do Autor

Este resultado reforça a hipótese de que a atividade de cloração e atividade de MPO sem estímulo, que refletem a propriedade oxidativa de MPO, parecem não serem afetadas pela AG.

A MPO também funciona como uma peroxidásica clássica, os substratos fisiológicos para a atividade peroxidásica incluem: tirosina, ascorbato, urato, serotonina, nitrito, óxido nítrico e uma variedade de outras espécies que funcionam como um doador de elétron. Assim, a MPO tem a capacidade de catalisar a produção de uma gama de espécies radicalares que podem contribuir para a morte oxidativa (FURTMÜLLER et al. 2003; MEOTTI et al., 2011; WINTERBOURN; KETTLE, 2013).

No ensaio de quimiluminescência amplificada por luminol avaliamos a atividade de MPO de neutrófilos previamente tratados com PMA ou ZO, onde a reação foi iniciada pela adição de H_2O_2 (item 4.7). Os metabólitos derivados da MPO são responsáveis pela oxidação

e consequente excitação do luminol, o qual é um amplificador de luz (MENDONÇA et al., 2014).

Ao contrário do que foi visto nos ensaios anteriores, aqui o tratamento com a AG causou um aumento da atividade de MPO em comparação ao grupo controle em neutrófilos estimulados com PMA ou ZO (FIGURA 13 e 14).

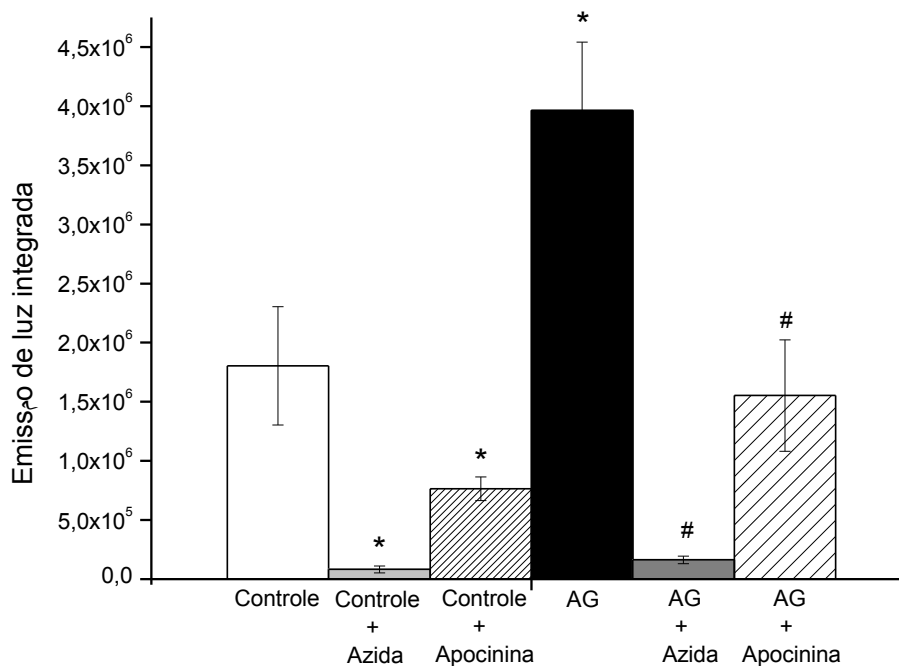


Figura 13 - Efeito do tratamento com a AG (0,5 mM) sobre a atividade de MPO de neutrófilos estimulados com PMA.

Nota: Valores da área integrada de emissão de luz (RLU/s) obtidos quando neutrófilos humanos íntegros (2×10^6 células/mL) previamente estimulados com PMA (53 ng/mL) tratados ou não com AG (0,5 mM), Azida (1mM), Apocinina (100 μ M), AG (0,5 mM) + Azida (1 mM) ou AG (0,5 mM) + Apocinina (100 μ M) foram incubados com luminol (1 mM) e H₂O₂ (0,1 mM). O meio da reação foi PBS 10 mM (pH 7,4), num volume final de 300 μ L. Os dados representam a média \pm SD de três experimentos independentes feitos em duplicata. *P<0,05 comparado ao grupo controle e #P<0,05 comparado ao grupo tratado com AG.

Fonte: Do Autor

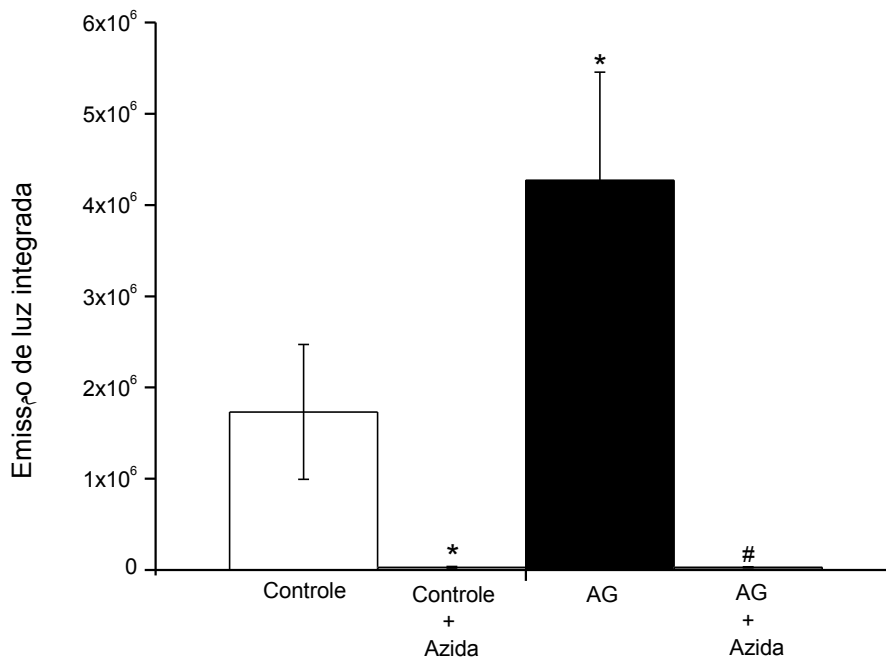


Figura 14 - Efeito do tratamento com a AG (0,5 mM) sobre a atividade de MPO de neutrófilos estimulados com ZO.

