UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
20967

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

14/02/05

karineh.

lilacs.

Dodatus: 14/28439

DBDCA: 26757

Terminal OK

MAÍSA RIBEIRO PEREIRA LIMA BRIGAGÃO

**ESTUDO DO PROCESSO DE S-GLUTATIONAÇÃO
PROTÉICA NO “BURST” RESPIRATÓRIO DE
LEUCÓCITOS: MODULAÇÃO PELA LACTONA
SESQUITERPÊNICA LICNOFOLIDO**

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADOR: PROF. DR. PIO COLEPICOLO NETO

São Paulo, 2004.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Brigagão, Máisa Ribeiro Pereira Lima
B854e Estudo do processo de s-glutathionação protéica no
“burst” respiratório de leucócitos: modulação pela lactona
sesquiterpênica licnofolida / Máisa Ribeiro Pereira Lima
Brigagão. - São Paulo, 2004.
140p

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador : Colepicolo Neto, Pio

1. Espécies reativas de oxigênio no ser vivo : Bioquímica
2. Glutathione : Bioquímica I. T. II. Colepicolo Neto, Pio,
orientador.

574.1921 CDD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

MAÍSA RIBEIRO PEREIRA LIMA BRIGAGÃO

Estudo do processo de S-glutathionação
protéica no “BURST” respiratório de
leucócitos: modulação pela lactona
sesquiterpênica licnofolido

Tese de Doutorado submetida ao
Instituto de Química da Universidade de São Paulo
como parte dos requisitos necessários à obtenção
do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.

ORIENTADOR: PROF. DR. PIO COLEPICOLO NETO

São Paulo, 2004.

***“Estudo do processo de S-glutinação
protéica no “Burst” respiratório de
leucócitos: modulação pela lactona
sesquiterpênica licnofolido”***

MAÍSA RIBEIRO PEREIRA LIMA BRIGAGÃO

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovado(a) por:

Prof. Dr. PIO COLEPICCOLO NETO
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. OHARA AUGUSTO
IQ – USP

Profa. Dra. VIRGINIA BERLANGA CAMPOS JUNQUEIRA
UNIFESP

Prof. Dr. FRANCISCO RAFAEL MARTINS LAURINDO
INCOR

Prof. Dr. LUIS EDUARDO SOARES NETTO
IB – USP

SÃO PAULO
30 DE SETEMBRO 2004

*Dedico este trabalho ao Mateus,
uma criança que veio para
tornar minha vida melhor.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. Pio Colepicolo Neto, pela sua confiança durante toda a realização desse trabalho;

Aos meus colegas de laboratório, Adriana, Ana Maria, Ângela, Antonieta, Ernani, Humberto, Karina, Marcelo, Moacir, Paula, Sara, Taís, Teresa, Vanessa, pela amizade e pelo convívio diário no laboratório;

À Amanda Latércia Tranches Dias, Sara Cristina Gonçalves Campos e Paula Kujbida, pessoas especiais com quem tive o privilégio de conviver como minhas alunas de graduação e como minhas colegas de pós-graduação;

Aos técnicos Ednaílson Pereira de Carvalho e Sandra Souza, pela manutenção do laboratório e aos técnicos do Biotério do Instituto de Química, pela atenção e disponibilidade que sempre demonstraram;

Ao Professor Dr. Norberto Peporine Lopes, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, por ceder o composto em estudo nesta tese e pela ajuda em muitos experimentos e em trabalhos publicados;

Ao Professor Dr. Etelvino J. H. Bechara, por permitir o uso de reagentes e equipamentos de seu laboratório na execução deste trabalho;

À Professora Dra. Ana Campa, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela ajuda valiosa em muitos experimentos;

Às Professoras Denise Aparecida Corrêa Moreira, Dra. Lira Celeste Alves e Terezinha D'Ávila e Silva Nunes, da disciplina de Bioquímica da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas-Centro Universitário Federal, por assumirem minhas funções docentes durante meu afastamento para realizar este trabalho;

Ao Instituto de Química da USP, pela oportunidade da execução deste trabalho;

À Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas-Centro Universitário Federal, pela liberação concedida das minhas funções docentes;

À CAPES, pela concessão da bolsa de Doutorado e à FAPESP, pelo apoio financeiro essencial;

Aos meus familiares, em especial meu irmão Hélio, que me ajudou em muitas etapas dessa tese e me escutou em momentos difíceis, registro aqui um agradecimento especial.

RESUMO

Foi estudado o efeito da lactona sesquiterpênica licnofolido sobre o “burst” respiratório de leucócitos polimorfonucleares inflamatórios (PMN) estimulados por forbol (PMA), pelo peptídeo quimiotático fMLP ou zimozan opsonizado (OZ). O licnofolido inibiu de forma dose-dependente a liberação de $O_2^{\bullet-}$ pelos PMN, sem alteração do período “lag” do complexo NADPH oxidase. O efeito foi mais acentuado quando os PMN foram estimulados diretamente pela via de proteína quinase C. A adição de ditiotreitol ou glutathione reduzida (GSH) às suspensões celulares antes da incubação com licnofolido preveniu parcialmente o efeito inibitório. O tratamento dos PMN com a lactona determinou uma queda drástica dos níveis celulares de GSH livre, sem incremento de glutathione oxidada (GSSG). A reação direta entre GSH e licnofolido foi confirmada com a detecção de um aduto glutathionil-licnofolido através de identificação por espectrometria de massa (ESI-MS/MS). A S-tiologia protéica induzida pelo PMA foi reduzida em PMN tratados com licnofolido, como detectado através de determinação de incorporação de [^{35}S], sendo que 80% desses tióis foram identificados como GSH. Uma série de proteínas S-glutathionadas foi detectada através de autoradiografias, sendo que aquelas correspondentes a 38 e 24 kDa tiveram essa modificação pós-traducional suprimida pelo tratamento com dose de licnofolido capaz de suprimir o “burst” respiratório dos PMN. Estes resultados indicam que a depleção celular de GSH causada pelo licnofolido impede a sustentação do “burst” respiratório pelos PMN, em correlação direta com a diminuição de S-glutathionação protéica.

ABSTRACT

An investigation was made into the action of the sesquiterpene lactone lychnopholide on the respiratory burst of inflammatory polymorphonuclear leukocytes. Lychnopholide determined concentration-related inhibition of the generation of phorbol 12-myristate 13-acetate-, chemotactic peptide-, and opsonized zymozan-induced superoxide anion with no effect on the lag time of the assembly of the NADPH oxidase complex, such action was greater on the protein kinase C pathway than on both membrane receptor dependent stimuli via. Subsequent additions of D-glucose, Ca^{2+} , Mg^{2+} , dithiothreitol or reduced glutathione (GSH) did not reverse the inhibitory action. The addition of both thiols prior to the lychnopholide treatment partially hindered the inhibition rate. The endogenous level of GSH in leukocytes was drastically depleted under the lychnopholide treatment, without corresponding increases occurring in the oxidized form (GSSG). A direct reaction between glutathione and lychnopholide was confirmed from a glutathionyl-lychnopholide adduct detected by electrospray mass spectrometry analysis and identified by tandem mass analysis in cellular extracts. Protein S-thiolation induced by PMA stimulation was decreased in lactone-treated PMN as detected by [^{35}S] scintillation count, which indicated that about 80% of the thiols were glutathione. A subset of S-glutathionylated proteins was identified through gel electrophoresis, which revealed that the modification of the phorbol-triggered protein sulfhydryl in the protein bands corresponding to 38 and 24 kDa was precluded by the lychnopholide treatment correlated with respiratory burst inhibition. These results show that GSH depletion determined by lychnopholide treatment renders PMN to sustain respiratory burst, whose action is proportional to protein S-glutathionylation decrease.

ABREVIATURAS

ATP: adenosina tri-fosfato
cAMP: adenosina monofosfato cíclico
CGD: doença granulomatosa crônica
cit c: ferrocitocromo c
cpm: contagem por minuto
DAG: diacilglicerol
DMSO: dimetilsulfóxido
DTNB: 5-5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico
DTT: ditioneitol
D-PBS-G: tampão fosfato salino contendo 1,35 mg D-glicose/mL
EDTA: ácido etileno diamino tetracético
ERN: espécies reativas de nitrogênio
ERO: espécies reativas de oxigênio
ESI: ionização por "electrospray"
FAD: flavina adenina dinucleotídeo (oxidada)
GSH: glutationa reduzida
GSSG: glutationa oxidada
h: hora
HPLC: "high performance liquid chromatography"
fMLP: formil metionil-leucil-fenilalanina
IP₃: inositol tri-fosfato
LPS: lipopolissacarídeo bacteriano
min: minuto
MPO: mieloperoxidase
MS: espectroscopia de massa
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzida)
NADP⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidada)
NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzida)
NEM: N-etilmaleimida
NMR: ressonância magnética nuclear
OZ: zimosan opsonizado
PBS: tampão fosfato salino
PKC: proteína quinase C
PMA: forbol 12-miristato 13-acetato
PMN: leucócitos polimorfonucleares
PMSF: fluoreto de fenilmetionilsulfonila
s: segundo
SDS: dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE: "denaturing polyacrylamide gel electrophoresis"
SOD: superóxido dismutase
MS/MS: sistema "tandem" de espectroscopia de massa
TNB: 5-tio-2-nitrobenzoato

ÍNDICE

1.INTRODUÇÃO	01
1.1.O processo inflamatório	01
1.2.O sistema NADPH oxidase de fagócitos	04
1.3.Espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio produzidas por PMN	09
1.4.Mecanismos de ativação do complexo NADPH oxidase de fagócitos	12
1.5.Processo de modificações protéicas pós-traducionais por S-glutathionação	20
1.6.Lactonas sesquiterpênicas	25
1.7.Lactonas sesquiterpênicas como compostos potencialmente antiinflamatórios	29
2.OBJETIVOS	32
3.MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1.Determinação da liberação de $O_2^{\bullet-}$ e do período “lag” de PMN	33
3.1.1.Isolamento de PMN	33
3.1.2.Ativação do “burst” respiratório de PMN	34
3.1.3.Determinação do período “lag” de PMN	35
3.1.4.Testes de viabilidade celular	36
3.1.5.Teste de redução do citocromo c pelo licnofolido	37
3.1.6.Teste de reação direta do licnofolido com $O_2^{\bullet-}$	38
3.2.Determinação do consumo de oxigênio por PMN	38
3.3.Efeito <i>ex vivo</i> de licnofolido sobre o “burst” respiratório, período “lag” e consumo de oxigênio por PMN	39
3.3.1.Obtenção de licnofolido	39
3.3.2.Ação do licnofolido sobre a ativação e sustentação da atividade do complexo NADPH oxidase	39

3.4. Estudo da prevenção e reversibilidade do efeito de lcnofolido sobre o “burst” respiratório de PMN	40
3.5. Estudo do mecanismo de inibição do “burst” respiratório de PMN por lcnofolido	41
3.5.1. Determinação de GSH e GSSG	41
3.5.2. Detecção do aduto glutationil-lcnofolido por ESI-MS e identificação por ESI-MS/MS	42
3.5.3. Determinação de modificações protéicas por S-glutonação durante o “burst” respiratório de PMN	44
3.5.3.1. Marcação do “pool” de tióis celulares	44
3.5.3.2. Separação de tióis solúveis e tióis ligados à fração protéica	45
3.5.3.3. Identificação dos tióis ligados à fração protéica em PMN	46
3.5.3.4. Separação eletroforética e análise das proteínas S-glutonaadas	47
3.6. Análise estatística	48
4. RESULTADOS	50
4.1. População fagocitária de focos inflamatórios agudos peritoneais	50
4.2. Inibição do “burst” respiratório de PMN por lcnofolido: estudo das diferentes vias bioquímicas de estimulação do complexo NADPH oxidase	51
4.2.1. Estímulo pela via de PKC	51
4.2.2. Estímulos através de ligação a receptores de membrana	52
4.3. Viabilidade celular de PMN inflamatórios tratados com lcnofolido	57
4.4. Capacidade de reação com citocromo c e de dismutação direta de $O_2^{\bullet-}$ por lcnofolido	58
4.5. Ação de lcnofolido sobre o período “lag” de PMN inflamatórios	60
4.6. Consumo de O_2 por PMN inflamatórios sob diferentes estímulos para liberação de $O_2^{\bullet-}$ e efeito do lcnofolido	62
4.7. Efeito da suplementação de D-glicose, Ca^{2+} , Mg^{2+} , DTT e GSH sobre a inibição do “burst” respiratório de PMN por lcnofolido	65

4.8.Níveis de GSH e GSSG em PMN inflamatórios	70
4.9.Detecção e identificação do aduto glutationil-licnofolido <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i>	74
4.10.S-glutatação protéica em PMN	79
4.10.1.Distribuição do “pool” de tióis celulares em PMN estimulados com PMA e efeito do licnofolido	79
4.10.2.Identificação dos tióis associados à fração protéica e alterações causadas pelo tratamento com o licnofolido	82
4.10.3.Separação de proteínas S-glutacionadas em PMN e análise da ação do licnofolido	85
5.DISCUSSÃO	89
5.1.Ativação e atividade do complexo NADPH oxidase fagocitário induzidas por diferentes estímulos	89
5.2.Inibição do “burst” respiratório de PMN pelo licnofolido	91
5.2.1.Mecanismos de inibição do complexo NADPH oxidase	91
5.2.2.Ação do licnofolido como inibidor do complexo NADPH oxidase fagocitário	94
5.2.3.Estudo comparativo da ação do licnofolido sobre as diferentes vias bioquímicas de estimulação da NADPH oxidase fagocitária	95
5.3.Diminuição do consumo de oxigênio por PMN determinada pelo licnofolido	100
5.4.Prevenção do efeito inibitório do licnofolido sobre o “burst” respiratório de PMN por DTT e GSH	102
5.5.Depleção de GSH livre em PMN determinada pelo licnofolido	105
5.6.Formação do aduto glutationil-licnofolido	108
5.7.Efeito do licnofolido sobre a S-glutatação protéica em PMN estimulada por PMA	111
6.CONCLUSÕES	118
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

1. INTRODUÇÃO

1.1.O processo inflamatório

No decurso de milhões de anos de evolução, os animais vertebrados desenvolveram elaborados sistemas de defesa contra a invasão de patógenos, onde os fagócitos profissionais (neutrófilos ou leucócitos polimorfonucleares [PMN], eosinófilos e fagócitos mononucleares) desempenham um papel essencial para a sobrevivência do organismo. Estas células sanguíneas da série branca são capazes de reconhecer, fagocitar, matar e eliminar a maioria dos agentes patogênicos que invadem um hospedeiro através do processo inflamatório (Babior, 2000). Este processo fisiológico pode ser desencadeado por agentes biológicos, químicos ou físicos, sendo sua classificação proposta basicamente em dois grandes grupos: inflamação aguda e inflamação crônica (Mizel & Jarret, 1985; David, 1992; Salyers & Whitt, 1994).

Na inflamação aguda, que possui curta duração (até 48 horas após o reconhecimento do agente estranho ao organismo), há ocorrência de vários eventos rápidos no sítio de injúria, os quais seguem um curso bastante uniforme. Diferentes tipos e graus de injúria podem, no entanto, modular a magnitude das respostas inflamatórias, com interações complexas entre células alvo e células efectoras. Estes eventos incluem profundas alterações na permeabilidade vascular e ativação de um grande número de reações enzimáticas e imunológicas. As células fagocitárias mobilizadas neste processo sofrem exsudação por marginação, seguida pela adesão celular sobre o endotélio vascular através de moléculas situadas na superfície de leucócitos e de células endoteliais, as selectinas. Estas células migram para o local de injúria atraídas por agentes quimiotáticos liberados pelo agente agressor

(exógenos) ou por células presentes no local (endógenos), aderindo, então, firmemente ao endotélio através de integrinas. Estas reações são mediadas por produtos celulares como leucotrienos, metabólitos de oxigênio, prostaglandinas, componentes do sistema complemento e citocinas diversas (Takada & Cohen, 1986; Salyers & Whitt, 1994, Halliwell & Gutteridge, 1999).

Os PMN são células com uma vida extremamente curta (6-7 horas na circulação sanguínea), e desempenham um papel crucial na defesa do hospedeiro contra agentes invasores por serem as primeiras a migrar para o foco inflamatório. Perfazem cerca da metade da série branca circulante, e têm origem a partir de células-tronco hematopoiéticas que, durante o processo de maturação, sofrem diferenciação e multiplicação celular estritamente reguladas pelo microambiente bioquímico da medula óssea (Burg & Pillinger, 2001).

Se o fator lesivo ao organismo não for eliminado pelos PMN, ocorre então recrutamento de monócitos circulantes, que se infiltram na área lesada e diferenciam-se em macrófagos, caracterizando a inflamação crônica. Esta origina-se em resposta à continuidade da inflamação aguda ou como resposta à exposição prolongada e de baixa intensidade a agentes agressores. Além de macrófagos, no local de injúria ocorre a infiltração de linfócitos, paralelamente à proliferação de vasos sanguíneos e tecido conjuntivo. O acúmulo de macrófagos ocorre através da liberação de fatores quimiotáticos e proliferação por mitose. A ação destes fagócitos mononucleados é modulada por uma vasta gama de fatores liberados pelos próprios fagócitos e por células endoteliais (Mizel & Jaret, 1985; Camarero *et al.*, 1990).

A sequência de eventos na qual as células fagocitárias reconhecem e eliminam agentes estranhos ao organismo é bem conhecida, tendo sido reportada pela primeira vez nos anos finais de 1800 por um cientista russo, Ellie Metchnikoff (Metchnikoff, 1883, citado *in* Babior, 2000) constituindo o processo de fagocitose. Nesse processo, agentes estranhos ao organismo,

após o engolfamento pela membrana plasmática dos fagócitos com formação do fagossoma, são internalizados e destruídos. A capacidade de “killing” dos fagócitos baseia-se em dois mecanismos distintos, onde a produção de espécies químicas oxidantes (mecanismo oxidativo) associa-se à liberação de proteínas digestivas e microbidas (mecanismo não-oxidativo) no fagossoma.

O mecanismo não oxidativo, que ocorre através da degranulação, consiste na liberação dos conteúdos de grânulos específicos no fagossoma. Os grânulos primários ou azurofílicos de PMN contêm mieloperoxidase (MPO), lisozima, diferentes proteases, como as serino-proteases catepsina G e elastase, além de diversas proteínas catiônicas, enquanto os grânulos secundários ou específicos têm como parte de seu conteúdo cobalofilina e lactoferrina, proteínas ligadoras de vitamina B₁₂ e ferro, respectivamente, além de lisozima e elastase. Os grânulos terciários são conhecidos pela matriz pobre em proteases, das quais a mais importante é a gelatinase (Burg & Pillinger, 2001).

A liberação do conteúdo granular no fagossoma é dependente de sinalização específica, e desempenha papel importante na capacidade microbicida de PMN. Microorganismos diferentes apresentam susceptibilidades diversas às ações dos conteúdos granulares. *Candida albicans* é um fungo capaz de sobreviver em fagossomas de PMN provenientes de camundongos cuja codificação genética para catepsina G foi silenciada; diferentemente, *Streptococcus aureus* são mortos nos fagossomas dos mesmos PMN. O contrário ocorre quando o gene codificador para elastase é silenciado por manipulação genética, o que determina morte de *C. albicans* e sobrevivência de *S. aureus* no fagossoma de PMN (Reeves *et al.*, 2002). A sensibilidade diferente destes microorganismos à ação de proteases liberadas no fagossoma é atribuída à composição diversa de suas paredes e/ou membranas celulares, além do fato de que metaloproteinases liberadas por PMN, como colagenases

e gelatinases, podem ser inibidas por produtos secretados diferencialmente por microorganismos, bem como por inibidores endógenos do próprio hospedeiro, como α 2-macroglobulina (Zhang *et al.*, 1997; Halliwell & Gutteridge, 1999; Reeves *et al.*, 2002).

Durante a fagocitose, a saída de prótons do citossol de PMN para o vacúolo fagocítico, concomitante ao fluxo de íon potássio que ocorre na mesma direção, determina uma alta hipertonicidade devida à concentração deste cátion (300 mM), estabelecida principalmente pela relação massa eletrolítica/volume do fagossoma. O consumo de prótons no fagossoma sustenta o pH alto o suficiente para permitir que as proteases dos grânulos, firmemente aderidas à matriz de proteoglicanos sulfatados aniônicos, sejam solubilizadas no lúmen fagossomal e entrem em atividade catalítica máxima. Esta tonicidade vacuolar tende a se manter por certo tempo devido à presença de proteínas do citoesqueleto do PMN. A entrada de água por compensação osmótica posterior tende a dissolver as proteases vacuolares, diminuindo sua atividade. Este último efeito pode ser abolido pelo microorganismo fagocitado, se o mesmo libera compostos capazes de quebrar a integridade do citoesqueleto de PMN (Reeves *et al.*, 2002; Roos & Winterbourn, 2002; De Coursey *et al.*, 2003).

O mecanismo microbicida oxidante de fagócitos ocorre através de uma produção abrupta de espécies reativas de oxigênio (ERO) no fagossoma, através da ativação de um sistema enzimático denominado NADPH oxidase.

1.2.O sistema NADPH oxidase de fagócitos

O envolvimento de produtos oxigenados na capacidade dos fagócitos profisisonais matarem microorganismos invasores foi sugerido pela primeira

vez em 1935 (Baldrige & Gerard, 1935 citado *in* Babior, 2000) e definitivamente estabelecido por Karnovsky e colaboradores na década de 50 (Sbarra & Karnovsky, 1959), que mostraram que a capacidade de “killing” fagocitária ocorria com grande consumo de oxigênio dissociado da cadeia respiratória. Desde então, uma vasta gama de publicação mostrou que o consumo de oxigênio por essas células resultava na produção de espécies químicas oxidantes que agem como microbicidas potentes. A primeira dessas espécies formadas é o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), produzido através de um sistema enzimático denominado complexo NADPH oxidase. Sabe-se que a enzima chave deste processo, uma piridina nucleotídeo oxidase, opera tanto com NADPH ($K_M \cong 30\mu M$) quanto com NADH ($K_M \cong 200\mu M$) como doadores de elétrons (Glass *et al.*, 1986). A alta afinidade ($K_M \cong 10\mu M$) com o oxigênio molecular, oceptor final de elétrons na reação, permite confirmar que este complexo produz $O_2^{\bullet-}$ nas baixas tensões de oxigênio que prevalecem nas células de tecidos aeróbicos infectadas por agentes invasores (Morel *et al.*, 1991; Babior, 1992). A catálise ocorre com aumento abrupto do consumo de oxigênio não relacionado à respiração celular, aumento da velocidade da via de hexose-monofosfato e mudança do potencial de membrana. Este evento, denominado “burst” respiratório ou “burst” oxidativo, ocorre de acordo com a seguinte estequiometria:

A importância deste sistema enzimático é claramente mostrada nos pacientes portadores de doença granulomatosa crônica (CGD), que, devido a mutações autossômicas ou ligadas ao cromossomo X, não possuem capacidade de produzir quantidades normais de $O_2^{\bullet-}$ pelos PMN, estando, então, sujeitos a infecções recorrentes durante toda a vida (Baehner *et al.*,

1986; Babior, 1992; Hampton *et al.*, 1998; Segal *et al.*, 2000).

Em células não estimuladas, o sistema NADPH oxidase está dormente e dissociado, com componentes presentes tanto no citossol quanto na membrana de grânulos secretórios. A ativação do “burst” respiratório envolve profundas mudanças de localização e atividade de diferentes componentes deste complexo enzimático (Borregaard & Tauber, 1984; Babior, 1988; Babior, 2004; Segal & Abo, 1993).