Nota: Valores da área integrada de emissão de luz (RLU/s) obtidos quando neutrófilos humanos íntegros (2×10^6 células/mL) previamente estimulados com ZO (2×10^7 partículas/reação) tratados ou não com AG (0,5 mM), Azida (1mM), AG (0,5 mM) + Azida (1 mM) foram incubados com luminol (1 mM) e H_2O_2 (0,1 mM). O meio da reação foi PBS 10 mM (pH 7,4), num volume final de 300 μ L. Os dados representam a média \pm SD de três experimentos independentes feitos em duplicata. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle e # $P < 0,05$ comparado ao grupo tratado com AG.

Fonte: Do Autor

Aqui a AG, pode ter estimulado a atividade oxidativa dos neutrófilos após o estímulo com PMA ou ZO, uma vez que a atividade de MPO sem estímulo utilizando homogenato não apresentou diferença entre os grupos (FIGURA 12). Para que a MPO apresente essa resposta ao tratamento com a AG é necessário a presença de algum substrato que doe elétron. Desta forma, podemos estar observando a formação de HOCl após estímulos dos neutrófilos e utilizando o luminol como substrato, uma vez que o meio da reação possui cloreto e facilita a atividade de cloração. Porém, no ensaio clássico que avalia a atividade de cloração (oxidação do TNB ao DTNB) (item 4.5) observamos que a AG não foi capaz de influenciar a formação de HOCl (FIGURAS 8, 9, 10 e 11); ou ainda, o próprio H_2O_2 pode estar reagindo com o composto I, gerando espécies reativas que oxidam o luminol (Figura 1; reação 3b) (PAUMANN-PAGE et al. 2013); ou o próprio composto I pode estar reagindo com o luminol e ocasionando a produção de luz.

Os neutrófilos possuem um elevado teor de ascorbato, porém não o liberam em quantidades significativas quando são estimulados (KETTLE; WINTERBOURN, 1989).

Além da atividade oxidativa, a MPO também possui uma atividade antioxidante importante e dentre elas a atividade de catalase, superoxidase e superóxido dismutase (FIGURA 3) (WINTERBOURN; KETTLE, 2013).

Isto nos permite sugerir ainda, que o resultado encontrado também pode ser devido a uma atividade antioxidante da MPO. A MPO tem o potencial de atuar como uma verdadeira catalase, em que se degrada o H_2O_2 em oxigênio e água (FIGURA 3E). A MPO pode atuar também como uma superoxidase, que utiliza o H_2O_2 para oxidar $O_2^{\cdot-}$ a oxigênio (FIGURA 3C), e ainda como uma superóxido dismutase onde o $O_2^{\cdot-}$ é dismutado a H_2O_2 e oxigênio (FIGURA 3D) (WINTERBOURN; KETTLE, 2013). Em todas as funções catalíticas descritas são gerados os compostos intermediários da MPO, que por sua vez podem reagir com o luminol e produzir luz.

As atividades de superoxidase e superóxido dismutase da MPO não devem ser desconsideradas, uma vez que as altas concentrações de $O_2^{\cdot-}$ dentro do fagossomo favorecem estas reações. O $O_2^{\cdot-}$ é um substrato fisiológico para MPO e suas interações são importantes para o mecanismo de defesa do hospedeiro. Dentro do fagossomo, na presença de altas concentrações de cloreto, a atividade de cloração da MPO predomina, enquanto em baixas concentrações de cloreto, a atividade antioxidante da enzima na quebra de H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ em oxigênio e água, prevalece (KETTLE et al., 2007; KETTLE et al, 2011).

Além do íon cloreto, $O_2^{\cdot-}$ é um substrato redutor conhecido para MPO que está presente dentro do fagossomo em concentrações suficientes para influenciar a atividade da enzima. O $O_2^{\cdot-}$ deve ser visto como um co-substrato utilizado pela MPO durante a morte bacteriana (KETTLE, 2011).

Foi proposto por Kettle e Winterbourn (2001) que a MPO possui a função de atuar como uma catalase, protegendo, assim, outras proteínas granulares antimicrobianas dos danos oxidativos.

O mecanismo dessas atividades e seu significado fisiológico tem recebido pouca atenção. A atividade da catalase da MPO é mais relevante fisiologicamente onde concentrações de cloreto são baixas, pois os substratos cloreto e H_2O_2 competem pela MPO. Nas situações onde a concentração de cloreto está elevada, a atividade de cloração domina e pouca atividade de catalase é esperada no ambiente fagossomal. Além disso, a atividade de catalase da MPO é eficientemente mantida por $O_2^{\cdot-}$ e outros doadores de elétrons (KETTLE; WINTERBOURN, 2001; WINTERBOURN; KETTLE, 2013). Além disso, já foi descrito

anteriormente que a concentração de H_2O_2 no ambiente fagossomal é um fator importante para determinar se a enzima vai atuar como uma catalase ou peroxidase (WINTERBOURN; GARCIA; SEGAL, 1985).

Outro aspecto importante para a atividade da MPO, é o pH fagossomal. Levine et al. (2015) demonstraram esta importância, descrevendo que após a ativação de NOX2 o pH fagossomal está em torno de 9,0 e nesse pH a enzima MPO possui somente ótima atividade como catalase. Em pH ácido a MPO apresenta ótima atividade de cloração, peroxidásica e como superóxido dismutase.

Portanto, a MPO é uma enzima que possui múltiplas atividades. O meio fisiológico irá determinar os substratos e a atividade desta enzima. As propriedades dos sistemas enzimáticos são bem conhecidas, porém, compreender como eles funcionam dentro do fagossomo tem sido mais desafiador, pois condições fagossomais são muito diferentes das do ambiente externo dos neutrófilos (WINTERBOURN; KETTLE, 2013).

Sendo assim, a AG pode estar estimulando tanto uma atividade oxidativa, após ativação dos neutrófilos, que contribui para o *killing* como também uma atividade antioxidante, que pode evitar os danos celulares e teciduais causados por espécies reativas.

Existe o crescente destaque para o papel da AG como antioxidante, além de seu conhecido papel como inibidor de glicação proteica (GOH; COOPER, 2008; SLIMAN, et al. 2010). Adicionalmente, foi descrito também um efeito protetor da AG sobre a sobrevivência de ratos diabéticos com feridas aleatórias dorsais (OZTURK et al. 2012). Além disso, ela previne danos celulares como na pneumonia aspirativa e danos renais causados pela ciclofosfamida e pelo diabetes (GOH; COOPER, 2008; ABRAHAM; RABI, 2011; KARLI et al., 2012).

Os resultados mostrados nas Figuras 13 e 14 podem também estar relacionados a um aumento da atividade de NOX2, pois nesse ensaio ocorre sua ativação ocasionando a formação de um *pool* de EROs, os quais estariam excitando o luminol. Estudos do laboratório já demonstraram que a AG aumenta a atividade e expressão da NOX2 (FERREIRA et al., 2016). Aqui neutrófilos foram previamente estimulados com PMA (FIGURA 13), onde ocorre um aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$ que é o passo inicial para a geração de outras EROs. Portanto, nesse ensaio, além de usarmos a azida como um inibidor para MPO também utilizamos a apocinina como um inibidor da NOX2, ambos inibiram eficientemente a reação (FIGURA 13). Esta inibição causada pela apocinina, nos leva a sugerir que a resposta a qual estamos observando seja dependente da NOX2.

A intensa inibição promovida pela azida (Figura 13 e 14) pode ser explicada pelo fato de que a azida é capaz de reduzir significativamente o pH fagossomal por um mecanismo que não envolve somente a inibição da MPO e sim pode reduzir a atividade de outras enzimas, que não reagem adequadamente no pH menor (LEVINE et al., 2015).

5.4 Atividade Elastase

A NE é uma serino-protease que está envolvida em processos antimicrobianos intracelulares e extracelulares. A medida da atividade da NE é comumente utilizada para avaliar o processo de degranulação dos neutrófilos (KABEYA et al., 2013b). Aqui, nós avaliamos a atividade de NE através da formação de *p*-nitroanilida usando o SAAVpNA como substrato (JOHANSSON et al., 2002; KABEYA et al., 2013b).

A Figura 15 mostra que a atividade de NE não foi influenciada pelo tratamento com a AG. Não houve diferença entre o grupo controle e o grupo tratado. A diferença entre o grupo controle e grupo tratado com o inibidor de elastase STI demonstra a eficácia do ensaio.

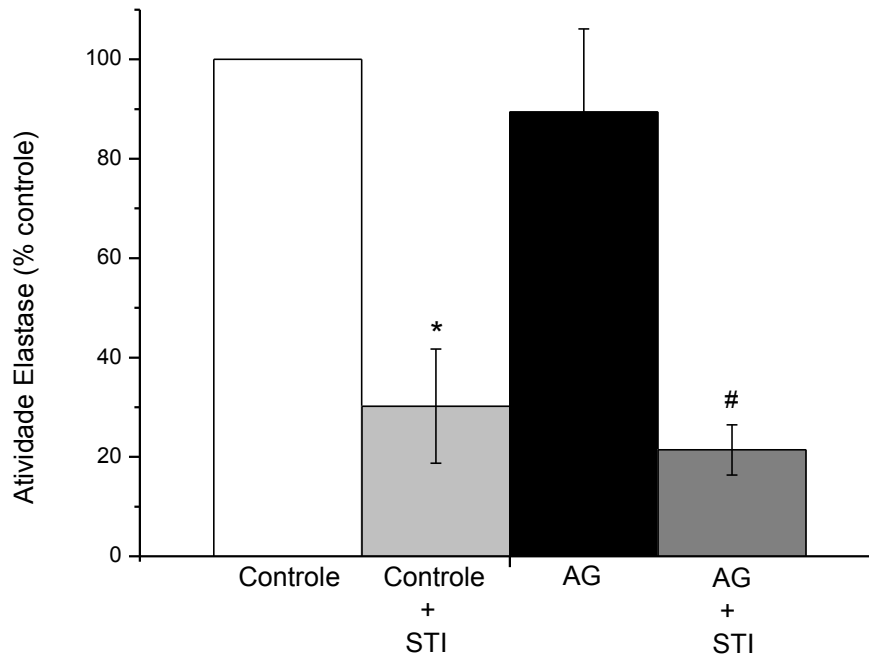


Figura 15 - Efeito do tratamento com a AG (0,5 mM) sobre a atividade da elastase em neutrófilos.

Nota: Valores obtidos pela formação de *p*-nitroanilida quando neutrófilos humanos (1×10^6 células/mL) previamente estimulados com citocalasina B e fMLP, tratados ou não com AG (0,5 mM), STI (0,3 mg/mL) e AG (0,5 mM) + STI (0,3 mg/mL) foram incubados com SAAVpNA. Os dados representam a média \pm SD de quatro experimentos independentes feitos em duplicata. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle e # $P < 0,05$ comparado ao grupo tratado com AG.

Fonte: Do Autor

Nesse ensaio, utilizamos o fMLP como estimulador da função do neutrófilo. O fMLP, peptídeo quimiotático, através da sua ligação com receptores de membrana tem a capacidade de induzir a atividade da PKC e o aumento de cálcio intracelular, que estão diretamente relacionados com os mecanismos de degranulação e de produção de EROs (ANDERSON et al., 1987; PAVELKOVA; KUBALA, 2004; FUZISSAKI, 2009).

A NE está envolvida na destruição de patógenos e regulação de processos pró-inflamatórios, mas também está envolvida em uma variedade de doenças inflamatórias, portanto, ela é vista como uma enzima multifuncional (KORKMAZ et al., 2010).

A NE possui várias atividades antimicrobianas, dentre elas encontra-se a capacidade de causar a morte direta de algumas bactérias através de sua atividade proteolítica e também independente desta, por um mecanismo desconhecido (STAPELS; GEISBRECHT; ROOIJAKKERS, 2015). Ela também possui atividade direta antifúngica sobre determinados tipos de fungos (ALAM; NEWBY; HENRIKSEN, 2012). Além disso, a NE é capaz de

atenuar a virulência bacteriana e clivar proteínas do hospedeiro para gerar peptídeos antimicrobianos. (STAPELS; GEISBRECHT; ROOIJAKKERS, 2015)

Por fim, a NE tem um papel essencial durante a formação de NETs (STAPELS; GEISBRECHT; ROOIJAKKERS, 2015). Assim como a NOX2 e a MPO também são importantes fatores para a formação de NETs (AMULIC et al., 2012).