O primeiro componente descrito como associado à membrana foi o citocromo b_{245} , na década de 60 (Hatori, 1961; Shinagawa *et al.*, 1966). Posteriormente, suas subunidades foram identificadas como duas proteínas, $gp91^{phox}$ e $p22^{phox}$, que, juntas, formam a hemeproteína redenominada citocromo b_{558} , que apresenta um baixo potencial de redução (-245 mV). A proteína $gp91^{phox}$ consiste de um polipeptídeo catiônico de 53-56 kDa, com três segmentos transmembrana, glicosilados com oligossacarídeos de manose N-ligados, posicionados no lado externo da membrana plasmática (Dinauer *et al.*, 1987; Parkos *et al.*, 1987; Parkos *et al.*, 1988; Isogai *et al.*, 1991). A outra subunidade do citocromo b_{558} , a proteína não glicosilada $p22^{phox}$, apresenta apenas um domínio hidrofóbico que constitui sua região transmembrana. Considerado o doador final de elétrons no complexo NADPH oxidase, o citocromo b_{558} que encontra-se em membranas de grânulos secretórios em células não estimuladas (Kobayashi *et al.*, 1998), apresenta dois grupamentos heme, sendo um deles posicionado entre as subunidades $gp91^{phox}$ e $p22^{phox}$, posição não usual para proteínas desta classe, e outro ligado às histidinas 94 e 116 da $p22^{phox}$, posição semelhante àquelas ocorrentes em outras hemeproteínas como mioglobina e citocromo b_5 . O sítio de ligação de FAD no citocromo b_{558} foi também detalhadamente estudado, mostrando seqüência de aminoácidos similar à de outras flavoproteínas. A presença da proteína Rap 1A, existente na membrana dos grânulos secretórios, sugere a participação da

mesma na montagem do complexo, dirigindo a fusão da membrana desses grânulos à membrana plasmática, na região de formação do fagossoma (Jesaitis *et al.*, 1991; Rotrosen *et al.*, 1992; Kobayashi *et al.*, 1998).

Entre os componentes citossólicos da NADPH oxidase, um grupo de fosfoproteínas de migração relativa entre 45-49 kDa foram identificados. Estas proteínas foram extensamente estudadas, e hoje são designadas $p47^{\text{phox}}$, sendo que, em recentes estudos, são mostradas como oito isoformas de fosfoproteínas com pI na faixa de 6,8 a 10, com um único precursor não fosforilado que pode ser detectado por "immunoblotting" (Rotrosen & Leto, 1990). Encontrada exclusivamente no citossol em PMN não estimulados, a $p47^{\text{phox}}$ é parcialmente transferida para a membrana quando as células recebem diferentes estímulos que determinam a produção de $O_2^{\bullet-}$. Sua estrutura primária mostra uma região carboxiterminal extremamente básica, com muitos resíduos de serina como potenciais sítios de fosforilação, bem como regiões de sequência de aminoácidos similares à da proteína ativadora de GTP-ase, tirosina quinase *src* (Lomax *et al.*, 1989; Volpp *et al.*, 1989).

Um segundo componente citossólico desta oxidase, denominado $p67^{\text{phox}}$, também sofre translocação do citossol para a membrana quando PMN são ativados. Evidências sugerem que esta proteína interage com lipídeos de membrana durante a ativação da NADPH oxidase, ligando-se ao citoesqueleto através de sua região carboxiterminal sendo esta ligação à membrana mediada por um segmento altamente hidrofóbico (Arg-Gli-Val-His-Phe-Ile-Phe) da cadeia pesada do citocromo b_{558} (Leto *et al.*, 1990; Babior, 1992; Babior *et al.*, 2002; Van Bruggen *et al.*, 2003).

Mais recentemente, a investigação da função da proteína citossólica $p40^{\text{phox}}$ no complexo NADPH oxidase, foi mostrada tanto como estimulatória quanto como inibitória no processo de liberação de $O_2^{\bullet-}$ por PMN, após fosforilação em resíduos de serina e treonina em sua estrutura. Lopes *et al.*

(2004) postulam sua ação como um regulador negativo da atividade do complexo enzimático, paralelamente à fosforilação do resíduo 154 de treonina pela proteína quinase C (PKC).

Adicionalmente, isoformas de proteínas ligadoras de nucleotídeos de guanina da família *Ras*, *Rac 1* e *Rac 2* (isoladas de macrófagos de ratos e de PMN humanos, respectivamente) foram mostradas como essenciais na atividade de NADPH oxidase. Estas se associam à membrana, e, paralelamente à proteína *Rap 1A*, regulam a polimerização da actina (Abo *et al.*, 1991; Diekmann *et al.*, 1994; De Leo & Quinn, 1996; Laudanna *et al.*, 1996; Leusen *et al.*, 1996; Babior, 1999; Segal *et al.*, 2000).

A Figura 1 mostra um esquema da montagem do sistema enzimático NADPH oxidase em membrana plasmática de fagócitos profissionais.

Figura 1. Complexo NADPH oxidase de fagócitos em repouso (esquerda) e ativado (direita), mostrando a mudança de localização celular dos diferentes componentes. Adaptado de Leusen *et al.*, 1996.

1.3.Espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio produzidas por PMN

A utilização do oxigênio através da cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa mitocondrial trouxe grandes vantagens metabólicas aos organismos. Sendo essencial para a manutenção da homeostasia orgânica dos seres aeróbicos, a redução do O_2 a H_2O neste processo ocorre através da transferência simultânea de quatro elétrons catalisada pela enzima citocromo oxidase. Entretanto, espécies geradas a partir da redução parcial do O_2 são constantemente produzidas, as quais participam ativamente de processos fisiológicos e patológicos do organismo. A quebra do equilíbrio entre a produção dessas ERO e os sistemas antioxidantes dos quais todo organismo aeróbico é dotado, leva ao estabelecimento do estresse oxidativo, onde a alta reatividade de ERO com lipídeos de membrana, com proteínas, bases e açúcares do DNA está diretamente relacionada com o estabelecimento de processos deletérios às células (Mello Filho & Meneghini, 1985; Halliwell & Gutteridge, 1999).

Embora sejam altamente reativas, com potencialidade deletéria ao organismo, essas ERO são toleradas e mesmo utilizadas, tanto por organismos procariotos quanto por eucariotos. Para tanto, concorrem a destruição espontânea e a degradação dessas espécies por enzimas especializadas, além da ação de vários metais e compostos antioxidantes de baixo peso molecular como tocoferol, ascorbato, carotenóides, bilirrubina e ácido úrico, entre outros (Sies, 1986; Cadenas, 1989; Di Mascio *et al.*, 1995; Halliwell & Gutteridge, 1999). A ação de ERO como compostos sinalizadores intra e intercelulares tem sido mostrada em células vegetais e animais. Nestas últimas, especialmente em fibroblastos e células de linfomas, sabe-se que diferentes estímulos como vírus e bactérias, forbóis e interleucinas são capazes de causar elevação na

quantidade de espécies oxidantes produzidas, o que induz uma expressão gênica diferenciada em resposta ao estado redox da célula (Kahn & Wilson, 1995; Rollet-Labelle *et al.*, 1998).

A produção de ERO por fagócitos é reconhecida como uma resposta de defesa contra agentes estranhos ao organismo, e, portanto, essencial para a sobrevivência. A partir do O_2 , que se encontra no estado triplete, pode ser produzido $O_2^{\bullet-}$, por ganho de um elétron, ou oxigênio singlete (1O_2), por mudança do número de spin de um dos dois elétrons não pareados do O_2 através de uma reação endotérmica. Embora o $O_2^{\bullet-}$ não seja uma espécie oxidante forte, reações subsequentes deste radical levam à produção de ERO mais eficientes como microbicidas. No fagossoma, o $O_2^{\bullet-}$ sofre dismutação, resultando na produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que, além de ser capaz de atravessar membranas e oxidar GSH e metionina, ativa a expressão de genes que estão sob o controle do fator de transcrição NF- κ B. Além disso, este peróxido, através de reação de Fenton, na presença de metais como Fe^{2+} origina o radical hidroxila ($HO^{\bullet}$), extremamente reativo, capaz de causar danos em fitas de DNA, inativar diferentes enzimas, iniciar a lipoperoxidação de membranas. O $O_2^{\bullet-}$ pode, adicionalmente, sofrer protonação em meio ácido, originando a forma altamente reativa $HO_2^{\bullet}$.

A MPO, enzima que é liberada no fagossoma por PMN durante a fagocitose, catalisa a produção de ácido hipocloroso (HOCl), a partir de H_2O_2 e Cl^- . Este ácido, altamente reativo, é capaz de oxidar diferentes biomoléculas, servindo, ainda, de substrato para a produção subsequente de $HO^{\bullet}$ e 1O_2 (Hampton *et al.*, 1998, Halliwell & Gutteridge, 1999).

A espécie reativa de nitrogênio (ERN) óxido nítrico ($^{\bullet}NO$), produzida pela enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) em PMN e macrófagos, pode causar a morte de diferentes microorganismos no fagossoma. A presença

concomitante de $O_2^{\bullet -}$ e $^{\bullet}NO$ no fagossoma leva ainda, à rápida produção de peroxinitrito ($ONOO^{\bullet -}$), composto com diferentes ações citotóxicas (Hampton *et al.*, 1998; Halliwell & Gutteridge, 1999).

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

As reações de produção de ERO/ERN por PMN, já bem estabelecidas na literatura especializada, estão mostradas, esquematicamente, na Figura 2.

Figura 2. Produção de ERO/ERN por PMN, onde se ressaltam os doadores citossólicos de elétrons para o sistema NADPH oxidase que produz $\text{O}_2^{\bullet-}$ no fagossoma. Adaptado de Hampton *et al.*, 1998

1.4. Mecanismos de ativação do complexo NADPH oxidase de fagócitos

Uma grande variedade de agentes é capaz de estimular o sistema NADPH oxidase em PMN e macrófagos, tanto substâncias solúveis quanto particuladas. Entre as primeiras incluem-se os peptídeos quimiotáticos, como o

formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), a concanavalina A, os leucotrienos, as citocininas, os ionóforos de cálcio, o fluoreto de sódio e os ésteres de forbol, como o forbol 12-miristato 13-acetato (PMA). Bactérias e leveduras opsonizadas que atuam pela via alternativa do complemento, complexos imunes formados pela interação antígeno/anticorpo que atuam pela via clássica do complemento e estreptolisina O são substratos particulados capazes de ativar o “burst” respiratório em fagócitos (Curnutte *et al.*, 1979; Andrews & Babior, 1984; Strnad *et al.*, 1986; Jesaitis *et al.*, 1991).

Vias bioquímicas diferentes são ativadas na produção de $O_2^{\bullet-}$ por fagócitos, dependendo da natureza das células e do ativador utilizado (Curnutte *et al.*, 1979; Pontremoli *et al.*, 1986; Pontremoli *et al.*, 1989; Jesaitis *et al.*, 1991; Brigagão & Colepicolo, 1998; Brigagão *et al.*, 2000).

O tripeptídeo fMLP foi uma das primeiras substâncias estudadas como capazes de disparar o “burst” respiratório em PMN, revelando muitas informações da relação estrutura/atividade de substâncias quimiotáticas. Seu receptor é uma proteína dimérica com subunidades de 68 e 90 kDa (Becker, 1983). A ligação do tripeptídeo ao receptor causa agregação das células e despolarização de membrana. A repolarização da membrana plasmática, que ocorre por acionamento da Na^+K^+ ATPase, causa aumento da carboximetilação de proteínas e mudança na metilação de fosfolípidos. Paralelamente ao aumento dos níveis intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) pela indução da atividade da enzima adenilato ciclase, a ocupação do receptor determina acionamento da atividade catalítica da fosfolipase C, o que provoca aumento das concentrações citossólicas de inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O íon cálcio mobilizado pelo IP_3 e a alta concentração de DAG ativam diferencialmente isoformas de PKC através da ocupação dos respectivos sítios de ligação nessa enzima (Becker, 1983; Jesaitis *et al.*, 1991).

Fosforilação de diferentes proteínas de PMN causada pela ação de

fMLP foi mostrada como essencial para o “burst” respiratório desencadeado por este agente quimiotático. PMN originados de focos inflamatórios peritoneais de cobaias, mostraram aumento de fosforilação de duas proteínas citossólicas de 47 e 49 kDa, isoformas de $p47^{\text{phox}}$. Este evento é considerado o sinalizador para a montagem do complexo NADPH oxidase, corroborado pelo fato de que a defosforilação das mesmas foi acompanhada pelo decréscimo da produção de $O_2^{\bullet-}$ pelos PMN (Badwey *et al.*, 1989; Heyworth *et al.*, 1989). As vias de sinalização acionadas pelo fMLP, que determinam a produção de $O_2^{\bullet-}$ por fagócitos estão mostradas esquematicamente na Figura 3.

Figura 3. Vias de sinalização celular que determinam liberação de $O_2^{\bullet-}$ por PMN que são ativadas pelo tripeptídeo quimiotático fMLP. Adaptado de Garrett & Grisham, 1995.

Dentre os estímulos particulados capazes de ativar o complexo NADPH oxidase para a produção de $O_2^{\bullet-}$ por fagócitos, bactérias e leveduras opsonizadas são conhecidas por atuarem através da via alternativa do complemento, notadamente a porção $C3_b$ e, possivelmente, a porção $C5_a$ (Salyers & Whitt, 1994). O zimozan opsonizado (OZ), uma preparação comercial de leveduras de *Sacharomyces cerevisiae*, é um dos estímulos mais classicamente utilizados para se estudar este modelo (Meshulam *et al.*, 1988; Dyke, 1991). Após seu reconhecimento pelos fagócitos, ocorre a ativação da fosfolipase A_2 que libera araquidonato e lisofosfatidilcolina através de clivagem sítio-específica de lipídeos de membrana. O primeiro produto dessa clivagem, o araquidonato, aciona vias de respostas inflamatórias específicas, com produção de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, que determinam respostas celulares e tissulares tanto localizadas quanto sistêmicas, além de ser capaz de ativar diretamente a PKC. A lisofosfatidilcolina é, também, por sua vez, capaz de ativar diretamente algumas isoformas de PKC, determinando, assim, a fosforilação de $p47^{phox}$ e $p67^{phox}$ (Maridonneau-Parini *et al.*, 1986; Bell & Burns, 1991).

Diversos estudos têm mostrado a participação de outras proteínas quinases nas vias de sinalização que ativam o complexo NADPH oxidase. Estímulo de PMN com diferentes agonistas resulta em aumento de fosforilação em resíduos de tirosina de muitas proteínas, processo mediado por proteínas G (Berkow *et al.*, 1989; Gómez-Cambroneró *et al.*, 1989; Berkow & Dodson, 1990; Rollet-Labelle *et al.*, 1994). Dentre estas, as proteínas quinases ativadoras de mitose (MAP quinases/ERKs) e as quinases que exercem regulação sobre estas (MAP quinase quinase/MEK) (Downey *et al.*, 1996). Além disso, inibidores de tirosina quinases (Gómez-Cambroneró *et al.*, 1989) bem como aumento na atividade de fosfotirosina fosfatase na membrana plasmática foram capazes de inibir a produção de $O_2^{\bullet-}$ por PMN estimulados por agentes

particulados. A utilização de inibidores de tirosina quinases com diferentes especificidades têm demonstrado a existência de vias distintas de ativação do “burst” respiratório em PMN, acionadas pelos diferentes estímulos (Huang et al., 1988; Berkow *et al.*, 1989; Cohen, 1992; Gay *et al.*, 1997; Takemura *et al.*, 1997; Chan *et al.*, 2001).

A Figura 4 sintetiza as vias de transdução de sinais celulares que resultam na produção de $O_2^{\bullet}$ por PMN em resposta à exposição ao OZ.

Figura 4. Vias de sinalização celular acionadas pelo OZ em PMN, que determinam a ativação do complexo enzimático NADPH oxidase. Adaptado de Garrett & Grisham, 1995.

PMA e alguns de seus análogos são promotores tumorais descritos como capazes de disparar o "burst" respiratório em células fagocitárias através da ativação direta da PKC. Estes forbois são agonistas que se ligam diretamente ao domínio de ligação de DAG da PKC, ativando-a por mudança conformacional e aumento da afinidade por íon cálcio, em algumas isoformas. Esta ativação de PKC determina que a mesma fosforile resíduos de serina e treonina em uma vasta gama de substratos protéicos (Niedel *et al.*, 1983; Cerutti, 1985; Heyworth & Badwey, 1990; Dyke, 1991). Foi mostrado que a proteína p47^{phox} de PMN é, *in vitro*, substrato para PKC, e que a fosforilação nos seus diferentes resíduos de serina inicia a ativação do complexo NADPH oxidase (Heyworth & Badwey, 1990; Babior, 1992). Fosforilação de outras proteínas citossólicas foram também relacionadas como essenciais para o "burst" respiratório disparado por PMA.

Em PMN peritoneais de coelho, cinco proteínas citossólicas (21, 50, 55, 70 e 90 kDa) mostram-se com nível de fosforilação aumentado quando comparadas com proteínas de células não estimuladas por fórbois, bem como uma única proteína que se encontra presente tanto no citossol quanto na porção associada ao citoesqueleto (64 kDa) e uma proteína de ocorrência exclusiva na membrana plasmática (31 kDa) (White *et al.*, 1984). Em PMN de sangue periférico humano estimulados com PMA, foi mostrada a fosforilação de diferentes proteínas, tanto presentes no citossol (20 kDa), quanto presentes no citossol e na membrana plasmática (11, 13, 48, 53-58, 69 e 80 kDa). Esta fosforilação mostrou-se extremamente rápida, em torno de 3 a 5 minutos após a adição de PMA, evento associado com a rápida produção de $O_2^{\bullet-}$ pelos fagócitos estimulados (Andrews & Babior, 1984).

A PKC é uma serina/treonina quinase que age em diferentes compartimentos celulares, modulando processos bioquímicos diversos. Diferentes substratos desta quinase foram identificados em vias específicas de

transdução de sinal, em ciclos metabólicos e em vias que regulam a expressão gênica (Bell & Burns, 1991; Hug & Sarre, 1993). Diferentes isoformas de PKC já foram identificadas, as quais são classificadas em três diferentes categorias. Aquelas isoformas denominadas convencionais (cPKC), apresentam atividade catalítica dependente de cálcio, requerendo fosfatidilserina e DAG para serem ativadas, e são as enzimas identificadas como PKC α , β I, β II e γ . As PKC *novel* (nPKC), que independem de cálcio para sua atividade catalítica, mas têm necessidade estrita de fosfatidilserina e DAG para serem ativadas, são identificadas como as isoformas δ , η , θ , μ , ϵ e PKD, cuja ocorrência varia dependendo da origem celular. A terceira família dessas quinases, denominadas em conjunto de PKC atípicas (aPKC), têm atividade catalítica independente de cálcio e DAG, dependendo apenas de fosfatidilserina para sua catálise. As isoformas ζ e λ são as únicas identificadas, até o momento, como pertencentes a essa classe.

Mesmo mostrando significativas diferenças em relação aos compostos dos quais sua atividade catalítica é dependente, todas as PKC possuem um domínio regulatório N-terminal e um domínio catalítico C-terminal separados por uma região sensível à degradação proteolítica. Ainda, a região de ligação de ATP, onde ocorre a transferência do grupamento fosfato para o substrato protéico durante o ciclo catalítico, é conservada, de modo similar ao que ocorre em estruturas de quinases de outras classes (Cazaubon *et al.*, 1990; Majumdar *et al.*, 1991; Taylor & Radzio-Andzelm, 1994; Newton, 1995; Kent *et al.*, 1996).

Em PMN, foram identificadas isoformas das três famílias de PKC: as PKC- α , PKC- β I e PKC- β II, pertencentes à classe de cPKC; a PKC- ϵ e PKC- δ , representantes típicas da classe das n-PKC; além de PKC- ζ , constituinte da classe de aPKC (Majumdar *et al.*, 1991; Kent *et al.*, 1996; Fontayne *et al.*, 2002).

Um esquema das diferentes estruturas das três classes de PKC, onde salientam-se as diferenças em relação aos compostos requeridos para a atividade catalítica das respectivas isoformas, está mostrado na Figura 5.

Figura 5. Estruturas esquemáticas das diferentes classes de PKC encontradas em PMN. As regiões C (conservadas) e V (variáveis) estão ressaltadas.

A regulação intrínseca da atividade catalítica da PKC é feita por processos de auto-fosforilações, que alteram sua afinidade por ésteres de forbol, determinando ainda a diferença na capacidade de associação à membrana plasmática e ao íon cálcio. Em duas etapas diferenciadas, uma PKC quinase fosforila a enzima, que se posiciona para a ação catalítica, e, em seguida, a PKC minimamente fosforilada é estimulada por fosfatidilserina para completar a autofosforilação na região C-terminal (Dutil *et al.*, 1994). As isoformas PKC- β I e II sofrem mais duas autofosforilações, nos resíduos de serina e treonina da região N-terminal e na região que separa os domínios

regulatório e catalítico na estrutura da proteína (Flint *et al.*, 1990).

Além disso, a atividade das proteínas serina/treonina fosfatases (PSP) antagonizam *in vivo* e *in vitro* a atividade catalítica da PKC, exercendo uma ação finamente regulada sobre as vias metabólicas acionadas por essas quinases. O principal tipo dessas fosfatases em células eucarióticas, a PP2A, um oligômero composto por uma unidade catalítica que associa-se a várias unidades regulatórias, é mostrada como modulada por sinais extracelulares e por compostos antioxidantes (Millward *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2001).

Existem fortes evidências de que a sinalização redox da célula exerce regulação direta sobre a atividade catalítica da PKC. Essa regulação pode ser tanto negativa quanto positiva, dependendo do domínio da enzima atingido pelo agente oxidante ou antioxidante. Assim, H₂O₂ determina um aumento da atividade de PKC se a região atingida por esse oxidante for o domínio regulatório N-terminal (Gopalakrishna & Anderson, 1989; Brawn *et al.*, 1995). Contrariamente, se a região C-terminal for oxidada, ocorre inativação da enzima (Gopalakrishna & Anderson, 1987). Compostos doadores de [•]NO provocam queda da atividade enzimática de PKC, evento bloqueado por agentes sequestradores de [•]NO e revertido por ditioneitol (DTT), o que sugere a formação de pontes de dissulfetos neste mecanismo de inibição (Gopalakrishna *et al.*, 1993).

1.5. Processo de modificações protéicas pós-traducionais por S-glutathionação

Desde o primeiro relato reconhecendo um “material orgânico” relacionado ao metabolismo do enxofre (de Rey Pailhade, 1888, citado in Sies, 1999), diversas constatações da participação essencial da glutathiona (GSH) na

vida celular emergiram na literatura. Esse tripeptídeo (γ Glu-Cys-Gli) encontra-se entre os mais eficientes compostos que a célula utiliza para detoxificar xenobióticos, funcionando como um potente agente nucleófilo e como um redutor, podendo reagir com compostos eletrofílicos ou, ainda, reduzir substâncias antes que estas atinjam estruturas vitais nas células como proteínas e ácidos nucleicos. Inúmeros estudos mostram a proteção de macromoléculas celulares exercida por GSH contra efeitos deletérios de uma grande variedade de compostos químicos, tanto através de reações químicas quanto de reações catalisadas por enzimas específicas. Embora nem sempre o produto formado pela conjugação com a GSH seja inócuo à célula, podendo, muitas vezes, ser mais danoso que a própria substância livre originalmente o era, na maioria das vezes a formação de um aduto GSH-xenobiótico é a primeira etapa para a eliminação do composto estranho ao meio celular (Van Bladeren, 1998; Hayes & McLellan, 1999; Pompella *et al.*, 2003).

A conjugação de xenobióticos com GSH determina o decréscimo do nível celular desse tripeptídeo na forma livre. Assim, um agente eletrofílico determina supressão significativa da ação antioxidante da GSH, que, aliada à capacidade de alquilação sobre componentes moleculares através de ligações covalentes da fração do xenobiótico que permanece livre, causam danos celulares significativos (Casini *et al.*, 1982; Casini *et al.*, 1985; Comporti, 1989).

A resposta celular ao estado redox através de modificações protéicas pós-traducionais tem emergido como uma das mais importantes adaptações ao estresse oxidativo e nitrosativo. Um grande número de modificações de resíduos de aminoácidos que compõem a estrutura de uma proteína foram relatados, incluindo a formação de S-nitrosocisteína, ácido sulfênico (Cys-SOH), ácido sulfinico (Cys-SO₂H), ácido sulfônico (Cys-SO₃H), formação de pontes de dissulfeto inter e intramolecular, produção de sulfóxido de metionina, formação de carbonilas em resíduos de lisina e arginina, formação de

ditirosina, nitração de triptofano e tirosina e formação de dissulfetos mistos protéicos (Thomas *et al.*, 1995; Berlett & Stadman, 1997; Cotgreave & Gerdes, 1998; Lind *et al.*, 1998; Stamler & Hueladen, 1998; Claiborne *et al.*, 1999; Klatt & Lamas, 2000).