Levine et al. (2015) relatam que a NE apresenta melhor atividade em pH alto entre 8 e 10. Assim como a atividade antioxidante da MPO como catalase, que atinge um máximo de atividade no pH de 10.

De acordo com nossos resultados a AG não foi capaz de alterar a atividade de NE, portanto, supomos que não contribuirá com os processos nos quais a NE está envolvida.

5.5 Western blotting

Além da atividade, avaliamos também a expressão da MPO por *Western blot*. A MPO é um heterodímero formada por duas cadeias pesadas (subunidade α) de 58,5 kDa cada e duas cadeias leves (subunidades β) de 14, 5 kDa cada, resultando em uma proteína de 146 kDa. As cadeias pesadas e leves estão ligadas por ligações covalentes ao grupo prostético heme (HOPE et al., 2000; PAUMANN-PAGE et al., 2013).

Como pode ser observado na Figura 16A a subunidade α migrou a um peso molecular entre 55-60 kDa, ao passo que a subunidade β migrou a 12-14 kDa.

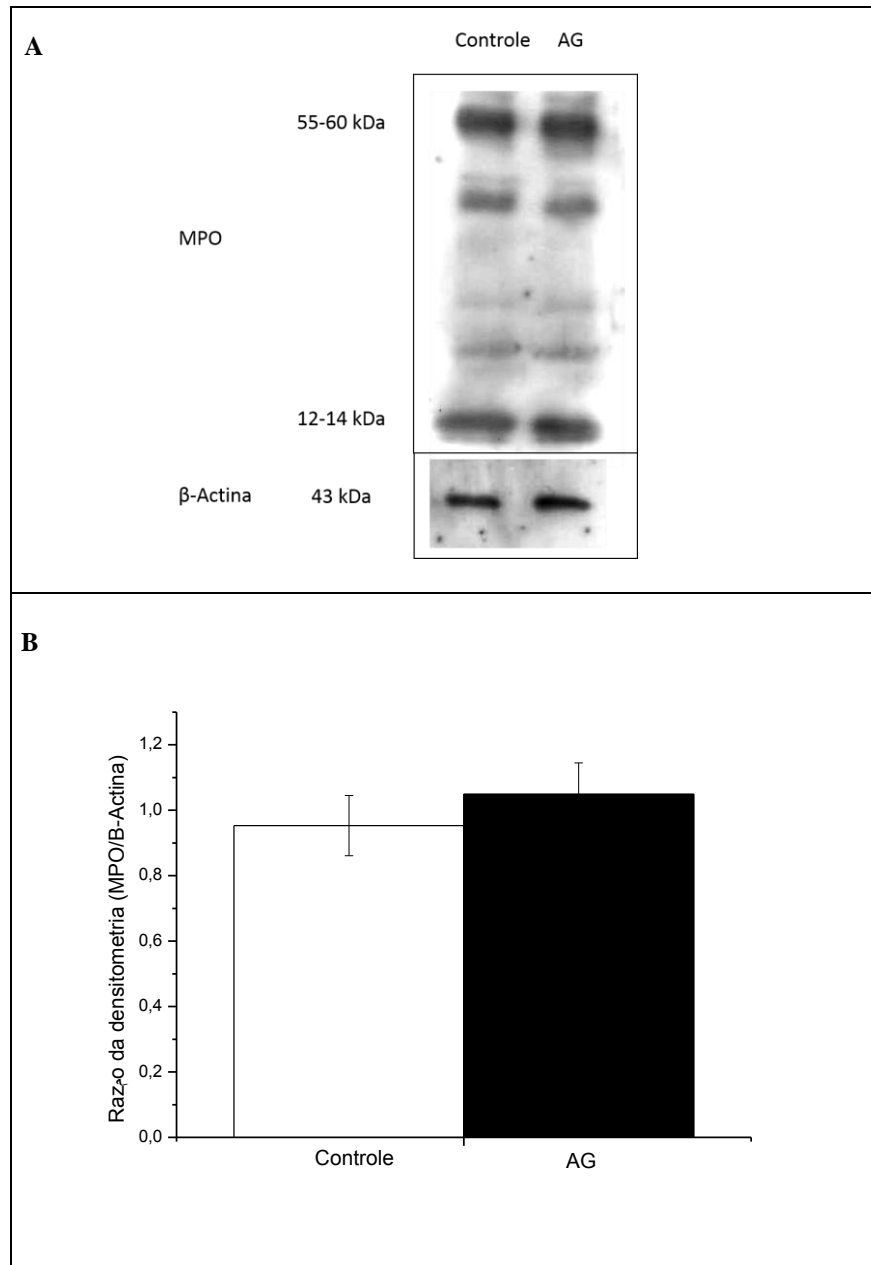


Figura 16 - *Western blot* para avaliar a expressão de MPO em grupo controle e grupo tratado com AG (0,5 mM).

Nota: (A) As bandas correspondentes da MPO subunidade α 55-60 kDa, subunidade β 12-14 kDa e a banda correspondente para β -Actina 43 kDa, usada como padrão de amostra, podem ser visualizadas. (B) Quantificação do *Western blot* pelo programa ImageJ[®]. Os gráficos de barras são expressos em média \pm SD de três experimentos independentes feitos em duplicata.

Fonte: Do Autor

Para analisarmos a expressão das proteínas quantificamos as bandas pelo programa ImageJ[®]. A expressão da proteína MPO em neutrófilos humanos não foi diferente entre o grupo controle e o grupo tratado com a AG (FIGURA 16B).

Também avaliamos a expressão de NE por *Western blot*. NE é uma protease com peso molecular de 29 a 33 kDa sobre o gel de eletroforese de policrilamida-SDS (KORKMAZ et al., 2010).

Como pode ser observado na Figura 17A a NE migrou a um peso molecular de aproximadamente 29 kDa.