O processo de formação de dissulfetos mistos protéicos, denominado S-tiologia protéica, ocorre através da ligação de compostos tiólicos a resíduos de cisteína na estrutura de uma proteína. Dentre os tióis celulares que se destacam nessa função está a GSH, uma vez que esse é o composto sulfidril não-protéico mais abundante na célula, quando então esse processo de modificação pós-traducional é denominado S-glutonação protéica (Sies, 1999; Klatt & Lamas, 2000).

Dois diferentes mecanismos bioquímicos através dos quais GSH liga-se a um resíduo de cisteína de uma estrutura protéica, em resposta aos estresses oxidativo e/ou nitrosativo, têm sido apontados. A adição covalente de GSH a um resíduo de cisteína poderia ocorrer após modificação prévia desse aminoácido na estrutura protéica por ERO ou ERN, com formação de um radical tiil protéico ($R-S^{\bullet}$), de ácido sulfênico ($R-SOH$) ou de S-nitrosotiol ($R-SNO$). De forma inversa, a modificação química por oxidação ou nitração de GSH, que tornaria esse tripeptídeo mais reativo pela formação de glutona oxidada (GSSG), S-nitrosoglutona (GSNO), sulfenato de glutona (GSOH), ou outro intermediário reativo que pode ser formado pela quebra das espécies anteriores (GSX), propiciaria reatividade química suficiente para a formação da ligação proteína-GSH ($R-SSG$) (Klatt & Lamas, 2000; Pompella *et al.*, 2003). Estes dois possíveis mecanismos estão esquematizados na Figura 6.

Figura 6. Mecanismos propostos para o processo de S-glutathionação proteica. Adaptado de Klatt & Lamas, 2000.

A susceptibilidade de resíduos de cisteína presentes na estrutura de uma determinada proteína à S-glutathionação depende de fatores que facilitam e conferem especificidade ao processo. Proteínas que são alvos dessa ligação de GSH apresentam um padrão eletrostático reconhecível, estabilizando o posicionamento do tiol através de ligações por pontes salinas ou por pontes de hidrogênio com os grupamentos carboxilas livres dos esqueletos do γ -glutamato e da glicina presentes na estrutura de GSH, favorecendo dessa

forma, a ocorrência da ligação covalente R-SSG. Estes requerimentos estruturais mínimos para o processo de S-glutationação foram estabelecidos por estudos com estruturas cristalográficas e com análises de ressonância magnética nuclear (NMR) com enzimas da família das glutathione S-transferases, glutaredoxina e glutathione peroxidase (Cotgreave & Gerdes, 1998). Além disso, a estabilização dos dissulfetos mistos proteína-GSH são favorecidos por interações eletrostáticas entre grupamentos laterais livres de resíduos de arginina e de lisina carregados positivamente na estrutura protéica e aqueles carregados negativamente na estrutura da GSH, como foi mostrado com as estruturas S-glutathionadas das proteínas c-Jun e c-Fos, além da subunidade p50 do fator de transcrição NF- κ B (Klatt *et al.*, 1999; Klatt & Lamas, 2000).

A importância dessas interações eletrostáticas na formação de dissulfetos mistos R-SSG foi confirmada pela observação de que a ligação covalente das proteínas glicogênio fosforilase b, creatina kinase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e c-Jun à matriz de GSNO-Sepharose por formação de dissulfetos mistos é abolida quando a carboxila negativamente carregada da GSNO é eliminada por esterificação (Klatt & Lamas, 2000).

Essas modificações pós-traducionais foram induzidas em diversos tipos celulares, que, frente a diferentes agentes oxidantes responderam com S-glutathionação de um "pool" protéico (Chai *et al.*, 1994b; Ravichandran *et al.*, 1994; Schuppe *et al.*, 1992; Figueiredo-Pereira *et al.*, 1998; Padgett & Whorton, 1998; Eaton *et al.*, 2002; Kleinman *et al.*, 2003). Para refinar o esclarecimento dos mecanismos através dos quais ocorre a S-glutathionação, determinando a cinética e estequiometria do processo, estudos com proteínas isoladas foram conduzidos utilizando anidrase carbônica (Chai *et al.*, 1999), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (Mohr *et al.*, 1999), diferentes isoformas de PKC (Ward *et al.*, 2000), proteasoma 20S (Demasi *et al.*, 2001), neurogranina/RC3 e

neuromodulina/GAP-43 (Huang & Huang, 2002), proteína de choque térmico HSP27 (Eaton *et al.*, 2000), actina (Dalle-Donne *et al.*, 2003), tubulina (Landino *et al.*, 2004) e hemoglobina (Mawatari & Murakami, 2004), entre outras, como alvos protéicos da formação de dissulfetos mistos.

O processo de S-glutationação protéica é uma resposta adaptativa da célula ao estado redox, tanto por exercer proteção temporária de proteínas especialmente susceptíveis a efeitos deletérios de oxidantes, quanto provendo uma regulação metabólica fina, suprimindo as necessidades celulares momentâneas através de ativação ou inativação de enzimas chaves do metabolismo. Assim sendo, esse é um evento bioquímico reversível, onde a detiologiação é catalisada enzimaticamente por glutaredoxina, tioredoxina e proteína dissulfeto isomerase. Ainda, agentes químicos redutores, como DTT, mostram-se eficientes em reverter o processo, liberando a GSH que se encontrava ligada a uma determinada estrutura protéica (Chai *et al.*, 1994a; Thomas *et al.*, 1995; Cotgreave & Gerdes, 1998; Klatt & Lamas, 2000).

1.6.Lactonas sesquiterpênicas

Lactonas sesquiterpênicas são metabólitos vegetais secundários, cuja biossíntese é influenciada por fatores intrínsecos e extrínsecos ao vegetal (Gottlieb *et al.*, 1996; Sakamoto *et al.*, 2003). Essas substâncias estão relacionadas com a regulação das atividades biológicas dos vegetais e suas interações com o meio ambiente, exercendo ação protetora em relação ao estresse abiótico, além de um papel essencial como reguladoras do crescimento e desenvolvimento do vegetal, modulando a expressão gênica (Briskin, 2000; Kutchan, 2001).

Intensas pesquisas mostraram inúmeras atividades biológicas destes

fitoprodutos, com potencialidade de aplicações em diferentes áreas, desde a agricultura até às indústrias cosméticas, farmacêuticas e alimentícias (Balandrin *et al.*, 1985; Harbone, 1989; Hamburger & Hostettmann, 1991). Assim, há um interesse especial na pesquisa da flora de países tropicais, a qual apresenta grande biodiversidade, possuindo espécies vegetais que, de acordo com Rodriguez & West (1995) contêm três a quatro vezes mais metabólitos secundários biologicamente ativos do que aquelas espécies vegetais típicas de regiões temperadas do planeta.

Nesse contexto, uma das famílias vegetais de grande importância econômica, apontada como uma das mais utilizadas para fins alimentares e terapêuticos é a *Asteraceae* (Wagner, 1977; Moerman, 1996). No Brasil, muitos representantes desta família encontram-se em regiões de cerrado e de campos ruprestes, onde várias de suas espécies são endêmicas. Estas regiões, localizadas no platô central do Brasil, estão entre os vinte e cinco sistemas ecológicos do planeta que apresentam altíssima biodiversidade e elevado risco de sobrevivência de suas espécies, decorrente da intensa ação antrópica aliada ao uso amplamente disseminado dessas espécies vegetais na medicina popular (Myers *et al.*, 2000; Vieira & Martins, 2000).

Entre as tribos de *Asteraceae*, destaca-se a *Vernonieae*, com setenta gêneros e cerca de 1.500 espécies, apresentando distribuição pantropical. Alguns desses gêneros são particularmente interessantes em função de sua ocorrência exclusiva no Brasil, como acontece com o gênero *Lychnophora*, que se encontra distribuído pelos campos ruprestes e cerrados do estado de Minas Gerais, com baixa ocorrência nos estados da Bahia, de Goiás e de Mato Grosso, onde provavelmente foi introduzido por ação antrópica ou faunística (Puertas & Martins, 2002). A Tabela 1 mostra a taxonomia do gênero *Lychnophora* (Joly, 1985; Semir, 1991).

Tabela 1. Taxonomia do gênero *Lychnophora*.

Táxons	
Divisão	<i>Angiospermae</i>
Classe	<i>Dicotyledoneae</i>
Subclasse	<i>Sympetaleae</i>
Ordem	<i>Campanulales</i>
Família	<i>Asteraceae</i>
Tribo	<i>Vernonieae</i>
Subtribo	<i>Lychnophorinae</i>
Gênero	<i>Lychnophora</i>

Algumas espécies de *Lychnophora*, conhecidas como “falsas arnicas”, “arnicas da serra” ou “arnicas mineiras”, são utilizadas na medicina popular sob a forma de preparações hidroalcoólicas obtidas das folhas e inflorescências, aplicadas topicamente como antiinflamatórios e analgésicos (Cerqueira *et al.*, 1987; Vieira & Martins, 2000; Puertas & Martins, 2002).

Pesquisas sobre o potencial farmacológico de algumas espécies desse gênero, dentre as quais destaca-se a *L. ericoides* (Figura 7), já foram realizadas. Diversas ações biológicas foram atribuídas a extratos diclorometânicos, clorofórmicos e metanólicos preparados a partir de diferentes partes da planta, como partes aéreas e raízes, além de callus e plântulas micropropagadas, nos quais foram identificados uma variedade de metabólitos secundários como triterpenos, flavonóides, esteróides, lignanas, saponinas diglicosiladas, glicosídeos, derivados do ácido cafeoilquínico e lactonas sesquiterpênicas (Araújo *et al.*, 1975 Oliveira *et al.*, 1996; Borella *et al.*, 1998; Bertoni *et al.*, 2000; Borsato *et al.*, 2000; Cabral *et al.*, 2000; Flausino *et al.*, 2000; Leite & Del Vecchio, 2000; Santos *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2001; Sargentini & Vichinewski, 2000; Gobbo Neto *et al.*, 2002; Paron *et al.*, 2002).

Figura 7. Espécimen de *Lychnophora ericoides* (A) identificada em região de campo rupreste do Estado de Minas Gerais. As fotos B e C destacam, respectivamente, as folhas e inflorescência, onde acumulam-se as lactonas sesquiterpênicas sintetizadas por esta planta. Fotos gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes.

Dentre as lactonas sesquiterpênicas isoladas de *L. ericoides*, destaca-se o lcnofolido (Figura 8), composto da classe dos furanoeliangolidos, o qual foi isolado como a lactona predominante em folhas de espécimens coletados em campos ruprestes do Estado de Minas Gerais (Sakamoto *et al.*, 2003).

Figura 8. Estrutura química da lactona sesquiterpênica licnofolido.

1.7.Lactonas sesquiterpênicas como compostos potencialmente antiinflamatórios

A produção de ERO/ERN nos focos inflamatórios é um processo de vital importância no organismo, claramente demonstrado pela ausência do mesmo nos portadores de CGD. Entretanto, o controle do processo inflamatório é essencial para a manutenção da homeostase. O próprio organismo é capaz de controlar esse evento, através de hormônios, fatores diversos e componentes de secreções específicas (Mizel & Jaret, 1985; Camarero *et al.*, 1990; Brigagão & Colepícolo, 1996; Brigagão & Colepícolo, 1998).

Assim, muitas vezes o uso de antiinflamatórios é de suma importância, pois a exacerbação do processo inflamatório pode sair do controle homeostático do organismo, fazendo-se, então, necessária a intervenção farmacológica. A correlação entre o efeito de compostos que modulem a produção de ERO/ERN e o efeito antiinflamatório tem sido consistentemente mostrada na literatura (Babior, 2000; Ostrakhovitch & Afanasev, 2001).

Nos últimos anos, tem sido grande a busca de agentes antiinflamatórios

potentes que não apresentem os efeitos colaterais típicos das drogas esteroidais. Lactonas sesquiterpênicas extraídas de diferentes espécies vegetais, têm sido identificadas como possíveis agentes antiinflamatórios. Diferentes pseudoguaianolidas, purificadas a partir de *Parthenium hysterophorus* e de *P. glomeratum* Rodin mostraram-se capazes de atenuar, *in vivo*, inflamações tanto crônicas quanto agudas, induzidas por diferentes agentes químicos (Recio *et al.*, 2000). De maneira similar, hidroxiachilina, lactona extraída de *Tanacetum microphyllum*, foi capaz de inibir processos inflamatórios induzidos por aplicação subcutânea de PMA (Silván *et al.*, 1996). Outras lactonas extraídas de *Saussurea lappa* diminuíram os sintomas característicos de diferentes fases do processo inflamatório (Damre *et al.*, 2003), e, especialmente, do processo de degranulação de PMN (Johansson *et al.*, 2002; Siedle *et al.*, 2003).

Cho *et al.* (1998 e 2000) mostraram que a cinaropictina, uma lactona extraída de *Saussurea lappa* atua como eficiente composto antiinflamatório, inibindo a liberação de fator necrosante tumoral (TNF- α) e a liberação de NO por macrófagos. O efeito desta lactona foi totalmente suprimido por L-cisteína, sugerindo que a ação é devida à inibição de atividade de compostos com grupamento sulfidril. Analogamente, a yomgina foi relatada como uma lactona que inibe a liberação de NO por macrófagos expostos a lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano (Ryu *et al.*, 1998).

Poucos estudos foram feitos sobre o efeito de lactonas sesquiterpênicas na transdução de sinal durante o processo inflamatório. A lactona partenolida mostrou-se capaz de inibir a ativação de fatores de transcrição induzidos por citocinas da família IL-6 (Sobota *et al.*, 2000), e, sobre a ativação do fator de transcrição NF- κ B, foi mostrado que diversas lactonas são capazes de inibir sua dissociação por ligação aos resíduos de cisteína 38 e 120 da subunidade

p65 deste fator. Detalhando a relação quantitativa estrutura/atividade destas lactonas, o grupamento α -metileno γ -lactônico mostrou-se como o fator químico ativo (Rüngeler *et al.*, 1999; Castro *et al.*, 2000).

A capacidade de princípios ativos naturais antiinflamatórios atuarem, dentre outros mecanismos, como antioxidantes, tem sido ressaltada em alguns estudos. O extrato de *Pluchea sagittalis*, além de atuar como potente antiinflamatório em diferentes modelos *in vivo*, mostrou capacidade de diminuir o estresse oxidativo nos focos inflamatórios, especificamente por diminuir a liberação de H_2O_2 por PMN. Quatro ciclopentenonas extraídas de esponja marinha foram eficientes em inibir o “burst” respiratório de PMN humanos, bem como inibir a fosfolipase A_2 nestas mesmas células. Como já citado, a cinaropicrina foi relatada como capaz de diminuir a liberação de $\cdot NO$ por macrófagos (Pérez-Garcia, 1996; Cho *et al.*, 2000; Gianini *et al.*, 2001).

Entretanto, não foi relatada nenhuma ação de lactonas sesquiterpênicas na transdução de sinal em PMN durante o processo inflamatório, persistindo, ainda, polêmicas sobre o efeito destes compostos sobre a viabilidade celular, tanto a curto quanto a longo prazo, uma vez que existem relatos contraditórios sobre o mesmo.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito da lactona sesquiterpênica licnofolido sobre o "burst" respiratório de PMN de focos inflamatórios. Foi proposto estabelecer o mecanismo de ação deste fitocomposto sobre a atividade do complexo NADPH oxidase através da abordagem dos seguintes aspectos:

- (i) Ação do licnofolido sobre a liberação de $O_2^{\bullet-}$ por PMN inflamatórios estimulados por vias bioquímicas diferentes: através de estímulo direto da via de PKC com PMA; a partir de estímulo quimiotático com o tripeptídeo fMLP, e, ainda, através de estímulo com leveduras opsonizadas (OZ);
- (ii) Verificação da ocorrência de dose-dependência dessa ação;
- (iii) Estudo do efeito de suplementações de compostos iônicos, energéticos e sulfidrilas na ação do licnofolido sobre o "burst" respiratório de PMN inflamatórios;
- (iv) Estabelecimento do papel de GSH celular na ação de licnofolido sobre os PMN;
- (v) Estudo das modificações protéicas por S-tiolação desencadeadas pela estimulação do complexo NADPH oxidase;
- (vi) Determinação do efeito da lactona sobre esse processo pós-traducional de formação de dissulfetos mistos GSH-proteínas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

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

3.1.Determinação da liberação de $O_2^{\bullet-}$ e do período “lag” de PMN

3.1.1.Isolamento de PMN

Camundongos machos da linhagem Swiss, com idade entre seis e nove semanas, mantidos no Biotério do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, com ração peletizada e água *ad libitum*, em regime de luz/escuro de 12/12 h (luz entre 06:00 e 18:00 horas), com temperatura controlada a $25\pm 2^\circ\text{C}$, foram usados em todos os experimentos, em grupos de 20 a 30 animais.

PMN foram isolados da cavidade peritoneal dos animais segundo metodologia descrita por De Pierre & Karnovsky (1974). Para desencadear as condições de inflamação aguda, foi injetado 1 mL de caseinato de sódio 12% m/v (Biochemicals ICN) em solução salina na cavidade peritoneal de cada animal, sempre às 10:00 horas para evitar variação circadiana (Rabadji *et al.*, 1996). Após 4 h, os animais foram anestesiados com éter etílico e sacrificados por deslocamento da coluna cervical. Foram injetados 5,0 mL de PBS gelado na cavidade peritoneal de cada animal, sendo os lavados sugados com seringa plástica, reunidos e centrifugados a $270 \times g$ por 10 min a 4°C (Centrífuga Sorvall RC-5B).

O sobrenadante foi desprezado e o precipitado, rico em PMN, foi ressuspenso em PBS. Este procedimento foi repetido duas vezes, sendo que o

terceiro precipitado foi submetido a choque osmótico para lise de hemácias presentes com água destilada e filtrada (filtro Millipore, modelo Milli-Q UF Plus) por 30 s, com a concentração salina corrigida para a isotonicidade com NaCl 1,8% m/v. As células foram novamente centrifugadas e ressuspensas em D-PBS-G, para contagem em câmara de Newbauer. Todos os experimentos descritos a seguir foram realizados com 1×10^7 PMN/mL, exceto quando claramente indicado de maneira diferente.

Alíquotas destas preparações foram tomadas para contagem celular diferencial em microscópico óptico, sendo as lâminas preparadas em citocentrífuga e submetidas à coloração pelo método May-Grünwald-Giemsa (Sigma Chemical Co.). Nestas condições, $94 \pm 2\%$ da população celular elicitada são constituídos por PMN.

3.1.2. Ativação do “burst” respiratório de PMN

A ativação do “burst” respiratório de PMN foi feita como descrito por Cohen & Chovaniec (1978a), modificado por Badwey & Karnovsky (1980). PMN foram incubados a 37°C por 10 min em cubeta plástica e ferricitocromo c (cit c, 0,75 mM, Sigma Chemical Co.) foram acrescentados. PMA ($40 \text{ ng}/10^7$ PMN) dissolvido em DMSO, fMLP ($1 \text{ } \mu\text{M}/10^7$ PMN) ou OZ (100 partículas/PMN) foram adicionados para desencadear o “burst” respiratório. Preparações com todos os componentes descritos mais 5 U de SOD foram utilizadas como referência.

A redução contínua do Fe^{3+} do cit c a Fe^{2+} , indicador da reação, foi monitorada continuamente no comprimento de onda de máxima absorção do grupo cit c- Fe^{2+} (550 nm) em espectrofotômetro Hitachi, modelo U-2000. A produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ foi calculada com base na velocidade máxima dos primeiros

60 segundos de reação, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 21.000 $M^{-1}.cm^{-1}$.

3.1.3.Determinação do período “lag” de PMN

O tempo necessário para que o complexo NADPH oxidase de PMN responda à adição dos diferentes estímulos, iniciando a produção de $O_2^{\bullet-}$, foi determinado em condições experimentais idênticas às aquelas descritas no item anterior 3.1.2. O período “lag” de ativação do complexo NADPH oxidase foi definido como sendo o intervalo de tempo necessário para que, após a adição do estímulo desencadeador do “burst” respiratório às suspensões de PMN, a densidade óptica a 550 nm interceptasse a linha de base, indicando o início da redução do cit c por $O_2^{\bullet-}$ produzido pelo complexo enzimático NADPH oxidase (Newburger *et al.*, 1980).

A Figura 9 mostra como foram coletados os dados referentes à determinação do período “lag” da ativação do complexo NADPH oxidase fagocitário e à quantificação da liberação de $O_2^{\bullet-}$, conforme descrito no item 3.1.2.

Figura 9. Esquema mostrando a determinação do período “lag” e produção de $O_2^{\bullet-}$ por PMN. Os diferentes estímulos (PMA, fMLP ou OZ) foram adicionados e o período “lag” calculado como o tempo necessário para que se iniciasse a produção de $O_2^{\bullet-}$, cuja quantificação foi realizada pela variação de Abs_{550nm} nos primeiros sessenta segundos da reação, em comparação às preparações celulares idênticas adicionadas de 5 U de SOD (linha vermelha).

3.1.4. Testes de viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pela exclusão com azul de Trypan antes e após cada experimento, sendo contadas, em média, 200 células por amostra (Siedle *et al.*, 2003).

Adicionalmente, nos experimentos em que foram usadas diferentes concentrações da lactona sesquiterpênica, cuja atividade sobre a liberação de $O_2^{\bullet-}$ por PMN estava em estudo, foram realizados testes de viabilidade celular pelo método de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Este teste consiste em monitorar a redução deste composto à formazana insolúvel correspondente, pela ação das enzimas desidrogenases, cujo produto formado é determinado a 540 nm. A reação é

atribuída principalmente à ação das desidrogenases mitocondriais, especialmente à succinato desidrogenase, sendo portanto, um teste capaz de determinar acuradamente o número de células viáveis em uma preparação (Cho *et al.*, 2000; Giannini *et al.*, 2001). Suspensões celulares em D-PBS-G foram incubadas apenas com o veículo ou com diferentes concentrações do composto em estudo (5-350 $\mu\text{g}/10^7$ PMN) por 20 min, e alíquotas dessas preparações (2×10^5 - 1×10^6 PMN) foram, então transferidas para placas de 96 poços. MTT (12 mM) foi adicionado, e as placas mantidas por 1 h a 37°C em estufa aerada (O_2 95%/CO₂ 5%). As placas foram então retiradas da incubação, o sobrenadante de cada poço removido e DMSO foi adicionado (50 μL), seguindo nova incubação das reações a 37°C por 2 h para a solubilização do produto formado. A concentração da formazana resultante da clivagem do anel tetrazólico do MTT pelas enzimas desidrogenases foi então determinada através de leitor de ELISA (modelo VERSA Max tunable, Molecular Device) e comparada com uma curva padrão (10^5 - 10^6 células/mL) previamente construída.

3.1.5. Teste de redução do citocromo c pelo licnofolido

Para verificarmos se o licnofolido poderia reduzir quimicamente o composto usado como sonda química para a determinação da liberação de O_2^- (cit c), interferindo, desta maneira, na precisão e sensibilidade dos testes executados, foram realizadas análises de espectroscopia de varredura dessa hemoproteína na ausência e na presença de licnofolido. As condições utilizadas para tanto foram: 0,75 mM de cit c dissolvidos em D-PBS-G 0,1 M pH 7,4, 37°C, na presença ou na ausência de 350 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de licnofolido.

3.1.6. Teste de reação direta do licnofolido com $O_2^{\bullet-}$

A capacidade do licnofido reagir diretamente com o $O_2^{\bullet-}$ foi verificada através de ensaios onde a enzima xantina oxidase atua sobre seu substrato, a hipoxantina, produzindo esta ERO que reduz o Fe^{3+} do grupamento heme do cit *c* a Fe^{2+} . O meio de reação foi composto por 55 μ M de hipoxantina e 0,75 mM de cit *c* dissolvidos em volume suficiente de D-PBS-G 0,1 M pH 7,8. A reação foi iniciada pela adição de xantina oxidase (0,3 U/mL), perfazendo um volume final de 1 mL, sendo o aumento da absorbância em 550 nm monitorado durante 1 min na presença e na ausência de licnofolido (350 μ g/mL).