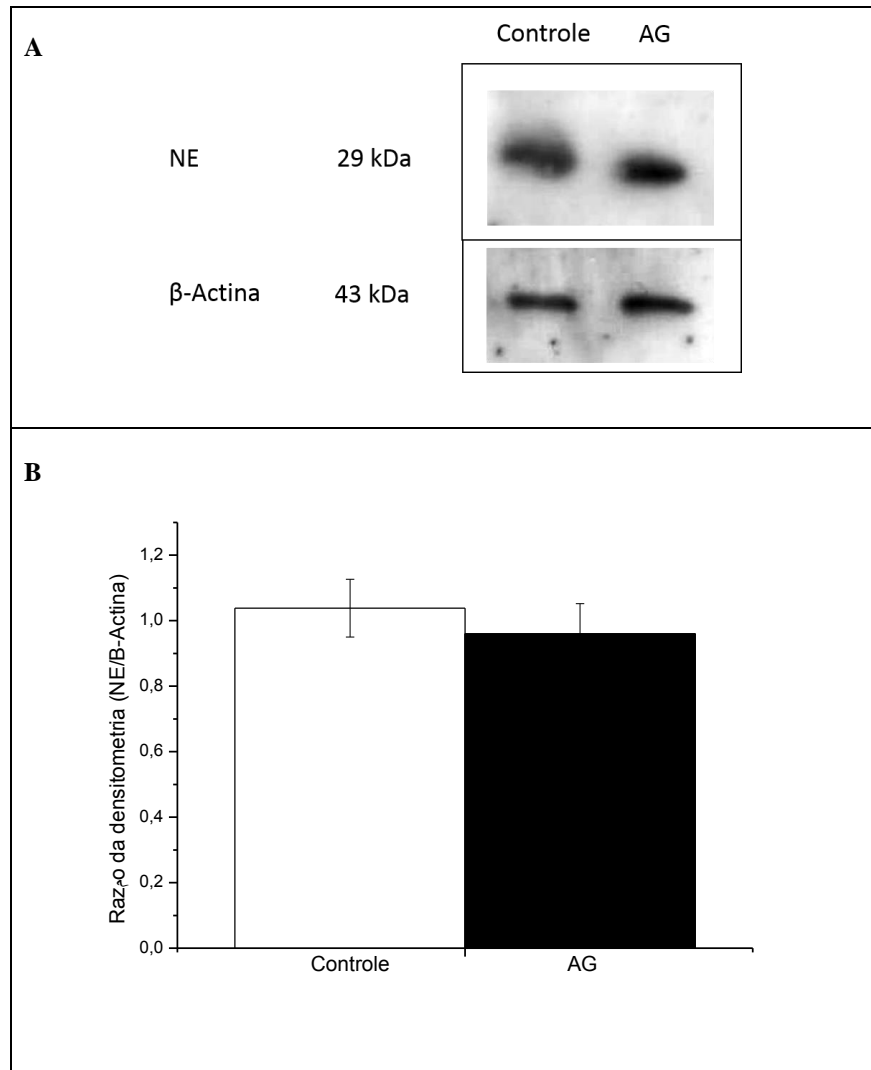


Figura 17 - *Western blot* para avaliar a expressão de NE em grupo controle e grupo tratado com AG (0,5 mM).

Nota: (A) A banda correspondente da NE 29 kDa e a banda correspondente para β -Actina 43 kDa, usada como padrão de amostra, podem ser visualizadas. (B) Quantificação do *Western blot* pelo programa ImageJ®. Os gráficos de barras são expressos em média \pm SD de três experimentos independentes feitos em duplicata.

Fonte: Do Autor

Após a quantificação das bandas, observamos que a expressão da proteína NE em neutrófilos humanos não foi diferente entre o grupo controle e o grupo tratado com a AG (FIGURA 17B).

Diante destes resultados, podemos sugerir que o tratamento dos neutrófilos com a AG não interfere a expressão da proteína MPO e NE.

5.6 Conteúdo e distribuição da MPO e NE

Assim como nos resultados do *Western blotting*, a microscopia confocal mostrou que a expressão de MPO nos neutrófilos controle é semelhante ao dos neutrófilos tratados com AG, na ausência ou presença dos estímulos, e também a distribuição da enzima no citosol do neutrófilo não foi modificada pelo tratamento com a AG (FIGURAS 18A, B, C, D, E e F). Entretanto, os neutrófilos estimulados com PMA aparentemente liberam certo conteúdo de MPO para o espaço extracelular (FIGURAS 18C e D). As Figuras 18E e F mostram os neutrófilos com ZO fagocitados.