Os controles foram feitos pela adição de 1 U de SOD (Sigma Chemical Co.) ao meio de reação, que corresponde à quantidade desta enzima capaz de inibir em 50% a redução do cit *c* pelo $O_2^{\bullet-}$. (McCord & Fridovich, 1968)

3.2. Determinação do consumo de oxigênio por PMN

Aumento do consumo de oxigênio por fagócitos, dissociado da cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, está diretamente associado à ativação do sistema NADPH oxidase, com formação de $O_2^{\bullet-}$ no fagossoma (Babior, 1992). As concentrações de O_2 consumidas por PMN foram medidas em oxígrafo (YSI 5300, Yellow Spring Instr. Co. USA), segundo método previamente descrito (Alexander & Griffiths, 1993). O eletrodo de Clark foi estabilizado com D-PBS-G a 37°C, e a calibração foi feita com o uso de ditionito, sendo que a concentração de O_2 na presença de PMN (10^7 /mL) não estimulados foi estabelecida como 100%. PMA, fMLP ou OZ foram adicionados às suspensões celulares e o consumo de O_2 foi monitorado por 5 min, sob

agitação constante, a 37°C

3.3.Efeito *ex vivo* de licnofolido sobre o “burst” respiratório, período “lag” e consumo de oxigênio por PMN

3.3.1.Obtenção de licnofolido

A lactona sesquiterpênica licnofolido, isolada a partir da planta da flora brasileira *Lychnophora ericoides* (Sakamoto *et al.*, 2003) foi fornecida para este trabalho pelo Professor Dr. Norberto Peporine Lopes, do Departamento de Química e Física da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Ribeirão Preto, SP. O composto, cuja estrutura química está mostrada na Figura 8, foi cedido liofilizado, com massa definida, grau de pureza 97%.

3.3.2.Ação do licnofolido sobre a ativação e sustentação da atividade do complexo NADPH oxidase

Suspensões celulares de PMN em D-PBS-G obtidos como descrito no item 3.1.1. foram incubados com diferentes concentrações ($5\text{--}350\ \mu\text{g}/10^7$ PMN) de licnofolido dissolvido em DMSO (concentração final no meio de reação 0,1 % v/v) por 20 min a 37°C, sob agitação constante. As suspensões celulares foram então lavadas duas vezes com PBS seguidas por centrifugação ($270 \times g$, 10 min, 4°C). As células foram ressuspensas em D-PBS-G e o “burst” respiratório estimulado, sendo monitorados a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e o período “lag” como descrito no itens 3.1.2. e 3.1.3., bem como o consumo de O_2 pelos

fagócitos (item 3.2.).

O efeito do licnofolido sobre os fagócitos foi calculado em todos os experimentos por comparação com PMN incubados apenas com o veículo usado para dissolver a lactona (DMSO) e submetidos de forma idêntica a todas as etapas experimentais. Foi definida como ED₅₀ a concentração efetiva de licnofolido capaz de inibir 50% da liberação de O₂^{•-} pelos PMN sob cada estímulo específico.

3.4. Estudo da prevenção e reversibilidade do efeito de licnofolido sobre o “burst” respiratório de PMN

Foi verificada a possibilidade de que o aumento da concentração no meio de reação de fontes energética e iônicas, ou a introdução de compostos sulfidríla, pudessem alterar o efeito que a lactona sesquiterpênica exerceu sobre o “burst” respiratório estimulado por PMA, fMLP ou OZ. Preparações de PMN receberam suplementações (10 min, 37°C) de D-glicose (5-100 µg), Ca²⁺ (5-50 µg na forma de CaCl₂), Mg²⁺ (5-50 µg na forma de MgCl₂), GSH (1-100 µg) ou DTT (1-100 µg), seguidas por remoção do excesso de reagentes com D-PBS-G e centrifugação (270 x g, 10 min, 4°C), antes ou após o período de incubação das células com licnofolido (ED₅₀). O “burst” respiratório foi então estimulado com PMA, fMLP ou OZ (item 3.1.2) e os resultados comparados com aqueles provenientes de suspensões celulares não suplementadas com quaisquer desses compostos.

3.5. Estudo do mecanismo de inibição do “burst” respiratório de PMN por licnofolido

3.5.1. Determinação de GSH e GSSG

As concentrações de GSH e GSSG são determinadas em soluções pelo método enzimático no qual GSH é oxidada por DTNB e posteriormente reduzida por NADPH na presença de glutathione redutase. A resultante formação do ácido 2-nitro-5 tiobenzóico (TNB) é monitorada a 412 nm por comparação com a respectiva curva padrão (Griffith, 1980). Para a determinação de GSSG, as amostras são previamente tratadas com 2-vinilpiridina que complexa-se firmemente com GSH, indisponibilizando esta forma reduzida para a subsequente reação, tornando, assim, possível diferir as concentrações de ambas as formas, oxidada e reduzida, deste tripeptídeo presente nas amostras.

PMN foram homogeneizados em HClO₄ (0,5 M) contendo 6,3 mM de EDTA e bipyridina (0,006%). Após centrifugação (10.000 x g, 10 min), alíquotas do sobrenadante foram misturadas com DTNB (2 mM) em NaH₂PO₄ (80 mM)/ EDTA (6,3 mM), pH 7,5, glutathione redutase (5 U), na ausência ou presença de 2-vinilpiridina (100 mM, dissolvida em etanol) inicialmente adicionada às amostras após a precipitação protéica ácida. Após 40 minutos de incubação à temperatura ambiente, foi determinada a absorbância a 412 nm, relativa à formação do produto TNB, e as concentrações de GSH e GSSG foram calculadas por interpolação nas respectivas curvas padrões.

3.5.2.Detecção do aduto glutationil-licnofolido por ESI-MS e identificação por ESI-MS/MS

A espectrometria de massa (MS) é uma ferramenta extremamente útil na caracterização estrutural de biomoléculas, apresentando maior sensibilidade que outros métodos analíticos usados com a mesma finalidade. O acoplamento desta técnica com métodos de ionização suaves como a ionização por "electrospray" (ESI) permite a análise de substâncias polares, não voláteis, termossensíveis e ainda, dos componentes de uma mistura (McLafferty & Turecek, 1993; Gordon, 2001).

Na ESI, uma solução contendo o analito atravessa um capilar mantido em alto potencial, sendo que o alto campo elétrico na extremidade do capilar provoca o desprendimento de gotículas altamente carregadas em direção ao analisador. A dispersão dessas gotículas em microgotículas ("spray") é auxiliada pela nebulização por fluxo de nitrogênio. Além do gradiente de potencial, as pressões reduzidas no analisador auxiliam na atração das gotículas, que se reduzem em tamanho pela evaporação do solvente promovido pelo fluxo de nitrogênio e também pelas "explosões de Coulomb". Estes processos se repetem devido à alta densidade de carga até que os íons estejam totalmente dessolvatados (Gordon, 2001; Mores & Lago, 2003).

Nos analisadores de espectro de massa do tipo tempo de voo ("time of flight" -tof-), os íons positivos são gerados periodicamente pelo bombardeio da amostra com pulsos rápidos de elétrons, íons secundários ou fótons gerados por "lasers". Esses pulsos, normalmente têm frequência entre 10-50 kHz e um tempo de vida de 0,25 μ s. Os íons produzidos dessa forma são então acelerados por um pulso de campo elétrico o qual tem a mesma frequência que o pulso de ionização, mas que está atrasado em relação a este. As partículas

aceleradas passam, então, por um tubo de separação, idealmente com a mesma energia cinética. Dessa forma, suas velocidades no tubo de separação devem variar inversamente às suas massas detectadas.

Embora a MS seja uma técnica extremamente acurada, a detecção de um íon com determinada relação massa /carga (m/z), por si só não é suficiente para definir uma entidade química em termos estruturais. Esse fato se torna especialmente relevante quando os compostos a serem analisados são constituintes de misturas complexas, uma situação corrente na análise de amostras biológicas. A análise “tandem” MS (MS/MS) possibilita a obtenção de informações estruturais de um dado composto com aumento de sensibilidade. Nessa análise, o íon parental de interesse selecionado no primeiro analisador sofre fragmentações e posterior detecção dos íons filhos. A filtragem dos íons e a possibilidade de seleção de um determinado íon levam a um ganho na relação sinal/ruído, enquanto que a probabilidade de duas moléculas gerarem íons pai e filhos idênticos por MS/MS é praticamente desprezível. Assim o uso de ESI-MS para identificar a presença de um determinado composto em uma amostra é refinado pelo uso de MS/MS para caracterizar acuradamente a estrutura química do mesmo (Gordon, 2001).

Neste trabalho, utilizamos as análises por ESI-MS e ESI-MS/MS para que fosse verificada a hipótese de reação direta entre o licnofolido e GSH. Foi feita uma preparação *in vitro* equimolar de GSH e licnofolido (200 mM), sendo os compostos dissolvidos em PBS e DMSO, respectivamente. As reações foram mantidas por 30 min em temperatura ambiente, sob agitação constante. Aliquotas destas preparações foram coletadas, dissolvidas em metanol 50% v/v, e injetadas em espectrômetro de massa (Q-tof, Micromass, Manchester, UK) com massa final de 0,5 mg/mL. A velocidade de infusão da amostra no Z-“spray” foi de 5 μ L/min. O íon quasi-molecular ($[M+H]^+$) detectado no modo

positivo foi analisado por MS/MS e a relação m/z dos fragmentos resultantes registrada e utilizada para propor o respectivo mecanismos de fragmentação.

PMN previamente incubados com licnofolido ($250 \mu\text{g}/10^7$ células) nas condições já descritas no item 3.3.2., foram lisados em tampão (NaCl 50 mM, EDTA 10 mM, SDS 0,2 % m/v, Tris 10 mM, pH 7,6) contendo 0,2 mg/mL de proteínase K, por 3 h a 50°C. Após esta etapa de desproteínização, as amostras foram centrifugadas ($800 \times g$, 5 min, 4°C) e alíquotas dos sobrenadantes foram injetadas no espectrômetro de massa em condições idênticas às descritas acima.

3.5.3.Determinação de modificações protéicas por S-glutathionação durante o “burst” respiratório de PMN

A formação de dissulfetos mistos proteínas-GSH durante a ativação do complexo NADPH oxidase de PMN, bem como o efeito de diferentes concentrações da lactona licnofolido sobre esse processo, foram determinados segundo o método descrito por Thomas *et al.* (1994), adotando-se algumas modificações (Carr & Winterbourn, 1997).

3.5.3.1.Marcação do “pool” de tióis celulares

PMN foram incubados com o inibidor de síntese protéica ciclohexemida ($100 \mu\text{M}$) por 1 h a 37°C sob agitação constante. As suspensões celulares foram então acrescidas da mistura de metionina[^{35}S]-cisteína[^{35}S] ($100 \mu\text{Ci/mL}$, Amersham Pharmacia) nas mesmas condições, para a marcação radioativa do

“pool” de tióis celulares. Após centrifugação e lavagem das células com PBS para remoção dos aminoácidos radioativos não incorporados, estas foram ressuspensas em D-PBS-G, incubadas com diferentes concentrações de licnofolido (10, 39 e 250 μg) por 20 min a 37°C, novamente lavadas e ressuspensas com a mesma solução tamponante. PMN foram mantidos em estado dormente ou submetidos ao estímulo do “burst” respiratório com PMA (40 ng, 10 min, 37°C).

3.5.3.2. Separação de tióis não protéicos e tióis ligados à fração protéica em PMN

As suspensões celulares foram centrifugadas (1.500 x g, 4°C, 10 min), e os PMN coletados no precipitado rompidos por sonicação em tampão de extração (β -glicerofosfato de sódio 10 mM, pH 7,0, EDTA 5 mM, PMSF 0,2mM, leupeptina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aprotinina 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pepstatina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, benzamidina 17 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Diferentes alíquotas destas preparações receberam NEM (50 mM) ou DTT (50 mM) em incubação por 30 min (25°C), para que os grupamentos tióis livres fossem quimicamente bloqueados ou reduzidos, respectivamente.

Para separação dos tióis não protéicos e tióis ligados à fração protéica, as amostras foram adicionadas de HClO_4 (0,5 M) e centrifugadas (14.000 x g, 4°C, 20 min). Alíquotas dos sobrenadantes, onde estavam contidos os tióis não protéicos, foram submetidos diretamente à cintilografia líquida para quantificação da incorporação dos aminoácidos marcados radioativamente (1600 TR Packard Counter Analyzer). O líquido de cintilação utilizado foi composto de 1-fenil 1,4 feniloxazol (PPO) como soluto primário e 1,4-di-(4 metil, 5 fenil oxazil) benzeno (POPOP) como soluto secundário nas

concentrações de 4,0 mg e 0,1 mg/mL tolueno, respectivamente. Os resultados foram expressos como a diferença (cpm/ 10^7 PMN) entre as amostras tratadas com NEM e com DTT.

Os precipitados foram lavados com éter etílico e ressuspensos em SDS (1% m/v) com massa protéica definida (Bradford, 1976) para a determinação dos tióis protéicos. Alíquotas dos precipitados ácidos protéicos provenientes das amostras inicialmente incubadas com NEM foram ressuspensos em DTT (50 mM, 1 h, 37°C) para a redução e liberação dos tióis ligados à fração protéica. Após nova precipitação ácida nas mesmas condições acima descritas, os sobrenadantes obtidos foram analisados de maneira idêntica.

3.5.3.3. Identificação dos tióis ligados à fração protéica em PMN

Os sobrenadantes obtidos da segunda precipitação ácida nas preparações acima descritas foram centrifugados ($10.000 \times g$, 4°C, 20 min), tratados com DTNB (20 mM) em PBS. As amostras foram, então, analisados por HPLC (coluna Phenomenex® C18, 250 x 4,6 mm, 5 μ m) em método de fase reversa. A eluição foi isocrática, sendo a fase móvel formiato de amônia 0,023 M, pH 5,0 (preparado diariamente) e metanol na proporção 90:10 v/v com velocidade de fluxo de 1 mL/min (Raggi *et al.*, 1998) em aparelho Shimadzu, modelo LC-6AD. Foi utilizado como padrão interno ácido ascórbico (2 nM). As frações foram coletadas a cada 0,3 min, e aquelas correspondentes ao tempo de retenção idêntico aos dos padrões de GSH (10 nM) e de cisteína (20 nM) determinados em 280 nm, foram reunidas e submetidas à cintilografia para determinação da incorporação de radioatividade, de forma similar àquela já descrita.

3.5.3.4. Separação eletroforética e análise das proteínas S-glutationadas

A identificação das proteínas S-glutationadas foi realizada através de método onde as bandas radioativas são detectadas por autoradiografia (Chai *et al.*, 1994a). Os extratos celulares inicialmente tratados com NEM ou DTT foram centrifugados ($10.000 \times g$, 4°C , 20 min), os precipitados (50 μg proteína) foram submetidos à eletroforese no sistema SDS-PAGE (Laemmli, 1970), sendo que as amostras previamente incubadas com NEM foram desnaturadas em tampão sem quaisquer agentes redutores, porém com 50 mM NEM.

Após a corrida eletroforética (80 volts na fase de empilhamento e 100 volts na fase de separação), os géis (gel de separação 12%) foram corados com azul de Comassie 0,25% m/v, ácido acético glacial 10% v/v e etanol 50% v/v em água destilada por uma hora, descorados e imediatamente submetidos à secagem (secador Gel Bio Rad, modelo 583) por 1 h.

Autorradiografias foram realizadas por exposições dos géis em filmes X-OMAT (Kodak Brasileira Co. e Ind. Ltda.) em câmara escura, sendo os cassetes deixados a -80°C por 48 h, e os filmes então revelados (soluções Reveladora e Fixadora Kodac) e submetidos à densitometria (Image Master). Os resultados foram expressos em porcentagem da área específica em proporção à área total densitometrada (Ravichandran *et al.*, 1994).

Todos os procedimentos para a determinação de modificações protéicas por S-tiolção utilizados estão esquematicamente mostrados na Figura 10.

3.6. Análise estatística

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

Figura 10. Procedimentos experimentais para a determinação quantitativa de S-tiolagem protéica e identificação de proteínas S-tioladas através da incorporação de metionina [³⁵S]-cisteína [³⁵S].

4. RESULTADOS

4.1. População fagocitária de focos inflamatórios agudos peritoneais

PMN desempenham um papel essencial na resposta do organismo a diferentes lesões, sendo as primeiras células a migrarem para um foco inflamatório, onde fagocitam agentes invasores e/ou fragmentos de tecidos danificados. O processo inflamatório localizado pode ser produzido pela injeção de diferentes compostos estranhos ao organismo, como tioglicolato, carragenana, caseinato de sódio e diferentes microorganismos.

Induzimos um processo inflamatório agudo em camundongos pela injeção intraperitoneal de caseinato de sódio 12% m/v, cuja cinética de migração celular já havíamos estabelecido anteriormente (Rabadji *et al.*, 1996). Assim, após 4 h da injeção do composto indutor, uma população celular significativa foi elicitada por lavagem do peritônio com PBS, da qual $95 \pm 2\%$ são representados por PMN, como determinado por contagem diferencial feita em lâminas coradas por May-Grünwald-Giemsa e analisadas por microscopia óptica. A Figura 11 mostra um campo microscópico característico desta população celular.

Figura 11. Campo microscópico mostrando a identificação da população fagocitária de focos inflamatórios induzidos em cavidade peritoneal de camundongos. Coloração May-Grünwald-Giemsa.

- **4.2. Inibição do “burst” respiratório de PMN por licnofolido: estudo das diferentes vias bioquímicas de estimulação do complexo NADPH oxidase.**

4.2.1. Estímulo pela via de PKC

PMN elicitados de cavidade peritoneal de camundongos, quando estimulados com PMA (40 ng), liberaram quantidade substancial de $O_2^{\bullet-}$ ($2,63 \pm 0,27$ nmoles/min/ 10^7 PMN), determinada pela redução do cit c a 550 nm comparativamente a preparações celulares que continham os mesmos componentes, acrescidos de 5 U da enzima SOD.

Quando os PMN foram incubados previamente com o licnofolido, a

liberação de $O_2^{\bullet-}$ foi inibida de forma dose-dependente. A Figura 12 mostra este efeito em PMN estimulados com PMA, cuja concentração de licnofolido necessária para inibir totalmente o “burst” respiratório foi de $250 \mu\text{g}/10^7$ PMN. Aumento da quantidade desta lactona ($350 \mu\text{g}/10^7$ PMN) não mostrou efeito diferente sobre a atividade enzimática do complexo NADPH oxidase estimulada por ativação direta de PKC. Quando os dados obtidos foram replotados de forma semi-logarítmica e analisados por equação de regressão linear, obteve-se um coeficiente de correlação (r) de valor 0,9957, indicando correlação direta entre a massa de licnofolido utilizada nos tratamentos prévios dos PMN e a inibição da atividade enzimática do complexo NADPH oxidase. Através da mesma análise foi mostrada que a concentração de licnofolido necessária para inibir 50% da liberação de $O_2^{\bullet-}$ foi $39 \mu\text{g}/10^7$ PMN (gráfico inserido na Figura 12).

4.2.2. Estímulos através de ligação a receptores de membrana

Suspensões celulares de PMN inflamatórios, quando submetidas a estímulos que desencadeiam o “burst” respiratório através de ligação a sítios específicos de membrana, liberaram quantidade menor de $O_2^{\bullet-}$ que sob estímulo direto de PKC. PMN estimulados com o tripeptídeo quimiotático fMLP ($1 \mu\text{M}$) liberaram $1,7 \pm 0,14$ nmoles/min/ 10^7 células, enquanto que os fagócitos estimulados com OZ (100 partículas/célula) produziram $1,4 \pm 0,2$ moles/min/ 10^7 PMN, sendo que, em ambos os casos, esta liberação foi inibida pela lactona sesquiterpênia licnofolido (Figuras 13 e 14, respectivamente).

Comparando-se o efeito da lactona sobre a atividade enzimática do complexo NADPH oxidase estimulada pelos dois diferentes estímulos de membrana testados, fica evidente a similaridade da resposta dos fagócitos. O

valor de $59 \mu\text{g}/10^7$ PMN foi determinado como ED_{50} em PMN estimulados por fMLP, por análise linear cujo r : 0,9842 (gráfico inserido na Figura 13), e de $65 \mu\text{g}/10^7$ PMN com uma correlação linear: 0,9921 (r), como mostra o gráfico inserido na Figura 14, quando as células foram estimuladas com OZ, sendo que o licnofolido na dose de $300 \mu\text{g}/10^7$ PMN inibiu 100% o “burst” respiratório induzido por quaisquer dos dois estímulos.

De maneira similar àquela ocorrida com PMN estimulados por PMA, o aumento da massa de licnofolido ($350 \mu\text{g}/10^7$ PMN) não provocou alteração de resposta do sistema enzimático NADPH oxidase quando os fagócitos foram estimulados por fMLP ou por OZ.

Figura 12. Inibição da liberação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ por PMN inflamatórios sob estímulo de PMA causada por licnofolido. Os fagócitos ($10^7/\text{mL}$), previamente tratados com licnofolido (10-350 μg , 20 min, 37°C), foram estimulados com PMA (40 ng) e o “burst” respiratório monitorado a 550 nm. O efeito foi calculado em relação aos PMN não tratados. A análise por regressão linear (gráfico inserido) mostrou $\text{ED}_{50} = 39 \mu\text{g}/10^7 \text{ PMN}$ e alta correlação ($r = 0,9957$) entre as doses da lactona e o decréscimo da quantidade de $\text{O}_2^{\bullet-}$ liberada pelos fagócitos. Resultados expressos como média $\pm$ dp; $n = 5$.

Figura 13. Efeito de licnofolido sobre a liberação de $O_2^{\bullet-}$ por PMN estimulados com fMLP. Suspensões celulares de PMN (10^7 células/mL) foram incubadas com diferentes doses (10-350 μg) da lactona sesquiterpênica licnofolido, seguindo-se a estimulação do “burst” respiratório com o tripeptídeo quimiotático fMLP (1 μM). O efeito inibitório da lactona mostrou uma tendência correlacionada diretamente com a dose da lactona utilizada, o que foi confirmado por análise da linearidade dos dados (gráfico inserido). A ED_{50} foi calculada como 59 $\mu\text{g}/10^7$ PMN pela análise das médias $\pm$ dp de 5 experimentos independentes.

Figura 14. Ação da lactona sesquiterpênica licnofolido sobre a atividade de NADPH oxidase induzida por OZ. PMN foram estimulados com OZ (100 partículas/PMN) após tratamento prévio dos fagócitos com doses crescentes de licnofolido (10-350 $\mu\text{g}/10^7$ PMN) e a liberação de O_2^- foi determinada pela redução do cit c. A ação da lactona sesquiterpênica foi analisada através de regressão linear (gráfico inserido) dos dados. A ED_{50} (65 $\mu\text{g}/10^7$ PMN) e o coeficiente de correlação ($r = 0,9921$) foram calculados a partir de média $\pm$ dp; $n=5$.

4.3. Viabilidade celular de PMN inflamatórios tratados com licnofolido

A viabilidade celular foi determinada por dois métodos diferentes: exclusão com azul de Trypan, um método de análise morfológica celular, e pela redução do MTT, que determina a funcionalidade de desidrogenases celulares. A validação desse último método, realizada com uma população celular variável dentro da faixa de 1×10^5 - 10^6 PMN, apresentou alto coeficiente de correlação ($r=0,9912$) entre o número de células viáveis presentes e a densidade óptica indicadora da redução do MTT.

A Tabela 2 mostra que não houve diferença entre a análise do número de PMN viáveis por ambas as metodologias ($94 \pm 5\%$ e $89 \pm 4\%$). Ainda, na mesma Tabela, é mostrado que a incubação com licnofolido ($350 \mu\text{g}/10^7$ PMN, 37°C , 20 min) não alterou a viabilidade celular, o que exclui a citotoxicidade desta lactona sobre os fagócitos testados nessas condições. Assim, os efeitos detectados pela ação do licnofolido não podem ser atribuídos à morte celular.

Tabela 2. Viabilidade celular de PMN tratados com licnofolido.

Adição	PMN viáveis (%)	
	Método	
	Redução de MTT	Exclusão com azul de Trypan
	89 ± 4	94 ± 5
Licnofolido	91 ± 5	92 ± 3

PMN foram incubados com licnofolido ($350 \mu\text{g}/10^7$ PMN, 37°C , 20 min) e alíquotas (5×10^5 PMN) das suspensões celulares foram submetidas à determinação de viabilidade celular pela redução de MTT. Os resultados estão expressos como média $\pm$ dp de cinco experimentos independentes realizados cada um em triplicata.

4.4. Capacidade de reação com citocromo *c* e de dismutação direta de $O_2^{\bullet-}$ por licnofolido

Para verificar a possibilidade do licnofolido causar interferência no método usado para detecção de $O_2^{\bullet-}$, foi determinado o espectro de absorção do cit *c* (0,75 mM) entre 1.100 a 210 nm, na presença e na ausência de licnofolido (350 μ g/mL). A Figura 15 mostra o resultado da análise da espectroscopia de varredura na ausência e na presença de licnofolido. Nota-se a mudança do espectro na região do ultra-violeta quando foi adicionada a lactona, coincidente com o pico de absorção máxima característico ($\lambda=262$ nm) dessa classe de compostos. No entanto, não há mudança espectral, ou seja, deslocamento ou alteração de intensidade na região de absorção de luz visível, em especial no comprimento de onda utilizado para a detecção de $O_2^{\bullet-}$ pela redução do cit *c* ($\lambda=550$ nm).

Ainda, o licnofolido foi incapaz de causar dismutação direta de $O_2^{\bullet-}$ produzido pelo sistema xantina-xantina oxidase, cuja validação foi realizada com o acréscimo de 1 U de SOD (Figura 16).

Tomados em conjunto, estes resultados excluem a interferência da lactona no método utilizado neste trabalho para a detecção da produção de $O_2^{\bullet-}$ pelos PMN inflamatórios, bem como a hipótese de dismutação direta de $O_2^{\bullet-}$.

Figura 15. Espectros de absorção do cit c (0,75 mM) na ausência e na presença de licnofolido (350 µg/mL).

Figura 16. Efeito do licnofolido sobre a redução do cit c por $O_2^{\bullet-}$. A redução do cit c foi monitorada a 550 nm, utilizando-se 1 U de SOD como controle positivo da reação de dismutação do $O_2^{\bullet-}$ produzido enzimaticamente.

4.5. Ação de licnofolido sobre o período “lag” de PMN inflamatórios

Foi analisado o período “lag” dos PMN inflamatórios sob os três diferentes estímulos usados para disparar o “burst” respiratório dos fagócitos. Esse período, referente ao tempo necessário para que as células fagocitárias respondam ao estímulo adicionado através da montagem do complexo NADPH oxidase, iniciando a produção de $O_2^{\bullet-}$, foi de 90 ± 12 s quando os PMN foram estimulados com PMA, o qual manteve-se inalterado quando os fagócitos foram previamente incubados com diferentes concentrações de licnofolido, como mostrado na Figura 17 (A).

A detecção do período “lag” dos PMN estimulados com fMLP foi de 110 ± 20 s, enquanto que os fagócitos sob estímulo de OZ mostraram o período “lag” como 117 ± 18 s, mostrados na Figura 17 (B e C, respectivamente). Embora a análise das médias dos períodos “lag” detectados sob os diferentes estímulos tenha mostrado uma tendência de aumento quando são comparadas as respostas celulares ao PMA em relação aos compostos fMLP e OZ, não há diferença estatística significativa entre estas.

De maneira similar à resposta dos PMN estimulados pela via da PKC, os fagócitos, quando estimulados por agentes que atuam através de receptores de membrana, não mostraram qualquer mudança no período “lag” devida à incubação prévia com a lactona licnofolido.

Figura 17. Período “lag” do sistema enzimático NADPH oxidase de PMN estimulados com PMA (A), fMLP (B) e OZ (C). O período “lag” foi determinado como o momento em que a densidade óptica (550 nm) interceptou a linha de base, indicando o início da produção de $O_2^{\bullet-}$ por PMN tratados ou não com licnofolido. Resultados representativos de cinco experimentos independentes e reprodutíveis.

4.6. Consumo de O_2 por PMN inflamatórios sob diferentes estímulos para liberação de $O_2^{\bullet-}$ e efeito do licnofolido

PMN de focos inflamatórios peritoneais mostraram um consumo de $7,5 \pm 1,1$ nmol O_2 /min/ 10^7 PMN quando estimulados com PMA. Esta taxa foi significativamente maior ($p < 0,01$) que aquelas apresentadas pelas células fagocitárias estimuladas com $1 \mu M$ de fMLP ($5,7 \pm 1,2$ nmol O_2 /min/ 10^7 PMN) ou por 100 partículas de OZ/PMN ($5,4 \pm 0,9$ nmol O_2 /min/ 10^7 PMN), embora não haja diferença entre o consumo de O_2 pelos fagócitos que tiveram a produção de $O_2^{\bullet-}$ estimulada pelos compostos que se ligam a receptores de membrana, quando estas taxas são comparadas entre si.

Este evento foi inibido pelo tratamento prévio dos PMN com licnofolido, como mostrado na Figura 18. PMN sob os três diferentes estímulos testados apresentaram similaridade na resposta quando tratados com as respectivas doses da lactona capaz de inibir 100% do “burst” respiratório: o consumo de O_2 retorna ao nível daquele detectado em PMN não estimulados ($2,7 \pm 0,2$ nmol O_2 /min/ 10^7 PMN), o que fica evidente quando se analisa a Figura 19.

Figura 18. Consumo de oxigênio por PMN estimulados por PMA (painel A), fMLP (painel B) ou OZ (painel C). Suspensões celulares (10^7 PMN/mL) foram incubadas com diferentes doses de licnofolido (5-350 $\mu\text{g}/10^7$ PMN) e, após adição de PMA (40 ng), fMLP (1 μM) ou OZ (100 partículas/PMN) para estimular o “burst” respiratório, o consumo de O₂ foi monitorado por 5 minutos. Os resultados representam a média $\pm$ dp de três experimentos independentes.

Figura 19. Consumo de O₂ por PMN inflamatórios. PMN (10⁷/mL) sem tratamento prévio com licnofolido ou incubados previamente (20 min, 37 °C) com a lactona (350 µg/10⁷ PMN) foram mantidos sem estímulo ou submetidos à estimulação do sistema enzimático NADPH oxidase com PMA (40 ng), fMLP (1 µM) ou OZ (100 partículas/PMN). A determinação do consumo de O₂ foi realizada em oxígrafo e expressa como média±dp; n=3. **p*<0.0001 em comparação às suspensões celulares não estimuladas; ***p*<0.001 em relação aos PMN tratados previamente com licnofolido e submetidos a estímulo com o mesmo agente; ****p*<0,05 em comparação aos PMN estimulados com fMLP ou com OZ.

4.7.Efeito da suplementação de D-glicose, Ca^{2+} , Mg^{2+} , DTT e GSH sobre a inibição do “burst” respiratório de PMN por licnofolido

Verificamos a possibilidade da inibição do “burst” respiratório de PMN, causada pelo licnofolido, ser revertida ou prevenida através da suplementação de diferentes fontes energéticas e iônicas. PMN incubados com licnofolido (ED_{50}) foram suplementados, antes ou depois dessa incubação, com D-glicose ($5\text{-}100\ \mu\text{g}/10^7\ \text{PMN}$), seguindo-se a estimulação do sistema NADPH oxidase com PMA, fMLP ou OZ. A Figura 20 mostra que nenhuma resposta diferente dos fagócitos na liberação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ foi detectada devida a essas suplementações.

A disponibilidade de Ca^{2+} e Mg^{2+} é relatada como essencial para a montagem e a sustentação da atividade do complexo enzimático NADPH oxidase de fagócitos. Assim, testamos também a hipótese de que a ação inibitória do licnofolido na liberação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ por PMN estimulados pelos três diferentes agentes fosse devida à indisponibilização metabólica destes íons. Para tanto, suplementamos as suspensões celulares com concentrações adicionais de CaCl_2 ($5\text{-}50\ \mu\text{g}/10^7\ \text{PMN}$) e de MgCl_2 ($5\text{-}50\ \mu\text{g}/10^7\ \text{PMN}$) antes ou após a incubação com licnofolido (ED_{50}), seguindo-se a estimulação para a liberação de $\text{O}_2^{\bullet-}$.

A Figura 21 mostra que nenhuma destas incubações foi capaz de reverter a ação inibitória de licnofolido sobre o “burst” respiratório de PMN, cuja percentagem de inibição não oscilou significativamente em relação às células tratadas com a mesma dose de licnofolido e não suplementadas.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

Figura 20. Efeito da suplementação de D-glicose sobre a inibição do “burst” respiratório de PMN causada pelo licnofolido. Adições suplementares de D-glicose foram realizadas às suspensões celulares antes ou depois do tratamento com licnofolido (ED₅₀) e o “burst” foi estimulado com os respectivos agentes (PMA, fMLP ou OZ). Os resultados representam as médias±dp (n=3) dos resultados obtidos com as adições prévias ou posteriores do carboidrato ao meio.

Figura 21. Ação do acréscimo de Ca²⁺ ou Mg²⁺ sobre a liberação de O₂⁻ por PMN tratados com licnofolido. As adições foram realizadas previamente ou após o tratamento com licnofolido (ED₅₀) e os respectivos estímulos (PMA, fMLP ou OZ) foram fornecidos aos fagócitos (10⁷/mL). Resultados expressos como média±dp de três experimentos independentes.

Estudos prévios mostraram que a integridade de grupamentos sulfidrila é essencial para a atividade do sistema enzimático NADPH oxidase fagocitária. Assim, testamos a resposta de PMN inflamatórios frente às suplementações de compostos tiólicos como agentes possivelmente capazes de reverter a inibição causada pela lactona. Foram adicionadas diferentes concentrações de GSH (1-100 $\mu\text{g}/10^7$ PMN) ou de DTT (1-100 $\mu\text{g}/10^7$ PMN) às preparações celulares após a incubação com licnofolido (ED_{50}). Nestas condições, ambos os reagentes foram incapazes de reativar o “burst” respiratório de PMN (Figura 22).

Figura 22. Efeito da adição de DTT ou GSH sobre a atividade do complexo enzimático NADPH oxidase de PMN previamente tratados com licnofolido. PMN previamente incubados com licnofolido (ED_{50}) receberam adições de DTT ou GSH (1-100 $\mu\text{g}/10^7$ PMN) e a liberação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ foi monitorada pela redução do cit c. Os resultados representam a média $\pm$ dp de três experimentos independentes com cada um dos agentes estimulantes do “burst” respiratório (PMA, fMLP ou OZ).

Entretanto, quando os mesmos compostos foram adicionados às suspensões de PMN antes da incubação com liconofolido (ED_{50}), significativa ação antagônica à inibição de liberação de $O_2^{\bullet-}$ foi detectada. Adição de 5 μ g de DTT eliminou a ação inibitória em $8\pm4\%$, enquanto que concentração idêntica de GSH exerceu maior efeito, prevenindo em $16\pm4\%$ a inibição do “burst” respiratório induzido por PMA. Ambos os reagentes sulfidríla, DTT e GSH, foram capazes de exercer a máxima prevenção do efeito inibitório do liconofolido na concentração de 20 μ g/ 10^7 PMN. Nestas condições, como mostrado na Figura 22, GSH mostrou-se capaz de proteger em $31\pm4\%$ a atividade do sistema NADPH oxidase, enquanto DTT teve uma ação menos acentuada ($16\pm4\%$).

As adições de DTT ou de GSH mostraram um efeito menos acentuado na prevenção da inibição causada pelo liconofolido em PMN sob quaisquer dos dois estímulos que atuam através de receptores de membrana que em células estimuladas por PMA. A Figura 23 mostra que 5 μ g de DTT não apresentou nenhum efeito significativo sobre a inibição causada pelo liconofolido nestas condições, e que o acréscimo da mesma massa de GSH se mostrou capaz de impedir em $18\pm5\%$ a inibição da liberação de $O_2^{\bullet-}$ por PMN estimulados por fMLP, embora não tenha sido efetiva quando os fagócitos foram estimulados com OZ.

Figura 23. Efeito de DTT ou GSH sobre a inibição causada pelo licnofolido no “burst” respiratório de PMN. Adições de DTT ou GSH foram realizadas antes das incubações com licnofolido (ED_{50}) e a liberação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ foi estimulada com PMA (A), fMLP (B) ou OZ (C). * $p < 0,05$ em relação ao controle; ** $p < 0,05$ comparado à mesma concentração de GSH; *** $p < 0,05$ em relação às diferentes doses do mesmo tiol.

4.8. Níveis de GSH e GSSG em PMN inflamatórios

Uma vez que incrementos de reagentes sulfidrilas (GSH e DTT) antes da incubação dos PMN com licnofolido foram capazes de prevenir parcialmente o efeito inibitório desta lactona sobre a liberação de $O_2^{\bullet-}$, notadamente sob estímulo de PMA, analisamos as concentrações de GSH e GSSG em PMN não estimulados e estimulados com esse forbol, tendo sido os mesmos submetidos à incubação prévia com diferentes doses de licnofolido.

A Figura 24 mostra a ação do licnofolido como agente depletor de GSH livre nas células, onde se destaca o fato de que não ocorre acúmulo de GSSG nas células. Sob adição de $250 \mu\text{g}/10^7$ PMN desta lactona, dose capaz de inibir totalmente o “burst” respiratório dos fagócitos, o nível de GSH cai $89 \pm 7\%$. A correlação entre a inibição do complexo NADPH oxidase e a depleção de GSH livre por licnofolido fica evidente quando os dados correspondentes são analisados em conjunto (Figura 25). Aqui ressalta-se que, embora a curva de tendência traçada pela queda da quantidade de $O_2^{\bullet-}$ liberada pelos fagócitos e aquela cujo traçado descreve a diminuição dos níveis de GSH livre sejam similares, uma pequena, porém persistentemente detectada, concentração deste tripeptídeo na forma reduzida foi mantida nos fagócitos, mesmo quando o “burst” respiratório foi totalmente inibido.

Figura 24. Depleção de GSH livre em PMN por licnofolido. Suspensões celulares (10^7 PMN/mL) foram submetidas a incubações com diferentes doses de licnofolido, e os níveis de GSH e GSSG foram determinados em 412 nm. As concentrações de GSH e GSSG foram calculadas como média $\pm$ dp das diferenças detectadas entre extratos na ausência ou presença de glutathione redutase de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Figura 25. Análise comparativa entre o efeito inibitório da liberação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e depleção de GSH livre em PMN por licnofolido. Os resultados obtidos pelo tratamento de PMN inflamatórios com licnofolido sobre o “burst” respiratório estimulado por PMA e sobre a depleção de GSH livre nas mesmas células foram replotados paralelamente, evidenciando uma alta correlação entre os dois eventos celulares.

Em PMN não estimulados, os níveis das formas reduzida e oxidada detectadas do tripeptídeo foram de $12,1 \pm 0,3$ nmol GSH/ 10^7 PMN e $0,2 \pm 0,05$ nmol GSSG/ 10^7 PMN, respectivamente. Quando os fagócitos foram estimulados com 40 ng de PMA, houve um significativo decréscimo da concentração de GSH para $9,0 \pm 0,22$ nmol/ 10^7 PMN, sem aumento correspondente da concentração de GSSG, como mostrado na Tabela 3, em cujos resultados também está mostrada a queda do nível de GSH celular para $9,6 \pm 0,56$ nmol/ 10^7 PMN quando os fagócitos foram incubados com a dose de licnofolido capaz de causar 50% de inibição na liberação de $O_2^{\bullet-}$. Fagócitos previamente tratados com a lactona e estimulados com PMA mostraram potenciação na depleção de GSH, situação em que foi detectada queda de $56 \pm 1,3$ % deste tripeptídeo livre nos fagócitos.

Tabela 3. Efeito de licnofolido e de PMA sobre os níveis de GSH e GSSG em PMN.

Adição	Concentração (nmol/ 10^7 PMN)	
	GSH	GSSG
	$12,1 \pm 0,30$	$0,20 \pm 0,07$
Licnofolido	$9,6 \pm 0,56^*$	$0,27 \pm 0,08$
PMA	$9,0 \pm 0,22^*$	$0,26 \pm 0,09$
Licnofolido+PMA	$5,3 \pm 0,12^{***}$	$0,19 \pm 0,04$

As concentrações de GSH e GSSG foram determinadas em extratos celulares de PMN não estimulados ou estimulados com PMA (40 ng/ 10^7 células, 10 min), após incubação dos fagócitos com licnofolido ($ED_{50}=39$ μ g, 20 min) ou apenas com o veículo. Os resultados estão expressos como média $\pm$ dp de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$ em relação aos fagócitos não incubados com licnofolido e não estimulados com PMA; *** $p < 0,001$ comparados aos PMN apenas tratados com licnofolido ou estimulados com PMA.

4.9. Detecção e identificação do aduto glutathionil-licnofolido *in vitro* e *ex vivo*

Com base nesses dados que suportam fortemente uma ação da lactona sesquiterpênica licnofolido como um agente depletor de GSH livre em PMN, verificamos a hipótese da formação de um aduto glutathionil-licnofolido. Inicialmente foi investigada a formação desse aduto *in vitro* através de uma reação direta entre GSH e licnofolido em concentrações equimolares (200 mM). Alíquotas do meio de reação foram analisadas por infusão direta no espectrômetro de massa usando radiação por “eletrospray” (ESI) nos modos positivos e negativo. A análise em modo positivo mostrou um único íon quasi-molecular, cujo pico m/z 666 foi selecionado no primeiro quadrupolo, variando-se a energia de colisão de modo a se gerar mais fragmentação molecular por dissociação induzida por colisão. A presença desse íon pode ser atribuída à formação de um aduto glutathionil-licnofolido, cujo mecanismo de formação através de reação tipo adição de Michael está mostrado na Figura 26. Esta reação foi confirmada pela análise por MS/MS desse íon, que forneceu um perfil de fragmentação rico em informação estrutural, como pode ser observado na Figura 27, cujos fragmentos gerados indicam a perda de grupos funcionais característicos. A presença do fragmento m/z 648 é resultante da desidratação do íon quasi-molecular $([M+H]^+)$ m/z 666. O íon m/z 591 pode ser gerado por perda de C_2H_3NO do íon m/z 648. A perda de grupo $C_5H_7NO_3$ pelo íon 591 gera o fragmento de m/z 462, o qual, após perda de CO origina m/z 434, como indicado na sequência 1 da Figura 28. A geração do fragmento de massa 537 é explicada pela perda de $C_5H_7NO_3$ pelo íon m/z 666, enquanto que a presença do fragmento 519 se deve à perda de água pelo íon 537. O fragmento 519 gera o íon 502 por perda de amônia (sequência 2 na Figura 28). A perda de $C_{20}H_{22}O_6$ pelo íon parental m/z 666 forma o fragmento 308, que após perda de $C_5H_7NO_3$

origina o fragmento m/z 179. Esta fragmentação está indicada, respectivamente como A, B e C na Figura 28 que apresenta a proposição do mecanismo de fragmentação (sequência 3). A ocorrência intensa do íon B (m/z 308, Figura 27) resultante da perda neutra do esqueleto do licnofolido, é a comprovação final da ligação deste composto à GSH através de uma reação tipo adição de Michael envolvendo os grupamentos α -metileno- γ -lactônico e os grupos carbonilas $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ insaturados do licnofolido.

Uma vez verificada a formação do aduto glutationil-licnofolido *in vitro* por reação química, verificamos a formação do mesmo aduto *ex vivo* nos fagócitos peritoneais inflamatórios tratados com $250 \mu\text{g}/10^7$ PMN. Após o período de incubação idêntico àquele utilizado para o estudo do efeito da lactona sobre o “burst” respiratório, as células foram desproteinizadas enzimaticamente, sendo então centrifugadas e o sobrenadante resultante submetido à análise por ESI-MS, cujo espectro de massa adquirido no modo “full scan” confirmou a presença do íon m/z 666. Este íon foi selecionado e analisado por MS/MS (modo “daughter scan”), cujo perfil de fragmentação foi idêntico ao mostrado pela análise do íon parental formado *in vitro* (Figuras 27 e 28).

Figura 26. Seqüência de reações mostrando a formação do auto glutationil-licnofolido através do mecanismo de reação por adição de Michael.

Figura 27. Perfil de fragmentação em ESI-MS/MS do aduto glutathionil-licnofolido.

Figura 28. Mecanismo proposto para a fragmentação do aduto glutationil-licnofolido.

4.10.S-glutinação protéica em PMN

4.10.1.Distribuição do “pool” de tióis celulares em PMN estimulados com PMA e efeito do licnofolido

Para estudarmos o efeito de licnofolido no processo de sinalização celular por S-tiologia protéica associada ao “burst” respiratório de PMN estimulados com PMA, o “pool” de tióis de PMN foi marcado com uma mistura de aminoácidos radioativos (cisteína-[^{35}S]-metionina-[^{35}S]) após inibição da síntese protéica com ciclohexemida. Os tióis não protéicos e os tióis ligados a proteínas foram separados por precipitação ácida com HClO_4 , após os PMN serem submetidos à estimulação do “burst” respiratório com PMA e/ou tratados com diferentes concentrações de licnofolido, e a incorporação da radioatividade foi determinada comparativamente aos PMN não estimulados.

A incorporação total de radioatividade foi de 1.236 ± 52 cpm/ 10^7 PMN. Verificamos que em todas as amostras submetidas às análises, a radioatividade atribuída aos tióis não protéicos, acrescida dos valores detectados após a redução da fração protéica com DTT, totalizou, em média, $98 \pm 1,3\%$, indicando claramente que a síntese protéica foi eficientemente inibida pela ciclohexemida, e que o processo de S-tiologia é revertido por redução química.

Os resultados da análise da distribuição dos tióis marcados estão mostrados na Tabela 4, onde se nota que PMN não estimulados tiveram uma incorporação de radioatividade significativamente ($p < 0,0001$) mais alta na fração de tióis não protéicos (1.230 ± 115 cpm) que em tióis protéicos (82 ± 8 cpm), a qual não foi afetada pelo tratamento dos PMN com o licnofolido ($39 \mu\text{g}/10^7$ células). Quando os fagócitos foram estimulados com PMA, houve uma diminuição significativa ($p < 0,001$) da contagem de radioatividade nos tióis não protéicos

(832±32), paralelamente ao aumento proporcional da detecção de radioatividade associada à fração protéica (327±82). Estes dados mostram que em PMN não estimulados, em torno de 6% dos tióis marcados se ligam à fração protéica, e apontam para uma mudança de localização dos tióis celulares decorrente do estímulo do complexo enzimático NADPH oxidase da ordem de 22% de aumento na ocorrência de proteínas S-tioladas.

Esta mudança de localização de tióis devida à estimulação do complexo NADPH oxidase de PMN foi profundamente alterada quando os fagócitos foram previamente incubados com licnofolido. A dose de 10 µg da lactona determinou uma pequena queda (3%) na fração de tióis associada a proteínas, com um aumento similar da radioatividade detectada como ligada aos tióis solúveis, quando comparada às células estimuladas e não tratadas com a lactona. PMN submetidos ao tratamento com a dose determinada como ED₅₀ de licnofolido em relação à liberação de O₂^{•-}, mostraram 20% de tióis marcados associados à proteínas, o que corresponde a uma diminuição de 8% de tiolação protéica comparada a PMN estimulados e não tratados com o licnofolido, notando-se, ainda, um aumento médio da contagem atribuída aos tióis não protéicos de 5%.

Quando as células fagocitárias foram tratadas com 250 µg de licnofolido/10⁷ PMN e posteriormente estimuladas com PMA, 90% da contagem radioativa foi detectada como associada aos tióis solúveis, valores similares àqueles determinados em PMN não estimulados. Nessas mesmas condições, a incorporação de tióis pela fração protéica representou 10% da radioatividade total, o que significa uma queda da ordem de 18% em relação à S-tiolação detectada em proteínas provenientes de PMN estimulados com PMA e não tratados com licnofolido.

Tabela 4. Distribuição de tióis solúveis e ligados a proteínas em PMN tratados com licnofolido, em estado dormente ou estimulados com PMA.