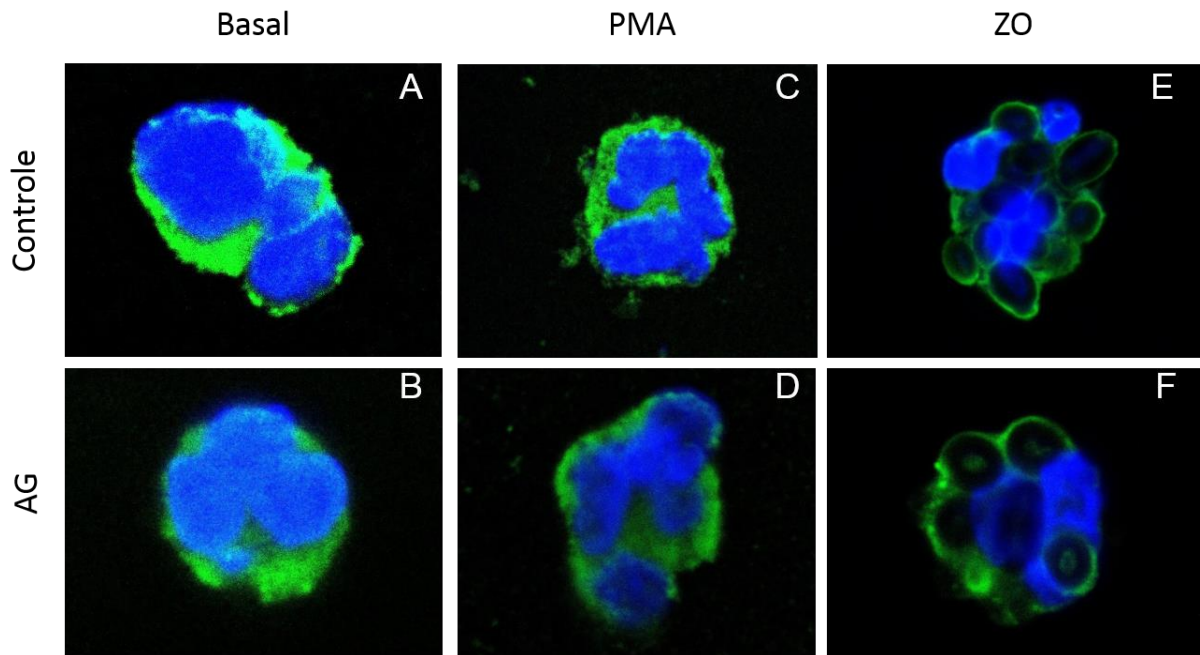


Figura 18 - Microscopia confocal para avaliar a expressão e a distribuição de MPO em grupo controle e grupo tratado com AG (0,5 mM).

Nota: Imunodeteção de MPO. Cada figura representa dez diferentes campos. Anticorpo anti-MPO com um anticorpo secundário conjugado a FITC, o qual floresce a 518 nm (verde), foi usado. O núcleo foi marcado com DAPI (azul). 100x em imersão. (A e B) Neutrófilos não estimulados. (C e D) Neutrófilos estimulados com PMA (20 nM). (E e F) Neutrófilos estimulados com ZO (2×10^7 partículas/reação), por 4h a 37°C e 5% CO₂.

Fonte: Do Autor

Nas Figuras 19A, B, C, D, E e F podemos observar que a expressão e a distribuição da enzima NE no citosol dos neutrófilos controle é semelhante ao dos neutrófilos tratados com AG, com ou sem estímulos. Ao contrário da MPO, aparentemente, os neutrófilos estimulados com PMA não tiveram diferença na liberação de NE para o espaço extracelular (FIGURAS 19C e D). As Figuras 19E e F mostram os neutrófilos com ZO fagocitados.

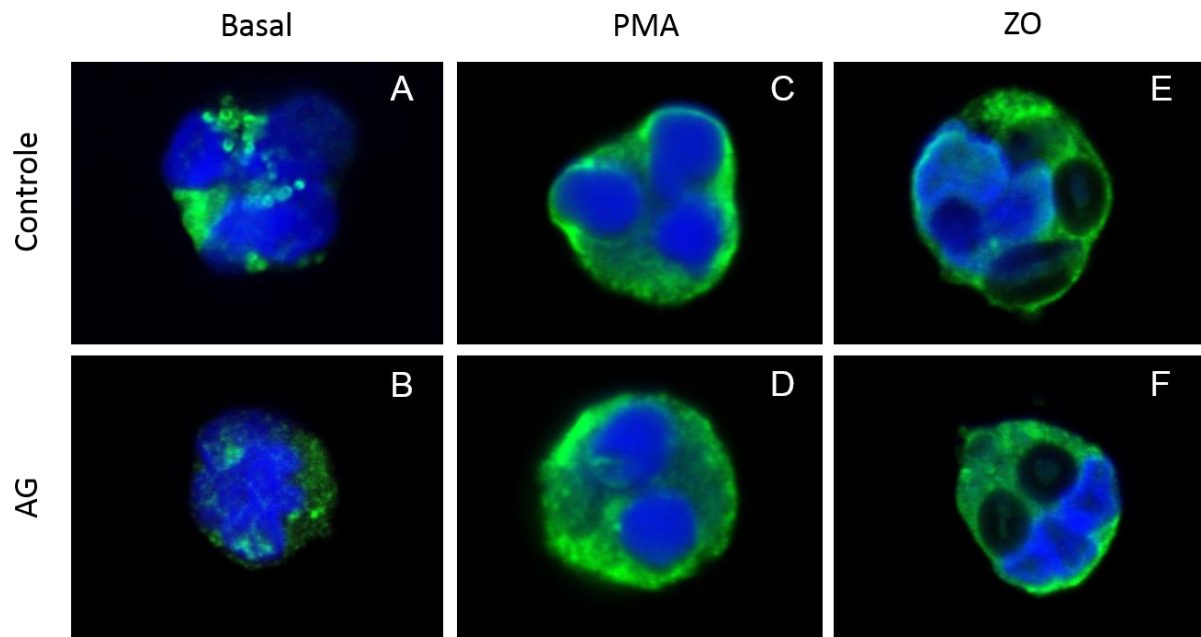


Figura 19 - Microscopia confocal para avaliar a expressão e a distribuição de NE em grupo controle e grupo tratado com AG (0,5 mM).

Nota: Imunodeteção de NE. Cada figura representa dez diferentes campos. Anticorpo anti-NE com um anticorpo secundário conjugado a FITC, o qual floresce a 518 nm (verde), foi usado. O núcleo foi marcado com DAPI (azul). 100x em imersão. (A e B) Neutrófilos não estimulados. (C e D) Neutrófilos estimulados com PMA (20 nM). (E e F) Neutrófilos estimulados com ZO (2×10^7 partículas/reação), por 4h a 37°C e 5% CO₂.

Fonte: Do Autor

6 CONCLUSÕES

De acordo com nossos resultados a AG não foi capaz de influenciar a atividade de cloração e basal da MPO, porém, observamos um aumento de ERO pelo tratamento com a AG no ensaio de neutrófilos estimulados e avaliados por quimiluminescência, o que nos permite propor várias atividades para MPO, ora como oxidativa (após estímulo), ora com uma atividade antioxidante. A atividade desta intrigante enzima irá depender da composição do meio fisiológico, dos tipos e da concentração dos substratos disponíveis. Ou ainda, esse resultado é o reflexo da atividade do sistema NOX2 (FERREIRA et al., 2016). Por outro lado, vimos que a AG não afetou a atividade de elastase.

Verificamos ainda, que a AG não influenciou a expressão e a distribuição das proteínas MPO e NE em neutrófilos.

Estes resultados em conjunto nos levam a sugerir que a AG aparentemente não influencia de forma direta no processo de degranulação de neutrófilos, uma vez que este processo é um mecanismo utilizado por fagócitos com o propósito de criar um ambiente totalmente hostil para patógenos invasores.