Adição	Contagem (cpm/10 ⁷ PMN)	
	Associada a tióis solúveis	Associada a tióis protéicos
	1230±115	82±8
Licnofolido (39 µg)	1202±186	74±4
PMA	832±32*	327±82*
Licnofolido (10 µg) + PMA	901±57*	298±65*
Licnofolido (39 µg) + PMA	974±83**	235±61**
Licnofolido (250 µg) + PMA	1145±98***	121±11***

PMN marcados com a mistura de cisteína-[³⁵S]-metionina-[³⁵S] após inibição da síntese protéica, foram incubados com diferentes doses de licnofolido e mantidos em estado dormente ou estimulados com PMA (40 ng/10⁷ células, 10 min). A incorporação dos aminoácidos radioativos foi determinada como a diferença da contagem nos sobrenadantes antes (tióis solúveis) ou após (tióis protéicos) a redução com DTT. Os resultados estão expressos como a média±dp (n=3) da diferença entre os resultados provenientes de PMN controle (não tratados e não estimulados) e os diferentes grupos experimentais. **p*<0,001; ***p*<0,01; ****p*<0,05 em comparação ao controle (sem nenhuma adição).

4.10.2. Identificação dos tióis associados à fração protéica e alterações causadas pelo tratamento com o lcnofolido

Para identificarmos quais os tióis que se ligam majoritariamente à fração protéica durante o “burst” respiratório de PMN induzido pela via da PKC, alíquotas das frações protéicas previamente precipitadas com HClO_4 foram solubilizadas em PBS após correção do pH com NaOH para o valor de 7,4, sendo então incubadas prolongadamente com DTT. Após nova precipitação ácida, o sobrenadante, onde encontravam-se os tióis liberados por redução química, foram analisados por HPLC. Os picos mais intensos foram detectados como correspondentes à cisteína (4,4 min) e GSH (5,8 min), por comparação com o tempo de retenção dos respectivos padrões (Figura 29).

As frações eluídas como componentes dos picos de identificação da cisteína (4,2-4,6 min) e GSH (5,2-6,0 min), foram submetidas à análise da incorporação da radioatividade, cujos resultados estão mostrados na Figura 30. Os resultados deixam claro que $80 \pm 4\%$ dos tióis marcados que se associam à fração protéica são representados por GSH, enquanto que apenas $13 \pm 3\%$ destes tióis são representados por cisteína.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

Figura 29. Cromatograma típico obtido para separação de GSH e L-cisteína. O pico 1 corresponde à eluição de ácido ascórbico (2 nM) utilizado como padrão interno. Os picos 2 e 5 são referentes ao tempo de eluição do monômero e do dímero de DTNB. As frações correspondentes às eluições de cisteína (20 nM) e GSH (10 nM) padrões são referentes aos picos 3 e 4, respectivamente. O perfil cromatográfico A refere-se àquele obtido com os compostos padrões e B corresponde à separação dos tióis ligados à fração protéica de PMN.

Figura 30. Detecção de radioatividade associada à cisteína e à GSH. As frações componentes dos picos identificados como cisteína (4,2-4,6 min) e GSH (5,2-6,0 min) foram coletadas e tiveram a incorporação de radioatividade determinada. As amostras foram identificadas como 1: PMN não estimulados; 2: PMN tratados com licnofolido (39 $\mu\text{g}/10^7$ células); 3: PMN estimulados com PMA. As amostras 4, 5 e 6 referem-se às análises de extratos celulares de PMN tratados com licnofolido (10, 39 e 250 $\mu\text{g}/10^7$ células, respectivamente) e posteriormente estimulados com PMA. * $p < 0,001$ em comparação aos PMN não estimulados; ** $p < 0,05$ e *** $p < 0,01$ em comparação aos PMN estimulados com PMA.

4.10.3. Separação de proteínas S-glutationadas em PMN e análise da ação do licnofolido

Uma vez estabelecido que a S-glutationação é o evento predominante no processo de S-tiolação protéica associado ao “burst” respiratório estimulado por PMA em PMN de focos inflamatórios, analisamos as proteínas S-glutationadas. Amostras das frações protéicas de PMN tratadas com NEM ou com DTT foram separadas por eletroforese. Os géis corados com azul de Comassie foram, então, expostos em filmes para produzir as correspondentes autoradiografias, subsequentemente analisadas por densitometria.

Autoradiografias que representam os resultados típicos obtidos estão mostradas na Figura 31. À esquerda (A) está mostrado um resultado representativo da análise de amostras tratadas com NEM, onde verifica-se que em PMN não estimulados (linha 1) não foi detectada nenhuma proteína marcada, assim como nas amostras provenientes de fagócitos tratados com licnofolido (linha 3). Quando PMN foram estimulados com PMA, houve uma intensa S-glutationação protéica, processo identificado pela visualização de seis bandas nitidamente marcadas, correspondentes às proteínas de migração relativa a 38, 24, 22, 20, 18 e 14 kDa. Essa marcação foi totalmente suprimida quando as amostras foram reduzidas por DTT (Figura 31 B).

O tratamento prévio dos fagócitos com licnofolido (Figura 31 A, linhas 4, 5 e 6) mostrou-se correlacionado de forma dose-dependente com a diminuição da intensidade da S-glutationação protéica induzida pela estimulação da liberação de $O_2^{\bullet-}$ por PMA, embora este efeito não tenha sido idêntico em todas as proteínas S-glutationadas.

As bandas correspondentes às proteínas de 38 e 24 kDa mostraram

uma diminuição da intensidade de S-glutathionação acentuada, sendo que, em PMN tratados com a dose de licnofolido capaz de inibir 100% o “burst” respiratório, esse processo de modificação protéica pós-traducional foi totalmente abolido (Figura 32, painel superior).

Analisando a Figura 32, painel inferior, nota-se que as bandas correspondentes às proteínas de 22, 20, 18 e 14 kDa mostraram uma intensidade de S-glutathionação induzida pelo estímulo com PMA sensivelmente maior que das bandas de 38 e 24 kDa. Entretanto, embora o gradual incremento das doses de licnofolido utilizadas no tratamento dos PMN tenha causado uma diminuição nesta intensidade, o processo de S-glutathionação protéica não foi abolido, mesmo em PMN incubados com a lactona em dose suficiente para inibir 100% da liberação de $O_2^{\bullet-}$.

Figura 31. Autoradioagrafias em condições oxidadas (A) e reduzidas (B). As proteínas de PMN foram separadas por SDS-PAGE e as respectivas autoradiografias reveladas. Linha 1: PMN são estimulados; linha 2: PMN estimulados com PMA (40 ng); linha 3: PMN tratados com licnofolido ($39 \mu\text{g}/10^7$ PMN); linha 4: PMN tratados com licnofolido ($10 \mu\text{g}/10^7$ PMN) e estimulados com PMA (40 ng); linha 5: PMN tratados com licnofolido ($39 \mu\text{g}/10^7$ PMN) e estimulados com PMA (40 ng); linha 6: PMN tratados com licnofolido ($250 \mu\text{g}/10^7$ PMN) e estimulados com PMA (40 ng). Os padrões de peso molecular estão mostrados em kDa.

Figura 32. Densitometria das bandas protéicas S-glutationadas em PMN sob estímulo de PMA e efeito do licnofolido. A autoradiografia dos géis cujas amostras foram tratadas com NEM foram submetidas à densitometria para a quantificação da incorporação de radioatividade decorrente do processo de S-glutationação protéica. Está mostrado um resultado representativo de três experimentos independentes e reproduzíveis referentes às proteínas de PMN estimulados com PMA, tratados ou não previamente com licnofolido.

5. DISCUSSÃO

5.1. Ativação e atividade do complexo NADPH oxidase fagocitário induzidas por diferentes estímulos

Os fagócitos profissionais desempenham um papel essencial na defesa do organismo contra agentes estranhos. Dentre eles, os PMN, células de vida relativamente curta em comparação aos macrófagos, são únicas em sua capacidade de resposta rápida frente a diferentes agentes que estimulam a produção de ERO/ERN, paralelamente à liberação do conteúdo dos grânulos intracelulares no fagossoma (Morel *et al.*, 1991; Leusen *et al.*, 1996; Babior, 1999; Witko-Sarsat *et al.*, 2000).

A capacidade de diferentes estímulos em induzir a atividade do complexo NADPH oxidase, determinando a produção de $O_2^{\bullet-}$ por PMN inflamatórios, varia consideravelmente na dependência do agente estimulante, como fica evidente quando se comparam as respostas aos diferentes compostos que foram utilizados nesse trabalho (Figuras 12, 13 e 14). O forbol co-carcinogênico PMA estimula o “burst” respiratório de fagócitos ativando diretamente a PKC, determinando a produção de uma quantidade significativamente maior de $O_2^{\bullet-}$ ($2,63 \pm 0,27$ nmoles/min/ 10^7 PMN) que aquelas liberadas em resposta a quaisquer dos dois estímulos dependentes de receptores de membrana, fMLP e OZ ($1,7 \pm 0,14$ e $1,4 \pm 0,2$ nmoles/min/ 10^7 PMN, respectivamente).

Tanto a magnitude da produção de $O_2^{\bullet-}$ e outras ERO por PMN, quanto a cinética das respostas celulares variam na dependência de estímulos diversos. PMA é relatado como um agente que elicitava uma resposta rápida e sustentada por um período de tempo mais prolongado que o oligopeptídeo

sintético fMLP na ativação de PMN sanguíneos humanos, não somente em relação à produção de $O_2^{\bullet-}$, mas também quanto à produção de $^{\bullet}NO$ (Lärfars & Gyllenhammar, 1998). Por outro lado, OZ é relatado como um estimulante do “burst” respiratório que determina uma resposta mais tardia e de intensidade menor de produção de $O_2^{\bullet-}$ (Newburger *et al.*, 1980; Rabadji *et al.*, 1996), resultados condizentes com os nossos aqui mostrados.

O complexo NADPH oxidase é um sistema enzimático multi-compartimentalizado, com componentes localizados no citossol e na membrana de grânulos secretórios em estado não estimulado. Assim, um período “lag” de resposta do sistema, após a adição de um composto capaz de provocar a ativação do mesmo, é concernente à montagem do complexo enzimático para a produção catalítica de $O_2^{\bullet-}$. Foi mostrado que em PMN humanos, o estímulo com PMA determina rápida despolarização de membrana, evento que se inicia apenas 5 segundos após o contato do forbol com a membrana celular, enquanto que a produção de $O_2^{\bullet-}$ é detectada depois de 50 segundos da adição do mesmo agente. Neste relato, a especificidade da resposta desse agente químico foi claramente demonstrada por comparação com o uso do análogo estrutural 4-O-metil forbol 12-miristato 13-acetato, o qual foi incapaz de elicitar ambas as respostas celulares, despolarização de membrana e produção de $O_2^{\bullet-}$, as quais também estão ausentes em fagócitos de pacientes portadores de CGD (Whitin *et al.*, 1980). Em células de mesma origem, outros relatos mostraram um período “lag” médio de 54 segundos como resposta à mesma concentração de PMA (Newburger *et al.*, 1980). Nós detectamos um período “lag” de 90 ± 12 segundos na resposta de PMN de focos inflamatórios ao PMA. Essas discrepâncias de valores podem ser atribuídas às diferentes concentrações de forbol utilizadas, uma vez que, enquanto utilizamos $40ng/10^7$ PMN, nos relatos citados acima foi utilizada uma

concentração sensivelmente maior ($1 \mu\text{g}/2 \times 10^6$ células).

Por outro lado, relatos de diferentes tempos na resposta de fagócitos ao OZ são encontrados. Um período “lag” médio de 36 segundos após adição desse agente foi mostrado em granulócitos (Newburger *et al.*, 1980), enquanto que PMN de sangue periférico humano tiveram uma produção de IP_3 , decorrente do acionamento da fosfolipase C, paralelamente ao aumento da concentração citossólica de íon cálcio livre e à ativação do “burst” respiratório em 60 segundos (Meshulam *et al.*, 1988). Nossos resultados evidenciam que o tempo de resposta de PMN inflamatórios não difere significativamente quando o agente fornecido às células fagocitárias depende da ocupação de receptores de membrana (fMLP e OZ) ou liga-se diretamente em seu sítio de ação no citossol (PMA), como mostrado na Figura 17. Na comparação dessas diferentes respostas encontradas por nós e outros autores, além das concentrações diferentes dos estimulantes utilizados, deve ser levada em consideração a diversidade das populações celulares que foram objeto de estudo, uma vez que, além das células serem provenientes de espécies animais diferentes, fagócitos provenientes de focos inflamatórios são mais responsivos aos estímulos para a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ que aquelas populações celulares que não foram previamente expostas a agentes inflamatórios.

5.2. Inibição do “burst” respiratório de PMN pelo licnofolido

5.2.1. Mecanismos de inibição do complexo NADPH oxidase

A produção de ERO/ERN por PMN é um processo que ocorre sob um refinado controle fisiológico (Pontremoli *et al.*, 1989; Brigagão & Colepicolo, 1996; Chan *et al.*, 1998; Hatanaka *et al.*, 2003). Se de um lado esse evento

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

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

No primeiro grupo encontram-se substâncias que interferem em um ou mais estágios da montagem do complexo, ou nas diferentes vias de transdução de sinais necessárias à sustentação da produção de $O_2^{\bullet-}$, ou ainda, em vias metabólicas específicas que são acionadas na célula durante o “burst” respiratório, como a via das hexoses monofosfato. Nesse grupo incluem-se compostos capazes de diminuir a atividade do complexo NADPH oxidase através da alteração da expressão de receptores nos PMN ou mudança da afinidade da ligação de agonistas a seus respectivos receptores. Desse modo,

análogos estruturais que atuam competitivamente com fMLP (Becker, 1983), ou H_2O_2 , que afeta a ligação de LPS e OZ aos respectivos receptores de membrana (Dekaris *et al.*, 1998), provocam um decréscimo da produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ por células fagocitárias. Inibidores de vias de sinalizações específicas, como a toxina pertússica, capaz de inibir a transdução de sinal via proteína G (Casey & Gilman, 1988), aspirina (Maridonneau-Parini *et al.*, 1986), diclofenaco e indometacina (Cross, 1990), inibidores do metabolismo de fosfolípídeos, além de compostos que contêm selênio (Gopalakrishna *et al.*, 1997), alfa-tocoferol (Chan *et al.*, 2001) e flavonóides (Lu *et al.*, 2001; Meng *et al.*, 2001; Ko *et al.*, 2004), que inibem a atividade catalítica de proteínas quinases ou ativam fosfatases, são alguns dos compostos conhecidos como capazes de suprimir o “burst” respiratório de fagócitos por vias bioquímicas específicas.

Entre os inibidores diretos do complexo NADPH oxidase encontram-se aqueles compostos capazes de impedir ou retardar a ativação do mesmo. Assim, inibidores da ação de flavoproteínas, como o análogo de FAD, 5-deaza-FAD, além de difeniliodônio e quinacrina, que, por possuírem potencial redox maior que FAD impedem a transferência de elétrons para o citocromo b_{558} a partir de NADPH, determinam menor produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ provocando um aumento do período “lag” do sistema enzimático (Cross, 1990). Efeito semelhante é exercido por $\text{NO}^{\bullet}$, que impede a montagem do complexo NADPH oxidase, retardando ou anulando a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ por PMN em função da concentração no meio de reação (Fujii *et al.*, 1997; Rodenas *et al.*, 1998).

5.2.2. Ação do licnofolido como inibidor do complexo NADPH oxidase

A incubação prévia das suspensões celulares de PMN inflamatórios com o licnofolido determinou uma inibição do “burst” respiratório com uma correlação direta entre a dose da lactona e a quantidade de $O_2^{\bullet-}$ liberada pelos fagócitos. Esse efeito não pode ser atribuído a uma possível toxicidade do licnofolido, uma vez que a viabilidade celular se mantém inalterada quando se comparam populações de PMN não tratados e expostos a doses da lactona capazes de inibir totalmente a atividade do complexo NADPH oxidase (Tabela 2). Ainda, mostramos que esse fitocomposto não altera o estado redox do cit c nem reage diretamente com o $O_2^{\bullet-}$ produzido enzimaticamente pelo sistema hipoxantina/xantina-oxidase (Figuras 15 e 16), o que exclui duas possíveis interferências químicas no método de detecção da atividade do complexo NADPH oxidase utilizado nesse trabalho. Assim, o efeito observado pode ser atribuído a alterações metabólicas celulares provocadas pelo licnofolido nos fagócitos, o que causa um impedimento na produção de $O_2^{\bullet-}$.

A resposta do sistema NADPH oxidase de PMN ao licnofolido aponta para uma ação da lactona que não depende de uma inibição direta sobre os componentes do complexo, uma vez que o período “lag” não foi alterado. Diferentes compostos estudados se mostraram capazes de inibir, total ou parcialmente, a produção de $O_2^{\bullet-}$ sem alterar o tempo necessário para a montagem do complexo enzimático. O composto químico NEM, um bloqueador de grupamentos tióis livres, foi mostrado como um agente inibidor do “burst” respiratório de granulócitos humanos de forma dose-dependente, sem alterar o período “lag” da resposta celular (Newburger *et al.*, 1980), enquanto que o sistema NADPH oxidase endotelial não mostra a mesma resposta a esse

composto (Janiszewski *et al.*, 2000). Trabalhos posteriores mostraram que outros reagentes alquilantes, como acroleína e crotonaldeído, também inibem o “burst” respiratório de PMN sanguíneos e de macrófagos alveolares estimulados por PMA (Witz *et al.*, 1987; Kilpatrick *et al.*, 1995). Outros inibidores do complexo NADPH oxidase foram descritos como capazes de alterar a sustentação da atividade enzimática sem afetar a montagem do sistema, como o diacetato de 2-hidroximetil-1-naftol (Wang *et al.*, 1999).

5.2.3. Estudo comparativo da ação do licnofolido sobre as diferentes vias bioquímicas de estimulação da NADPH oxidase

Lactonas sesquiterpênicas são isoladas de diferentes plantas da família Asteraceae e apontadas como os constituintes ativos de um grande número de preparações vegetais utilizadas na medicina popular e em formulações fitoterápicas específicas. Entre outras ações farmacológicas atribuídas a estes compostos está a capacidade de afetar uma grande diversidade de respostas bioquímicas associadas ao processo inflamatório (Picman, 1986). O estabelecimento do processo inflamatório determina marcantes mudanças bioquímicas nos tecidos e células envolvidas, como a liberação de fatores específicos que amplificam e perpetuam as respostas patológicas associadas a esse evento, muitas das quais foram apontadas como susceptíveis de regulação por diferentes lactonas sesquiterpênicas. Cinaropicrina, reinosina e satamarina, lactonas constituintes de folhas de *Saussurea lappa* suprimiram de forma dose-dependente a produção de citocinas inflamatórias. De forma particular, esse relato ressalta que a cinaropicrina inibe a liberação de TNF- α por macrófagos murinos estimulados por LPS, sendo essa ação abolida pela

adição de cisteína (Cho *et al.*, 1998). A liberação da IL-8, uma interleucina pró-inflamatória que apresenta potente ação quimiotática e ativadora sobre neutrófilos, está relacionada com a propagação da resposta inflamatória. A regulação da expressão de IL-8 é complexa, envolvendo mecanismos das etapas de transcrição (Matsusaka *et al.*, 1993) e pós-transcrição, sendo mostrado ainda que TNF- α ativa a região promotora do gene codificador desta interleucina (Yu & Chadee, 1998). Mazor *et al.* (2000) demonstraram que as lactonas isohelenina e partenolida inibem *in vitro* a expressão desse gene em linhagens de células pulmonares epiteliais humanas expostas a TNF- α . Em outros estudos realizados na mesma época, foi mostrado que uma dessas lactonas, a partenolida, é capaz de inibir a transcrição do gene de IL-6 em células de hepatoma HepG2 humano através da supressão da fosforilação de tirosina do fator STAT3, evento necessário para a expressão de diferentes interleucinas. Concernente com a ação de lactonas em função de sua capacidade alquilante, esse evento foi inibido por β -mercaptoetanol (Sobota *et al.*, 2000).

A ação de diferentes lactonas sesquiterpênicas como compostos inibidores da ativação do fator de transcrição NF- κ B foi amplamente estudado, sendo essa ação proposta como a principal responsável pelo efeito antiinflamatório de diversas plantas da família Asteraceae utilizadas na medicina popular (Rüngeler *et al.*, 1999; Castro *et al.*, 2000). O NF- κ B é um fator de transcrição pluripotente envolvido na regulação da expressão de vários genes pró-inflamatórios. Em condições não inflamatórias, esse fator se encontra no citoplasma com as diferentes subunidades formando um complexo. Em resposta a estímulos inflamatórios, a subunidade inibitória I κ B é rapidamente degradada por ativação de vias de ubiquitinação, fosforilação e acionamento de proteasoma, o que libera as subunidades catalíticas que

migram para o núcleo e determinam a expressão de vários genes de resposta inflamatória (Ghosh *et al.*, 1998). A ação alquilante de lactonas sobre a subunidade p65 do fator de transcrição NF- κ B, um mediador central na resposta inflamatória, impedindo sua ligação ao DNA, foi amplamente estudada. Em células Jurkat-T tratadas com fator necrosante tumoral (TNF- α), a inibição completa da ligação do NF- κ B ao DNA causada pela ação de lactonas sesquiterpênicas foi mostrada como dependente do número de centros alquilantes na estrutura dos compostos vegetais. A ação foi postulada como decorrente do estabelecimento de ligações cruzadas entre os resíduos de cisteína 38 e 120 mediada por lactonas na estrutura do fator de transcrição, alterando a conformação espacial necessária para sua dissociação e translocação nuclear (Rüngeler *et al.*, 1999). Outros estudos com o mesmo alvo celular mostraram a lactona partenolida como um agente capaz de inibir a ação da I κ B quinase em células HeLa, uma enzima essencial para a ativação do NF- κ B (Kwok *et al.*, 2001).

Relatos da ação de lactonas sesquiterpênicas sobre a liberação de ERO/ERN por fagócitos são mais recentes na literatura. Matsuda *et al.* (2000) relataram o efeito do extrato etanólico de *Laurus nobilis* na liberação de $\cdot$ NO por macrófagos inflamatórios, através da inibição de iNOS, sendo essa atividade atribuída a sete diferentes lactonas identificadas no referido extrato. Posteriormente, o mesmo grupo mostrou que em macrófagos inflamatórios peritoneais, a produção de $\cdot$ NO induzida por LPS de *Salmonella enteritidis* foi inibida *in vitro* pela costunolida e seu isômero, a lactona deidrocostunolida, através de um mecanismo que sugere o envolvimento da proteína de choque térmico HSP 72 (Matsuda *et al.*, 2003). Anteriormente havia sido mostrado que cinaropicrina inibe a produção de $\cdot$ NO por macrófagos murinos, bem como a proliferação de linfócitos (Cho *et al.*, 2000). Em ambos os casos, as ações

foram detectadas após prolongada incubação das células (20 horas) com o composto testado, o qual, entretanto, não afetou a viabilidade celular.

O efeito de ciclopentenonas sesquiterpênicas extraídas de esponjas marinhas da espécie *Dysidea*, foram relatadas como inibidoras seletivas de fosfolipase A₂ proveniente, entre outras fontes, de macrófagos da linhagem RAW 264.7. Ainda, estes compostos, que apresentam analogia estrutural com as lactonas sesquiterpênicas, mostraram capacidade de inibir a quimioluminescência e a liberação de elastase por neutrófilos estimulados por PMA, bem como por citocalasina b combinada com o tripeptídeo fMLP (Giannini *et al.*, 2001).

A ação do licnofolido em PMN estimulados por diferentes compostos que acionam o “burst” respiratório foi estudada nesse trabalho para verificar as respostas específicas elicitadas pelos respectivos agentes estimuladores. Nós mostramos aqui que, quando estimuladas com PMA, as células fagocitárias mostraram maior sensibilidade à adição da lactona (ED₅₀=39 µg/10⁷ PMN) que quando foram submetidas a estímulo com fMLP (ED₅₀=59 µg/10⁷ PMN) ou OZ (ED₅₀=65 µg/10⁷ PMN). Reforçando essa diferença de ação da lactona em função da via de estímulo da NADPH oxidase acionada em PMN, na Figura 12 é mostrado que a dose de 250 µg de licnofolido foi capaz de inibir totalmente a liberação de O₂^{•-} estimulada pela via da PKC, enquanto que a mesma resposta celular determinada por fMLP ou OZ, em uma suspensão com igual número de fagócitos, foi inibida em sua totalidade por uma quantidade significativamente maior da lactona (300 µg/10⁷ PMN, Figuras 13 e 14, respectivamente). Assim, as diferentes respostas de PMN ao licnofolido refletem diretamente as diferentes vias bioquímicas acionadas por PMA, OZ ou fMLP.

Em relato anterior (Nunez *et al.*, 2003) nós já havíamos mostrado que a capacidade de tubiferina, uma lactona sesquiterpênica isolada de *Wunderlichia*

crulsiana, como inibidor da atividade do complexo NADPH oxidase de PMN era igualmente dependente da via de estimulação dos fagócitos. De maneira similar à mostrada aqui, o efeito de inibição desse composto sobre a via de PKC foi mais acentuado que quando os fagócitos foram estimulados com fMLP ou OZ. O estímulo da via de PKC pelo agente co-carcinogênico PMA, além de ativar a NADPH oxidase, através da fosforilação de p47^{phox} e p67^{phox}, determinando a montagem do complexo enzimático catalizador da produção de O₂[•] (Babior, 1992), ativa também a iNOS, produzindo [•]NO (Carreras *et al.*, 1997). A ação de licnofolido nesse sistema é corroborado por relatos anteriores da capacidade de diferentes lactonas sesquiterpênicas em diminuir *in vivo* o edema localizado induzido pela aplicação subcutânea de PMA (Silván *et al.*, 1996).

Por outro lado, OZ age em PMN ligando-se a receptores de membrana que determinam produção de ERO/ERN pela ativação de outras vias bioquímicas além daquela dependente de PKC, resultando na ativação da cascata do ácido araquidônico (Cheung *et al.*, 1983). A inibição dessa cascata de eventos pelo licnofolido ocorreu, de maneira similar, por outras lactonas sesquiterpênicas como a hidroxiachilina, extraída da planta *Tanacetum microphyllum*, que foi mostrada como um composto que inibe *in vitro* a atividade de cicloxigenase e lipoxigenase (Abad *et al.*, 1994) e cacoespongionolida que inibe a atividade de fosfolipase A₂ sinovial (Pastor *et al.*, 1999).

Muitos inibidores do sistema NADPH oxidase fagocitário são seletivos para determinadas vias de transdução de sinais acionadas por compostos específicos (Kilpatrick *et al.*, 1992; Burnett *et al.*, 1994; Abdelghaffar *et al.*, 1997; Stolarek *et al.*, 2002). Entretanto, o efeito de licnofolido sobre os PMN estimulados com PMA, fMLP ou OZ foi semelhante, embora com uma intensidade maior sobre a estimulação direta de PKC, o que nos leva a propor

que a ação dessa lactona ocorre através de eventos metabólicos comuns às diferentes vias acionadas.

5.3. Diminuição do consumo de oxigênio por PMN determinada pelo licnofolido

A ativação do complexo NADPH oxidase de fagócitos, com a resultante produção de oxidantes, está diretamente associada a um aumento abrupto no consumo de O_2 dissociado da cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa mitocondrial, como claramente mostrado pela insensibilidade do sistema enzimático a inibidores específicos da cadeia respiratória (Sbarra & Karnovsky, 1959; Babior, 1992). A observação do incremento desse consumo de O_2 , que ocorre apenas sob estimulação celular associada à produção de $O_2^{\bullet-}$, tem sido utilizada como uma ferramenta para se mostrar a ativação de fagócitos (Fujii *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999).

O consumo de O_2 por neutrófilos humanos não estimulados foi relatado como relativamente baixo (menos que $1 \text{ nmol/min}/10^7$ células a 37°C) em relação a outras células sanguíneas. Após poucos segundos de contato com um estímulo de “burst” respiratório este consumo aumenta significativamente, sendo que a intensidade de O_2 consumido ocorre em função do agente utilizado (Morel *et al.*, 1991). Ainda, o efeito de “priming” de neutrófilos sanguíneos tem sido mostrado como correlacionado com a potenciação do consumo de O_2 (Hatanaka *et al.*, 2003).

Para confirmar o efeito do licnofolido sobre a atividade do complexo NADPH oxidase em PMN estimulados por diferentes vias bioquímicas, nós determinamos o consumo de O_2 por suspensões celulares tratadas e não tratadas previamente com a lactona. PMN de focos inflamatórios não

estimulados consumiram, em média 2,7 nmol O₂/min/10⁷ células. Como mostrado nas Figura 19, sob estímulo de PMA, esse consumo aumentou significativamente (média de 3 vezes). A adição de fMLP ou OZ às suspensões de PMN determinou um incremento menor no consumo de O₂, da ordem de 2 vezes. Esse aumento foi correlacionado com a maior produção de O₂^{•-} por PMN estimulados pela via de PKC em relação à produção dessa ERO decorrente da estimulação dos fagócitos com ambos os agentes que atuam através de receptores de membrana.

O tratamento prévio dos PMN com o licnofolido provocou uma diminuição do consumo de O₂ pelas células, efeito detectado com os três diferentes estímulos utilizados para ativar o “burst” respiratório (Figura 18). De maneira similar, *NO foi relatado como inibidor da ativação da NADPH oxidase fagocitária apresentando concomitante diminuição de consumo de O₂ por neutrófilos (Fujii *et al.*, 1997) e o composto químico sintético diacetato de 2-hidroximetil-1-naftol provocou o mesmo efeito em neutrófilos de ratos estimulados com fMLP ou com PMA (Wang *et al.*, 1999).

Em uma análise mais detalhada do efeito da lactona sobre o consumo de O₂ pelos PMN inflamatórios, fica claro que o licnofolido não exerce efeito sobre o mesmo em células não estimuladas (Figura 19), fato que reforça a não detecção de ação citotóxica desse composto sobre os fagócitos, determinação previamente realizada através de exclusão com azul de Trypan e redução de MTT (Tabela 2). Esse parâmetro é enfatizado pelo fato de que quando PMN foram tratados com uma massa de licnofolido suficiente para inibir totalmente o “burst” respiratório de PMN estimulado por quaisquer dos três compostos, PMA, fMLP ou OZ, o consumo de O₂ retorna ao patamar detectado em células não estimuladas.

5.4.Prevenção do efeito inibitório do licnofolido sobre o “burst” respiratório de PMN por DTT e GSH

A inibição da captação de glicose por fagócitos determina diminuição da atividade de NADPH oxidase, uma vez que esse monossacarídeo é o substrato inicial da via das hexoses monofosfato que supre a contínua necessidade de NADPH para sustentar a produção de $O_2^{\bullet-}$ (Cross, 1990). Assim, na tentativa de elucidar o modo de ação através do qual o licnofolido determina inibição do “burst” respiratório de PMN, suplementamos o meio de reação com concentrações crescentes de D-glicose, tanto antes quanto após o período de incubação dos fagócitos com a lactona (ED_{50}). Nenhum efeito decorrente dessas suplementações foi detectado, como pode ser notado na Figura 20, independente das vias bioquímicas pelas quais os fagócitos foram estimulados, o que nos leva a concluir que a disponibilidade metabólica dessa fonte energética não é afetada pelo tratamento dos PMN com o licnofolido. De forma semelhante, a inibição da liberação de $O_2^{\bullet-}$ por neutrófilos humanos determinada pela adição de HOCl exógeno não foi revertida pela adição de D-glicose (Carr & Winterbourn, 1997). Contrariamente, fenilbutazona (Simchovitz *et al.*, 1979), análogos de D-glicose como 2-desoxiglicose e manose (Rest *et al.*, 1988) foram relatados com inibidores do “burst” respiratório de fagócitos por afetarem a utilização metabólica de D-glicose. Além desses, a quinacrina, um agente inibidor de captação de glicose, tem sua ação inibitória sobre o complexo NADPH oxidase revertida pela suplementação do meio de reação com esse monossacarídeo (Hurst *et al.*, 1986).

O complexo enzimático NADPH oxidase é mostrado como funcionalmente dependente de fontes iônicas. O envolvimento do íon Mg^{2+} na montagem do sistema NADPH oxidase, através da agregação correta de seus diferentes componentes, bem como para a manutenção da atividade catalítica

da produção de $O_2^{\bullet-}$ é relatado em sistemas “cell free” (Suzuki *et al.*, 1985; Glass *et al.*, 1986; Babior *et al.*, 1988). O papel desse cátion foi apontado como estabilizador do complexo NADPH oxidase através de ação sobre F-actina, ação revertida pela adição de ATP à preparação reconstituída pelas frações citossólicas e de membrana de neutrófilos e ativada por detergente aniônico (Tamura *et al.*, 2001). Também em experimentos com fagócitos intactos, a presença de Mg^{2+} foi relatada como essencial para a manutenção da atividade catalítica de NADPH oxidase (Suzuki *et al.*, 1985; Cross, 1990).

O papel do íon Ca^{2+} no “burst” respiratório de fagócitos foi postulado há longo tempo, corroborado pela constatação de que ionóforos de cálcio, como o composto A23187, induzem a liberação de $O_2^{\bullet-}$ por PMN (Schell-Frederick, 1974). Embora a presença de Ca^{2+} não seja condição essencial para o acionamento do “burst” respiratório, uma vez que vias independentes deste metal são funcionais em fagócitos na presença de estimulantes da liberação de $O_2^{\bullet-}$, a adição de quelantes metálicos como EDTA (Cohen & Chovaniec, 1978b) ou de agentes farmacológicos sequestradores de cálcio, como verapamil e tetraciclina (Glette *et al.*, 1984), foram mostrados como mecanismos de limitação da atividade de NADPH oxidase. Em concordância, diacetato de 2-hidroximetil-1-naftol foi sugerido como um agente capaz de inibir o “burst” respiratório de neutrófilos sanguíneos estimulado por fMLP e PMA através de um mecanismo sugerido como captação de Ca^{2+} extracelular, o que diminuiria, dessa forma, o influxo celular desse íon durante a ativação celular. Paralelamente, os autores mostraram que a fosforilação de $p47^{phox}$ pela PKC cálcio-dependente encontrava-se diminuída (Wang *et al.*, 1999).

Nós mostramos que a suplementação do meio de reação com soluções de sais de Ca^{2+} ou Mg^{2+} não foi capaz de prevenir nem tampouco de reverter a inibição causada pelo licnofolido. As células tratadas com as respectivas

massas da lactona capazes de inibir 50% da liberação de $O_2^{\bullet-}$ por PMA, fMLP ou OZ, não mostraram nenhuma resposta diferente daquela detectada pelos PMN não suplementados (Figura 21). Esses resultados nos levam a excluir a possibilidade de que o licnofolido possa atuar como quelante iônico, de forma diferenciada de outros fitocompostos como esculetina e quercetina, flavonóides capazes de seqüestrar cátions, indisponibilizando-os para a montagem e/ou manutenção da atividade catalítica de NADPH oxidase fagocitária (Takemura *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 2001; Selloum *et al.*, 2001; Moridani *et al.*, 2003).

A integridade de grupamentos sulfidrilas necessária para o funcionamento do complexo NADPH oxidase (Babior, 2000) é evidenciada através de relatos da ação de compostos alquilantes como aldeídos de baixo peso molecular presentes no fluido peritoneal dialisado que têm seu efeito inibitório sobre a liberação de $O_2^{\bullet-}$ por fagócitos revertido pela adição de DTT e, mais acentuadamente, por GSH (Yahyapour *et al.*, 2001). O efeito de NEM e de 4-hidroxinonenal, compostos químicos bloqueadores de grupamentos sulfidrilas, também é descrito como inibidor do complexo NADPH oxidase fagocitário, e, de forma semelhante aos nossos achados, essa ação é prevenida pela adição de DTT às suspensões celulares (Newburger *et al.*, 1980; Siems *et al.*, 1997).

Lactonas sesquiterpênicas são conhecidas como compostos capazes de ligar-se de forma covalente a grupamentos sulfidrila através de reação tipo adição de Michael através de suas carbonilas α,β -insaturadas (Heilmann *et al.*, 2001). Rüngeler *et al.* (1999) estudaram a relação estrutura/atividade de 28 diferentes lactonas sobre a inibição do fator de transcrição NF- κ B, elucidando a atividade química desses compostos através de grupamentos carbonilas insaturados, os quais reagem com nucleófilos, especialmente grupamentos sulfidrila de cisteína, através de reação de adição. Ainda em concordância com

os nossos resultados (Figuras 22 e 23), foi mostrado que um excesso de DTT previne a reação da lactona helenalina com NF- κ B, mas a mesma concentração desse reagente não reverte a alquilação de grupamentos -SH de resíduos de cisteína presentes nesse fator de transcrição (Lyb *et al.*, 1998), indicando que a ligação de lactonas sesquiterpênicas a grupamentos sulfidríla celulares, uma vez estabelecida, é estável o suficiente para ser revertida apenas parcialmente pelo acréscimo de DTT e GSH.

5.5. Depleção de GSH livre em PMN determinada pelo licnofolido

Os tióis celulares, entre outras moléculas bioquímicas, desempenham um papel significativo na vida celular por serem capazes de minimizar conseqüências deletérias de um desbalanço entre oxidantes e antioxidantes, além de prover uma resposta celular adaptativa aos estresses oxidativo e/ou nitrosativo. Em células de mamíferos, GSH é o mais abundante tiol de baixo peso molecular (Sies, 1986; Filomeni *et al.*, 2002), que além da forma reduzida, está presente como duas formas oxidadas: GSSG e como tiol protéico misto R-SSG. Ambas as formas oxidadas podem ser reduzidas de volta a GSH pela catálise das enzimas glutathione redutase e pelo sistema tioredoxina/glutaredoxina. Além de suas ações como um composto que ajuda a manter o balanço redox celular, GSH funciona como um modulador da atividade de enzimas dependentes de tióis, e atua como cofator de enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase (Halliwell & Gutteridge, 1999; Filomeni *et al.*, 2002). Recentemente, estudos apontam para um papel pró-oxidante de GSH, desempenhado pelo dipeptídeo cisteinil-glicina formado durante o catabolismo de GSH, através da ectoenzima γ -glutamyltransferase (Paolicchi *et al.* 2002; Pompella *et al.*, 2003).

Em condições fisiológicas, a concentração da forma reduzida GSH é 10 a 100 vezes maior que da forma oxidada GSSG. Várias evidências experimentais surgidas na última década têm demonstrado que mudanças na proporção GSH/GSSG influenciam inúmeros eventos celulares, envolvendo transdução de sinal e regulação do ciclo celular, entre outros (Halliwell & Gutteridge, 1999; Filomeni *et al.*, 2002; Paolicchi *et al.* 2002; Pompella *et al.*, 2003). Assim, em resposta a uma situação de estresse oxidativo e/ou nitrosativo, a razão GSH/GSSG celular tende a cair, tanto por decréscimo da concentração de GSH, que pode ocorrer com aumento de GSSG, quanto por extrusão celular de GSH. Nessas condições, a célula tende a manter seu estado redox aumentando a atividade de glutathione redutase, concomitantemente ao aumento da síntese *de novo* de GSH pela ativação da enzima γ -glutamyl-cisteína sintetase e, em alguns casos, pela captação de GSH do meio (Seres *et al.*, 2000). Entretanto, se a situação de estresse se prolonga e os sistemas celulares não são mais capazes de conter os efeitos deletérios de ERO/ERN, a concentração de GSH livre declina, levando a degenerações irreversíveis e morte celular (Sies, 1999; Halliwell & Gutteridge, 1999; Klatt & Lamas, 2000).

A partir da constatação de que DTT e GSH previnem parcialmente a inibição do "burst" respiratório de PMN causada pelo licnofolido, especialmente quando as células foram estimuladas com PMA, e, associando esses dados à ampla gama de informações da literatura que apontam as lactonas sesquiterpênicas como agentes depletors de tióis celulares (Picman, 1986; Cho *et al.*, 1998; Sobota *et al.*, 2000; Wen *et al.*, 2002), determinamos os níveis de GSH e GSSG em PMN tratados com essa lactona nas mesmas concentrações que apresentaram efeito sobre o "burst" respiratório estimulado pela via de PKC. Uma clara correlação entre o aumento das concentrações de licnofolido usadas nas incubações dos PMN e o decréscimo dos níveis de GSH

livre, sem variação significativa no conteúdo celular de GSSG, é mostrada na Figura 24. Em uma análise paralela entre a liberação de $O_2^{\bullet-}$ por PMN e os níveis de GSH livre (Figura 25) fica evidente que ambos os eventos celulares analisados estão interrelacionados. Ampliando este estudo, a Tabela 3 explicita que tratamento prévio dos fagócitos com licofolido, seguido da estimulação do sistema NADPH oxidase causou uma potenciação na perda de GSH livre celular.

Resultados semelhantes aos nossos foram relatados por Chai *et al.* (1994a), que detectaram concentrações médias de 2,7 nmol de GSH e 0,18 nmol de GSSG/ 2×10^6 neutrófilos humanos não estimulados, com uma queda de GSH após 5 minutos de estimulação com PMA, sem variação significativa na concentração de GSSG. Perda de GSH da ordem de 30-40% em neutrófilos estimulados com PMA durante 30 minutos foi relatada por Carr & Winterbourn (1997), que apresentaram fortes evidências que esse processo é decorrente da produção de ERO/ERN pelas células estimuladas. No citado trabalho, HOCl exógeno adicionado aos neutrófilos produziu efeito depletor de GSH, enquanto que metionina e tiodipropionato, ambos “scavengers” de HOCl, preveniram a queda do nível de GSH celular. Outros sugeriram que a formação de cloraminas é o fator determinante para o decréscimo de GSH em neutrófilos estimulados pela via de PKC (Ogino *et al.*, 1997).

Reforçando o papel de GSH durante a manutenção do “burst” respiratório de fagócitos foi mostrado que monócitos humanos estimulados com PMA ou com OZ, ou ainda na presença de H_2O_2 exógeno, são capazes de captar em torno de 10 vezes mais GSH do meio extracelular que os fagócitos não estimulados. A ação de catalase inibindo esse processo, enquanto que SOD incrementou o mesmo, aponta para H_2O_2 como um dos compostos sinalizadores do evento. Conjuntamente, esses diferentes relatos sugerem fortemente que GSH celular protege os fagócitos das ERO/ERN produzidas a

partir da estimulação do complexo NADPH oxidase (Seres *et al.*, 2000).

5.6. Formação do aduto glutathionil-licnofolido

Tomando por base os resultados anteriores que apontam para uma ação depletora da forma reduzida GSH pelo licnofolido, sem acúmulo da forma oxidada, paralelamente à inibição da atividade do sistema NADPH oxidase fagocitária, postulamos uma reação direta entre a lactona e GSH. Para verificarmos essa hipótese, realizamos, inicialmente, uma reação *in vitro* entre os dois compostos. As condições de reação foram determinadas por informações prévias que mostraram a dependência do pH para a ocorrência da reação de lactonas com tióis celulares (Schmidt *et al.*, 1999). As amostras do meio de reação analisadas por MS no modo “full scan” mostraram a presença de um único composto detectado como o íon *quasi*-molecular com m/z 666, compatível com a formação de um monoaduto entre o licnofolido e GSH mostrado na Figura 26 (Costa *et al.*, 2003), o que foi confirmado pela análise por MS/MS, cujo mecanismo de fragmentação proposto é coerente com um aduto produzido pela adição nucleofílica da GSH ao grupamento α -metilênico γ -lactônico do licnofolido, como mostram as Figuras 27 e 28. Estudos anteriores ao nosso (Picman, 1986) já haviam sugerido a formação de um monoaduto entre a lactona sesquiterpênica helenalina e GSH, embora não tenha sido feita qualquer caracterização química do possível composto formado. Ainda em concordância com nossos resultados, reações equimolares de GSH e da lactona helenalina *in vitro* foram relatadas como determinantes da formação de um monoaduto, sendo que a formação de traços de um biaduto GSH-lactona-GSH foi detectado por NMR apenas em presença de altas concentrações do tripeptídeo (Schmidt, 2000).

Lactonas do grupo helenanolido, especialmente helenalina e seus derivados extraídos de flores de *Arnica montana*, têm recebido grande atenção em pesquisas farmacêuticas em decorrência de seus potenciais como agentes antineoplásicos e antiinflamatórios. A reatividade química desses compostos é atribuída aos dois centros reativos em sua estrutura, um anel ciclopentenona α,β insaturado e um grupamento metilênico conjugado com a carbonila lactônica, através dos quais ligam-se a estruturas biológicas (Zheng *et al.*, 1996; Schmidt, 1997). Entretanto, estudo da estereoquímica e da cinética da reação de adição de Michael de GSH aos centros reativos da helenalina e alguns de seus derivados através de análise espectroscópica por NMR, demonstrou que a estrutura da ciclopentenona reage aproximadamente 10 vezes mais rapidamente com GSH que o grupamento metilênico conjugado à lactona, enquanto que nossos resultados mostram a formação do aduto glutationil-licnofolido através da adição de GSH ao grupamento metilênico. Os grupamentos químicos laterais diferentes entre as lactonas aqui comparadas, helenalina e licnofolido, podem ter determinado a diferença de reatividade frente à GSH.

A estrita dependência do pH do meio de reação para a ocorrência da adição de GSH à estrutura de lactonas foi observada. As constantes de reação *in vitro* calculadas para diferentes lactonas sesquiterpênicas exibiu uma dependência aproximadamente exponencial do pH, dados que se conciliam com um mecanismo de reação base-catalisada no qual o tiol reage em sua forma desprotonada. Assim, a faixa de pH entre 7-8 mostrou-se como aquela que favorece a reação pela formação do íon tiolato, cuja concentração aumenta com o incremento do pH, uma vez que o valor de pK_a do grupo $-SH$ do resíduo de cisteína na estrutura da GSH é 9,1 (Schmidt *et al.*, 1999).

Poucos estudos evidenciando a formação de adutos lactona-GSH foram feitos em extratos celulares. A reação de artemisina com GSH foi proposta

recentemente como um mecanismo de detoxificação utilizado pelo organismo (Mukanganyama *et al.*, 2001). Essa lactona sesquiterpênica amplamente utilizada como uma droga eficaz antimalárica, especialmente contra cepas resistentes de *Plasmodium falciparum*, foi mostrada como susceptível ao ataque nucleofílico da GSH no grupamento exocíclico insaturado do anel lactônico, similar àquele que relatamos aqui. Ainda, os autores demonstraram que a mesma reação pode ocorrer através de catálise mediada por glutathione transferase, enquanto que anteriormente havia sido mostrado que adutos de helenalina-GSH e de acetato de deidrohelenalina são inibidores da mesma enzima (Schmidt, 2000).

Adicionalmente à formação de adutos de lactonas com GSH, a reação desses fitocompostos com outros tióis depende do número das insaturações no anel lactônico, dos grupamentos laterais ligados aos anéis da estrutura, do pH do meio, bem como da concentração dos tióis. A formação de adutos de lactonas sesquiterpênicas com cisteína livre em pH de valor 7,0 foi detectado por NMR e mostrado como advindo da adição nucleofílica do grupamento lateral -SH do aminoácido ao grupamento insaturado da lactona (Schmidt, 1997). A reação de outras lactonas com resíduos de cisteína que compõem a estrutura de diferentes proteínas, é apontada como uma explicação para diferentes efeitos inibitórios de lactonas sobre atividade catalítica de diversas enzimas. A inibição de isoformas de glutathione transferase por um derivado sintético da lactona haloenol, onde foi introduzido um íon brometo, foi mostrado como decorrente da formação de adutos entre a lactona modificada e a estrutura protéica, especificamente resíduos de cisteína e tirosina essenciais para a catálise (Mitchell *et al.*, 1998) enquanto que um aumento da peroxidação lipídica em tecidos expostos à outras lactonas foi atribuído à depleção de GSH (Jodynis-Liebert *et al.*, 1999). Anteriormente, a indução de reação alérgica cutânea pelo contato com alantolactona e isoalantolactona foi

relatado como devida à formação de proteínas imunoreativas a partir de reações entre as lactonas e centros sulfidríla das estruturas protéicas. De forma interessante, as formas dihidroalantolactona e dihidroisoalantolactona, produzidas por hidrogenação exaustiva dos compostos originais, que, portanto, perderam as insaturações no anel lactônico, não apresentaram a mesma capacidade de indução da resposta alérgica (Schmidt & Chung, 1993).