Desta forma, podemos considerar que a AG aumenta a capacidade microbicida de neutrófilos (FERREIRA et al., 2016) num mecanismo que independe da NE e da MPO na atividade convencional da enzima, ou seja, na produção de HOCl. A elucidação desta via se torna importante, especialmente em casos onde a função de neutrófilos está prejudicada, como no diabetes, uma vez que a AG melhora a resposta neutrofílica.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, P.; RABI, S. Protective effect of aminoguanidine against cyclophosphamide-induced oxidative stress and renal damage in rats. **Redox Report**, v. 16, n.1, p. 8-14, 2011.
- ALAM, S. R.; NEWBY, D. E.; HENRIKSEN, P. A. Role of the endogenous elastase inhibitor, elafin, in cardiovascular injury from epithelium to endothelium. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, p. 695-704, 2012.
- AMULIC, B. et al. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 30, p. 459-489, 2012.
- ANDERSON, T. et al. Cell surface expression of fMet-Leu-Phe receptors on human neutrophil. Correlation to changes in the cytosolic free Ca^{2+} level and action phorbol miristate acetate. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 79, n. 4, p. 1226-1233, 1987.
- ARNHOLD, J.; FLEMMIG, J. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, p. 92-106, 2010.
- BABIOR, B. M. The leukocyte NADPH oxidase. **Isr. Med. Assoc. J.**, Israel, v. 4 pt. 11, p. 1023-1024, 2002.
- BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arq. bras. endocrinol. metab.**, São Paulo, v. 52, n. 6, 2008.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol. rev.**, Bethesda, v. 87, pt.1, p. 245-313, Jan. 2007.
- BOGDAN, C. et al. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Curr. opin. immunol.**, Philadelphia, v. 12, pt.1, p. 64-76, 2000.
- BOYUM, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. **Scand. J. Immunol.**, Suppl 5, p. 9-15, 1976.

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

CHURG, A. et al. Late intervention with a myeloperoxidase inhibitor stops progression of experimental chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 185, p. 34-43, 2012.

DRESCHER, B.; BAI, F. Neutrophil in viral infections, friend or foe?. **Virus Research**, v. 171, p. 1-7, 2013.

DU, A. J. et al. Effects of aminoguanidine on retinal apoptosis in mice with oxygen-induced retinopathy. **Int. J. Ophthalmol.**, v. 6, n. 4, p. 436-441, ago. 2013.

EDWARDS, S. W. The O_2^- generating NADPH oxidase of phagocytes: structure and methods of detection. **METHODS: A Companion to Methods in Enzymology**, v. 9, p. 563–577, 1996.

ENGELLEN, L.; STEHOUWER, C. D. A.; SCHALKWIJK, C. G. Current therapeutic interventions in the glycation pathway: evidence from clinical studies. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 15, n. 8, p. 677-689, 2013.

E NICO, E. T. M. et al. The action of aminoguanidine on the liver of trained diabetic rats. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, 2013.

FERREIRA, C. et al. Neutrophil dysfunction induced by hyperglycemia: modulation of myeloperoxidase activity. **Cell. Biochem. Funct.**, v. 30, n. 7, p. 604-610, 2012.

FERREIRA, C. et al. Aminoguanidine treatment increased NOX2 response in diabetic rats: Improved phagocytosis and killing of *Candida albicans* by neutrophils. **European Journal of Pharmacology**, v. 772, p. 83–91, 2016.

FERREIRA, et al. **Elucidação da via de aumento da atividade de NOX2 por biguanidinas e suas implicações na função microbicida de neutrófilos.** Dados da tese em andamento. Tese (Doutorado em fisiologia). Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais.

FRANCISCHETTI, I. et al. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperfusão. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.**, v. 25, n.4, p. 575-584, 2010.

FENG, L. et al. Inhibition of Human Neutrophil Elastase by Pentacyclic Triterpenes. **PLOS ONE**, v. 8, p. 1-11, 2013.

FURTMÜLLER, P. G. et al. Redox properties of the couples compound I/compound II and compound II/native enzyme of human myeloperoxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 301, p. 551-557, 2003.

FUZZISSAKI, C. N. **Estudo da modulação de funções efetoras de neutrófilos humanos por derivados cumarínicos**: avaliação do efeito biológico sobre a produção de espécies reativas de oxigênio e desgranulação. 2009. 42f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

GIARDINO, I. et al. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. **Diabetes**, New York, v. 47, pt. 7, p. 1114-1120, 1998.

GOH, S. Y.; COOPER, M. E. Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 93, p. 1143-1152, 2008.

GRANTHAM, R. P. W. Myeloperoxidase-dependent lipid peroxidation promotes the oxidative modification of cytosolic proteins in phagocytic neutrophils. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 15, p. 9896- 9905, 2015.

HEINECKE, J. W. Oxidative stress: new approaches to diagnosis and prognosis in atherosclerosis. **Am. J. Cardiol.**, v. 91, p. 12A-16A, 2003.

HOPE, H. R. et al. Large-Scale Purification of Myeloperoxidase from HL60 Promyelocytic Cells: Characterization and Comparison to Human Neutrophil Myeloperoxidase. **Protein Expression and Purification**, v. 18, p. 269-276, 2000.

JOHANSSON, S. et al. A Neutrophil Multitarget Functional Bioassay to Detect Anti-inflammatory Natural Products. **J. Nat. Prod.**, v. 65, p. 32-41, 2002.

KABEYA, L. M. et al. 4-Methylcoumarin Derivatives Inhibit Human Neutrophil Oxidative Metabolism and Elastase Activity. **J Med Food**, v.16, n.8, p. 692-700, 2013a.

KABEYA, L. M. et al. 7-Hydroxycoumarin modulates the oxidative metabolism, degranulation and microbial killing of human neutrophils. **Chemico-Biological Interactions**, v. 206, p. 63-75, 2013b.

KARLI, R. et al. Analysis of the protective biochemical and pathologic effects of aminoguanidine on an experimental aspiration pneumonitis model induced by bile acids. **Current Therapeutic Research**, v. 73, n. 6, p. 208-219, 2012.

KELSO, B. G. et al. Pyridoxine restores endothelial cell function in high glucose. **Metab. Syndr. Relat. Disord.**, v. 9, n. 1, p. 63-68, 2011.

KETTLE, A. J. et al. Reactions of Superoxide with Myeloperoxidase. **Biochemistry**, v.46, p. 4888-4897, 2007.

KETTLE, A. J. et al. Spectral and kinetic evidence for reaction of superoxide with compound I of myeloperoxidase. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, p. 2190-2194, 2011.

KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Influence of superoxide on myeloperoxidase kinetics measured with a hydrogen peroxide electrode. **Biochem. J.**, v. 263, p. 823-828, 1989.

KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 502-512, 1994.

KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. A kinetic analysis of the catalase activity of myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 40, p. 10204-10212, 2001.

KLEBANOFF, S. J. et al. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, p. 185-198, 2013.

KORKMAZ, B. et al. Neutrophil Elastase, Proteinase 3, and Cathepsin G as Therapeutic Targets in Human Diseases. **Pharmacological Reviews**, v. 62, n. 4, p. 726-759, 2010.

LACY, P. Mechanisms of Degranulation in Neutrophils. **Allergy, Asthma, and Clinical Immunology**, v. 2, n. 3, 2006.

LEVINE, A. P. et al. Alkalinity of neutrophil phagocytic vacuoles is modulated by HVCN1 and has consequences for myeloperoxidase activity. **PLOS ONE**, v. 10, n.4, p. 1-20, 2015.

LUO, Y. et al. Differential effects of selective and nonselective nitric oxide synthase inhibitors on the blood perfusion of ischemia-reperfused myocardium in dogs. **Med. Sci. Monit. Basic. Res.**, v. 19, p. 181-186, 2013.

MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 519–531, 2011.

MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C.A. The Multifaceted Functions of Neutrophils. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, p. 181-218, 2014.

MENDONÇA, P. S. B. et al. β -glucan induces reactive oxygen species production in human neutrophils to improve the killing of *Candida albicans* and *Candida glabrata* isolates from vulvovaginal candidiasis. **PLOS ONE**, v. 9, p. 1-14, 2014.

MEOTTI, F. C. et al. Urate as a physiological substrate for myeloperoxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 15, p. 12901-12911, 2011.

MESQUITA JR, D. et al. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. **Revista Brasileira de Medicina**, ago. 2008. Disponível em: <http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=4053>. Acesso em 17 abr. 2014.

OKADA, S. S. **Regulação cruzada entre peroxidases e indolamina 2, 3**. 2010. 165f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

OZTURK, A. et al. Beneficial effects of aminoguanidine on skin flap survival in diabetic rats. **Experimental Diabetes Research**, p. 1-8, 2012.

PARKER, H. et al. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, p. 841-849, 2012.

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

PAVELKOVA, M; KUBALA, L. Luminol-, isoluminol- and lucigenin-enhanced chemiluminescence of rat blood phagocytes stimulated with different activators. **Luminescence**, v. 19, p. 37–42, 2004.

PHILIS-TSIMIKAS, A. et al. Aminoguanidine has both pro-oxidant and antioxidant activity toward LDL. **Arterioscler. thrombos. vasc. biol.**, Dallas, v. 15, pt. 3, p. 367-376, 1995.

PINTO, R. S. et al. Inhibition of macrophage oxidative stress prevents the reduction of ABCA-1 transporter induced by advanced glycated albumin. **Lipids**, v. 47, p. 443-450, 2012.

RAYNER, B.S.; LOVE, D. T.; HAWKINS, C. L. Comparative reactivity of myeloperoxidase-derived oxidants with mammalian cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 71, p. 240-255, 2014.

RIBEIRO, J. K. C. et al. New properties of the soybean trypsin inhibitor: Inhibition of human neutrophil elastase and its effect on acute pulmonary injury. **European Journal of Pharmacology**, v. 644, p. 238-244, 2010.

RODRIGUES, M. R. et al. Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 292, p. 869-873, 2002.

ROSEN, H. et al. Methionine oxidation contributes to bacterial killing by the myeloperoxidase system of neutrophils. **PNAS**, v. 106, n. 44, p. 18686-18691, 2009.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. **Mem. Inst. Butantan.**, São Paulo, v. 20, p. 315-328, 1947.

SKAMURAUSKAS, J. T.; MCKAY, A. G.; HUNT, J. V. Aminoguanidine and its pro-oxidant effects on an experimental model of protein glycation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 21, n. 6, p. 801-812, 1996.

SLIMAN, S. et al. Hyperglycemic oxoaldehyde, glyoxal, causes barrier dysfunction, cytoskeletal alterations, and inhibition of angiogenesis in vascular endothelial cells: aminoguanidine protection. **Mol. cell. Biochem.**, The Hague, v. 333, n.1, p. 9-26, 2010.

SPICKETT, C. M. et al. The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids. **Acta. Biochem. Pol.**, v. 47, p. 889-899, 2007.

STAPELS, D. A. C; GEISBRECHT, B. V.; ROOIJAKKERS, S. H. M. Neutrophil serine proteases in antibacterial defense. **Current Opinion in Microbiology**, v. 23, p. 42-48, 2015.

STEFFEN, Y. et al. Cigarette smoke and LDL cooperate in reducing nitric oxide bioavailability in endothelial cells via effects on both eNOS and NADPH oxidase. **Nitric Oxide**, v. 27, p. 176-184, 2012.

THORNALLEY, P. J. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. **Arch Biochem Biophys**, v. 419, n. 1, p. 31-40, 2003.

WANG, Y. et al. Hypochlorous Acid Generated by Neutrophils Inactivates ADAMTS13. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 3, p. 1422- 1431, 2015.

WINTERBOURN, C. C.; GARCIA, R. C; SEGAL, A. W. Production of the superoxide dduct of myeloperoxidase (compound III) by stimulated human neutrophils and its reactivity with hydrogen peroxide and chloride. **Biochem. J.**, v. 228, p. 583-592, 1985.

WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J. Redox Reactions and Microbial Killing in the Neutrophil Phagosome. **Antioxidants e Redox Signaling**, v. 18, n. 6, p. 642-660, 2013.