Em conjunto, esses dados suportam a hipótese de formação de adutos de lactonas sesquiterpênicas com diferentes compostos sulfidríla celulares. Entretanto, nenhum aduto desses metabólitos vegetais havia sido detectado e identificado por ESI-MS e ESI-MS/MS em ensaios bioquímicos *ex vivo*. Nós mostramos que o composto glutationil-licnofolido formado *in vitro* também é originado em PMN tratados com quantidade suficiente da lactona para inibir 100% do "burst" respiratório estimulado com PMA, com estabilidade suficiente para ser detectado após desproteinização enzimática da preparação celular.

5.7.Efeito do licnofolido sobre a S-glutatação protéica em PMN estimulados por PMA

As modificações reversíveis pós-transcrição e pós-tradução nas estruturas protéicas governam a resposta adaptativa das células ao ambiente. Entre outros mecanismos bem estabelecidos dessas modificações, incluem-se as interações proteínas-proteínas, mudanças alostéricas induzidas pela ligação de efetores específicos, processos proteolíticos, além de modificações químicas como acilação, acetilação, alquilação e fosforilação em diferentes sítios de proteínas específicas. O princípio do processo de S-tiolação/detiolação, como todas essas formas dinâmicas de modificações protéicas, é um balanço entre a formação reversível de ligações de compostos

tiólicos a sítios específicos que determinam modificações individuais em diferentes proteínas, o qual ocorre como uma resposta rápida e eficiente da célula a situações de estresses oxidativo/nitrosativo (Thomas *et al.*, 1995; Klatt & Lamas, 2000).

Durante a fagocitose ou sob estímulos específicos, os fagócitos profissionais são capazes de produzir grande quantidade de espécies oxidantes, onde o O_2 é convertido a $O_2^{\bullet-}$ e, posteriormente, a H_2O_2 , $HClO$ e $HO^{\bullet}$, oxidantes mais potentes que $O_2^{\bullet-}$. O complexo enzimático NADPH oxidase de membrana é internalizado durante a formação do fagossoma, e as espécies oxidantes, especialmente H_2O_2 , entram no citoplasma celular. Assim, as próprias células fagocitárias ficam expostas ao ataque oxidativo dessas ERO/ERN, podendo ocorrer ações deletérias devidas ao desbalanço entre a produção de oxidantes e a ação de antioxidantes enzimáticos e de baixo peso molecular, levando à perda de função celular (Babior, 2000; Babior, 2002). O mecanismo reversível de S-glutatação protéica foi mostrado como um evento metabólico importante diretamente associado à produção de oxidantes por fagócitos, tanto na proteção de estruturas celulares contra danos potenciais acarretados por ERO/ERN produzidos pelas próprias células fagocitárias, quanto na regulação metabólica que sustenta tal produção (Chai *et al.*, 1994a; Ravichandran *et al.*, 1994; Carr & Winterbourn, 1997).

Nesse trabalho estudamos a S-glutatação protéica em extratos de PMN inflamatórios para verificarmos se o efeito do licnofolido sobre o “burst” respiratório estimulado por PMA correlacionava-se com esse processo de modificação protéica. A análise da incorporação de radioatividade no “pool” de tióis celulares de PMN inflamatórios e sua localização na fração de tióis não protéicos ou na fração protéica, representadas, respectivamente pela detecção da contagem de radioatividade na fração solúvel ou no precipitado obtido pelo tratamento ácido, mostrou uma significativa mudança devida à estimulação

das células com PMA. Enquanto os fagócitos não estimulados têm pequena percentagem de tióis marcados associada às proteínas (6%), o estímulo do “burst” respiratório de PMN através da ativação da PKC determinou que uma fração considerável (28%) desses se associasse à fração protéica (Tabela 4). Essa mudança de localização celular dos tióis paralela à produção de $O_2^{\bullet-}$ foi previamente relatada de modo similar em neutrófilos humanos sob estímulo com PMA, quando foi estimado que 20-30% da GSH celular encontrava-se ligada à fração protéica, enquanto que apenas 6% do teor celular total desse tripéptido estavam associados a proteínas em células não estimuladas (Carr & Winterbourn, 1997).

Analisando o efeito do licnofolido nos tióis celulares marcados com os aminoácidos radioativos, verificamos que as células tratadas com licnofolido e não estimuladas não apresentaram nenhuma diferença em relação àquelas não tratadas com a lactona. Entretanto, os fagócitos previamente incubados com o licnofolido e posteriormente estimulados com PMA mostraram significativas diferenças em relação às células estimuladas em função das diferentes doses de licnofolido utilizadas. O tratamento das células com $250 \mu\text{g}/10^7$ PMN durante 20 minutos, o que causou inibição total da liberação de $O_2^{\bullet-}$, determinou uma diminuição da associação de tióis à fração protéica da ordem de 18% em relação aos PMN não tratados com a lactona, tendo sido essa diferença de radioatividade detectada na fração de tióis não protéicos, como mostrado na Tabela 4, o que mostra claramente que o tratamento com licnofolido impede a associação de tióis com a fração protéica

A identificação dos tióis associados às proteínas mostrou que $80 \pm 4\%$ desses são constituídos por GSH, enquanto que apenas $13 \pm 3\%$ são representados por cisteína (Figura 30). Evidências acumuladas nos últimos anos já apontavam para um papel central da GSH no processo de S-tioação

protéica, mostrando que, paralelamente a outras funções antioxidantes, esse tiol de baixo peso atua na formação reversível de disulfetos mistos protéicos, representando em torno de 85% dos tióis que se ligam a proteínas, processo implicado não apenas na proteção celular contra estresses oxidativo/nitrosativo, onde GSH converte resíduos de cisteína S-nitrosilada e sulfenatos em disulfetos mistos mais estáveis, mas também na estabilização de proteínas extracelulares e regulação da atividade catalítica de determinadas enzimas (Klatt & Lamas, 2000).

A mobilização dos tióis solúveis para a fração protéica durante a estimulação do complexo NADPH oxidase por PMA que mostramos aqui indica a formação de proteínas S-tioladas, majoritariamente S-glutationadas. Esse evento de modificação pós-traducional de proteínas foi induzido pelo acionamento do complexo NADPH oxidase, uma vez que células não estimuladas não mostraram essa modificação oxidativa, o qual foi revertida pela incubação dos extratos celulares com DTT. Identificamos consistentemente seis bandas marcadas radioativamente em extratos de PMN estimulados com PMA, com migrações relativas a 38, 24, 22, 20, 18 e 14 kDa (Figura 31). As bandas correspondentes às proteínas de 38 e 24 kDa sofreram um decréscimo na incorporação de radioatividade decorrente da incubação prévia dos PMN com licnofolido de forma dose-dependente, sendo totalmente suprimida pela adição da dose de lactona capaz de inibir 100% a liberação de $O_2^{\bullet-}$ pelos fagócitos. Entretanto, as bandas protéicas correspondentes a 22, 20, 18 e 14 kDa, embora tenham apresentado um decréscimo significativo na intensidade de marcação indicadora de S-glutationação, esse processo não foi totalmente abolido pelo tratamento prévio dos fagócitos com licnofolido (Figuras 31 e 32). Essas diferenças são, provavelmente, devidas a dois fatores: o número diferente de sítios de ligação de GSH às estruturas protéicas, o que fica evidente pela intensidade inicial de marcação inicial das quatro bandas

correspondentes a 22, 20 28 e 24 kDa, como verificado pela análise das Figuras 29 e 30 e, ainda, pela afinidade com GSH, que varia de uma proteína para outra em decorrência do ambiente químico diferenciado determinado pela seqüência de aminoácidos de cada proteína.

Previamente havia sido mostrado que diversas proteínas sofrem S-glutathionação em monócitos humanos sob estímulo de PMA, fMLP e OZ, onde a estimulação da via de PKC foi a mais efetiva como indutora do processo de formação de disulfetos mistos proteínas-GSH. Entre as proteínas identificadas no citado estudo, destaca-se a banda correspondente a 38 kDa, que foi identificada como a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Essa proteína que catalisa a produção de 1,3-di-fosfoglicerato a partir de gliceraldeído-3-fosfato, desempenhando um papel chave na glicólise, tem estrutura tetramérica, onde cada subunidade apresenta quatro grupamentos -SH de cisteínas expostos. Portanto, dezesseis grupamentos laterais são, teoricamente, possíveis alvos da ligação de GSH, sendo um deles, Cys 149, posicionado no sítio ativo, cuja S-glutathionação seria o fator determinante para a inibição da atividade enzimática. Assim, durante o “burst” respiratório o “pool” de glicose celular ficaria disponível para a produção de NADPH pela via das hexoses monofosfato (Ravichandran *et al.*, 1994).

Ainda, Ravichandran e colaboradores (1994) mostraram que linfócitos sob adição de PMA não apresentam S-glutathionação da proteína de 38 kDa, bem como monócitos de pacientes portadores de CGD, o que explicita claramente a ligação entre a atividade do sistema NADPH oxidase e o processo de formação de disulfetos mistos proteína-GSH.

Um número grande de proteínas que desempenham funções críticas na vida celular, como transportadoras de membrana, receptores, proteínas quinases e fosfatases (Pompella *et al.*, 2003) possuem resíduos de cisteína acessíveis ao processo de S-glutathionação. Muitos dos estudos que mostraram

ocorrência de S-glutatação protéica utilizaram relativamente altas concentrações de oxidantes exógenos para estimular a situação de estresse oxidativo celular. Em hepatócitos, S-glutatação protéica é descrita como induzida por diquat (Nakagawa *et al.*, 1992), enquanto que em eritrócitos, a formação de ligação entre a cisteína 93 da cadeia β da hemoglobina e GSH foi detectada sob estresse induzido por hidroperóxido de *tert*-butila, paralelamente à S-glutatação de actina, espectrina e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Mawatari & Murakami, 2004). Entretanto, há evidências experimentais de que a formação de disulfetos mistos protéicos durante processos fisiológicos e patológicos ocorre mediada por oxidantes endógenos, como o acúmulo de proteínas S-tioladas reportado como marcadores *in vivo* de danos teciduais oxidativos em pulmões de ratos e de humanos expostos à fumaça de cigarro e no desenvolvimento de lesões das lentes do cristalino humano (Klatt & Lamas, 2000; Muscatt *et al.*, 2004). Proteínas S-tioladas foram também detectadas em células quiescentes, provavelmente como resultado do aumento do nível de formação de ERO/ERN e durante o processo de isquemia/reperfusão cardíaca (Eaton *et al.*, 2002). Notadamente, aumento na S-glutatação protéica tem sido relatada em diferentes patologias humanas, inclusive durante processos inflamatórios (Berlett & Stadman, 1997; Bhattacharjee *et al.*, 2001).

Embora tenhamos mostrado aqui que GSH é um alvo celular para o licnofolido, a análise global dos resultados deixa claro que esse peptídeo não se constitui no único composto ao qual a lactona se liga. Outros alvos podem ser apontados, como proteínas que tenham grupamento –SH acessíveis ao próprio processo de S-glutatação.

Destaca-se como possível alvo de ligação do licnofolido a PKC, em cuja estrutura, ambos os domínios, regulatório e catalítico possuem resíduos de cisteína sensíveis à regulação redox. Enquanto os resíduos de cisteína do domínio regulatório estão associados a moléculas de zinco formando anéis, os

resíduos no domínio catalítico estão livres e podem reagir com agentes alquilantes. A ligação desses aos resíduos de cisteína causa uma inibição da atividade fosfotransferásica da enzima (Gopalakrishna & Jaken, 2000). Anteriormente já foi demonstrado que a curcumina inibe irreversivelmente a atividade de PKC através de ação sobre o seu domínio catalítico (Gopalakrishna *et al.*, 1997), bem como a ligação de GSH no mesmo sítio, como mostrado por estudos com a enzima isolada (Ward *et al.*, 2000) onde seria possível a ligação de licnofolido através do mesmo mecanismo de adição que determinou a formação do aduto GSH-licnofolido. Essa hipótese poderia explicar a maior sensibilidade da via de PKC ao efeito de adição de licnofolido em PMN que relatamos aqui.

O processo de S-glutathionação protéica é metabolicamente relevante, tanto por constituir-se num mecanismo de proteção ao estresse oxidativo/nitrosativo, quanto por prover uma regulação metabólica que supre as necessidades celulares sob situações específicas. Nosso trabalho mostra que, paralelamente a outros eventos metabólicos como fosforilação (Andrews & Babior, 1984; Chan *et al.*, 2001) e síntese protéica (Edwards *et al.*, 1989; McColls *et al.*, 1990; Stringer *et al.*, 1995; Brigagão & Colepícolo, 1996; Brigagão & Colepícolo, 1998), a S-glutathionação protéica está intrinsecamente ligada à resposta de PMN ao estímulo do complexo NADPH oxidase. Explicitamos também aqui que esse processo pode ser modulado por agentes exógenos, o que coloca esse mecanismo pós-traducional como um possível alvo farmacológico para o desenvolvimento de drogas que modulem a liberação de oxidantes por fagócitos.

6. CONCLUSÕES

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

1. A lactona sesquiterpênica licnofolido inibe o “burst” respiratório estimulado por diferentes agentes solúveis e particulados.
2. Entre outros alvos celulares da lactona está a GSH reduzida, que forma um aduto glutationil-licnofolido, indisponibilizando esse tripeptídeo para suas funções celulares.
3. O efeito do licnofolido é exercido através da diminuição do processo de S-glutatação protéica associada ao “burst” respiratório.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad M.J., Bermejo P., Valverde S., Villar A. (1994) Anti-inflammatory activity of hydroxyachillin, a sesquiterpene lactone from *Tanacetum microphyllum*. *Planta Med.* 60: 228-231.

Abdelghaffar H., Vazifeh D., Labro M.T. (1997) Erythromycin A-derived macrolides modify the functional activities of human neutrophils by altering the phospholipase D-phosphatidate phosphohydrolase transduction pathway. *J Immunol.* 159: 3995-4005.

Abo A., Pick E., Hall A., Totty N., Teahan C.G., Segal A.W. (1991) Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature.* 353: 668-670.

Alexander R. R. & Griffiths. L. M. Basic Methods in Biochemistry. New York: Wiley-Liss. 2 ed., 1992.

Andrews P.C., Babior B.M. (1984) Phosphorylation of cytosolic proteins by resting and activated human neutrophils. *Blood.* 64: 883-890.

Araújo M.L., Cruvinel Isaac N.M.A., Gottlieb O.R., Lima O.A.O., Mourão J.C., Taveira J. Estudo químico de *Lychnophora ericóides*. *Ciênc Cult.* 27 (s): 177, 1995.

Babior B.M. (1984) The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest.* 73: 599-601.

Babior B.M. (1986) The respiratory burst oxidase of human neutrophils. Further studies of the purified enzyme. *J Biol Chem.* 261: 13247-13251.

Babior B.M., Kuver R., Curnutte J.T. (1988) Kinetics of activation of the respiratory burst oxidase in a fully soluble system from human neutrophils. *J Biol Chem.* 263: 1713-1718.

Babior B.M. (1992) The respiratory burst oxidase. *Adv Enzymol.* 65: 49-95.

Babior B.M. (1999) NADPH oxidase: an update. *Blood.* 93: 1464-1476.

Babior B.M. (2000) Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med.* 109: 33-44.

Babior B.M., Lambeth J.D., Nauseef W. (2002) The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys.* 397: 342-344.

Babior B.M., Takeuchi C., Ruedi J., Gutierrez A., Wentworth Jr. P. (2003) Investigating antibody-catalysed ozone generation by human neutrophils. *PNAS.* 100: 3031-3034.

Babior B.M. (2004) NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol.* 16: 42-47.

- Badwey J.A., Karnovsky M.L. (1980) Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Ann Rev Biochem.* 49: 695-726.
- Badwey J.A., Heyworth P.G., Karnovsky M.L. (1989) Phosphorylation of both 47 and 49 kDa proteins accompanies superoxide release by neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun.* 158: 1029-1035.
- Baehner R.L., Kunkel L.M., Monaco A.P., Haines J.L., Conneally P.M., Palmer C., Heerema N., Orkin S.H. (1986) DNA linkage analysis of X chromosome-linked chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci.* 83: 3398-3401.
- Balandrin M.F., Klocke J.A., Wurtele E.S., Bollinger W.H. (1985) Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science.* 228: 1154-1160.
- Becker E.L. (1983) Chemotactic factors of inflammation. *Trends Pharm Sci.* 4: 223-225.
- Bell R., Burns D. (1991) Lipid activation of protein kinase C. *J Biol Chem.* 266: 4661-4664.
- Berkow R.L., Dodson R.W., Kraft A.S. (1989) Human neutrophils contain distinct cytosolic and particulate tyrosine kinase activities: possible role in neutrophil activation. *Biochim Biophys Acta.* 997: 292-301.
- Berkow R.L., Dodson R.W. (1990) Tyrosine-specific protein phosphorylation during activation of human neutrophils. *Blood.* 75: 2445-2452.
- Berlett B.S., Stadtman E.R. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 272: 19633-19636.
- Bertoni B.W., Pereira A.M.S., Amarante M.F.F., Lopes, N.P., Santos P.A., França S.C. (2000) Micropropagação de *Lychnophora ericoides*: uma planta medicinal com atividade analgésica e tripanocida. In XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Recife, Livro de Resumos AG 023.
- Bhattacharjee S., Pennathur S., Byun J., Crowley J., Mueller D., Gischler J., Hotchkiss R.S., Heinecke J.W. (2001) NADPH oxidase of neutrophils elevates o,o'-dityrosine cross-links in proteins and urine during inflammation. *Arch Biochem Biophys.* 359: 69-77.
- Borella J.C., Lopes J.L.C., Vichnewski W., Cunha W.R., Herz W. (1998) Sesquiterpene lactone, triterpenes and flavones from *Lychnophora ericoides* and *Lychnophora pseudovillosissima*. *Biochem Sys Ecol.* 26: 671-676.
- Borregaard N., Tauber A.I. (1984) Subcellular localization of the human neutrophil NADPH oxidase. *J Biol Chem.* 259: 47-52.
- Borsato M.L.C., Graef C.F.F., Souza G.E.P., Lopes N.P. (2000) Analgesic

activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. *Phytochem.* 55: 809-813.

Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteins-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.

Brawn M.K., Chiou W.J., Leach K.L. (1995) Oxidant-induced activation of protein kinase C in UC11MG cells. *Free Rad Res.* 22: 23-37.

Brigagão M.R.P.L., Colepicolo P. (1996) Oscillations in superoxide anion release by polymorphonuclear leukocytes and its inhibition by human saliva. *Biol Rhythm Res.* 27(3): 269-280.

Brigagão M.R.P.L., Colepicolo P. (1998) Activation of neutrophils is daily inhibited by saliva. *Biol Rhythm Res.* 29: 598-605.

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

Briskin D.P. (2000) Medical plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiol.* 124: 507-514.

Burg N.D., Pillinger M.H. (2001) The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol.* 99: 7-17.

Burnett D., Adams D.H., Martin T.J.M., Liu Q., Grant R.A., Stocley R.A., Lord J.M. (1994) Inhibition by FK506 of formyl peptide-induced neutrophil activation and associated protein synthesis. *Biochem Pharmacol.* 48: 1081-1088.

Cabral A.C.S., Lopes N.P., Lopes J.L.C. (2000) Terpenóides do tronco de *Lychnophora ericoides* Mart. *In XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil.* Recife, Livro de Resumos QU 041.

Cadenas E. (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem.* 58: 79-110.

Camarero V.C.P.C., Junqueira V.B., Colepícolo P., Karnovsky M.L., Mariano M. (1990) Epithelioid macrophages secrete a deactivating factor for superoxide release. *J Cel Physiol.* 145: 481-487.

Carr A.C., Winterbourn C.C. (1997) Oxidation of neutrophil glutathione and protein thiols by mieloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Biochem J.* 327: 275-281.

Carreras M.C., Riobó N.A., Pargament G.A., Boveris A., Poderoso J.J. (1997) Effects of respiratory burst inhibitors on nitric oxide production by human neutrophils. *Free Rad Res.* 26: 325-334.

- Casey P.J., Gilman A.G. (1988) G protein involvement in receptor-effector coupling. *J Biol Chem.* 263: 2577-22580.
- Casini A., Giorli M., Hyland R.J., Serroni A., Gilford D., Farber J.L. (1982) Mechanisms of cell injury in the killing of cultured hepatocytes by bromobenzene. *J Biol Chem.* 257: 6721-6728.
- Casini A.F., Pompella A., Comporti M. (1985) Liver glutathione depletion induced by bromobenzene, iodobenzene and diethylmaleate poisoning and its relation to lipid peroxidation and necrosis. *Am J Pathol.* 118: 225-237.
- Castro V., Rüngeler P., Murillo R., Hernandez E., Mora G., Pahl H.L., Merfort I. (2000) Study of sesquiterpene lactones from *Milleria quinqueflora* on their anti-inflammatory activity using the transcription factor NF- κ B as molecular target. *Phytochem.* 53: 257-263.
- Cazaubon S., Webster C., Camoin L., Stroberg A.D., Parker P.J. (1990) Effector dependent conformation-changes in protein kinase C γ epitope mapping with inhibitory monoclonal antibodies. *Eur J Biochem.* 194: 799-804.
- Cerqueira M.B.S., Souza J.T., Amado Júnior R., Peixoto A.B.F. (1987) Ação analgésica do extrato bruto aquoso liofilizado do caule e folhas da *Lychnophora ericoides* Mart (arnica). *Ciênc Cult.* 39: 551-553.
- Ceruti P. (1985) Prooxidant state and tumor promotion. *Science.* 227: 375.
- Chai Y.C., Ashraf S.S., Rokutan K., Johnston Jr R.B., Thomas J.A. (1994a) S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch Biochem Biophys.* 310(1): 273-281.
- Chai Y.C., Hendrich S., Thomas J.A. (1994b) Protein S-thiolation in hepatocytes stimulated by t-butyl hydroperoxide, menadione, and neutrophils. *Arch Biochem Biophys.* 310: 264-272.
- Chai Y.C., Jung C.H., Lii C.K., Ashraf S.S., Hendrich B., Wolf B., Sies H., Thomas J.A. (1999) Identification of an abundant S-thiolated rat liver protein as carbonic anhydrase III; characterization of S-thiolation and dethiolation reactions. *Arch Biochem Biophys.* 284: 270-278.
- Chan S.S., Monteiro H.P., Deucher G.P., Abud R.L., Abuchalla D., Junqueira V.B.C. (1998) Functional activity of blood polymorphonuclear leukocytes as an oxidative stress biomarker in human subjects. *Free Rad Biol Med.* 24: 1411-1418.
- Chan S.S., Monteiro H.P., Schindler F., Stern A., Junqueira V.B. (2001) Alpha-tocopherol modulates tyrosine phosphorylation in human neutrophils by inhibition of protein kinase C activity and activation of tyrosine phosphatases. *Free Radic Res.* 35: 843-856.

- Cheung K., Archibald A.C., Robinson M.F., (1983) The origin of chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by opsonized zymosan, *J Immunol.* 130: 2324-2329.
- Cho J.Y., Park J., Yoo E.S., Baik K.U., Park M.H. (1998) Inhibitory effect of sesquiterpene lactones from *Saussurea lappa* on tumor necrosis factor- α production in murine macrophage-like cell. *Planta Med.* 64: 594-597.
- Cho J.Y., Baik K.U., Jung J.H., Park M.H. (2000) In vitro anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone from *Saussurea lappa*. *Eur J Pharmacol.* 398: 399-407.
- Claiborne A., Yeh J.I., Mallett T.C., Luba J., Crane III E.J., Charrier V., Parsonage D. (1999) Protein-sulfenic acids: diverse roles from an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation. *Biochem.* 23: 270-296.
- Cohen H.J., Chovaniec M.E. (1978a) Superoxide generation by digitonin-stimulated guinea pig granulocyte. A basis for continuous assay for monitoring superoxide production for the study of the activation of the generation system. *J Clin Invest.* 61: 1081-1087.
- Cohen H.J.; Chovaniec M. (1978b) Superoxide production by digitonin-stimulated guinea-pig granulocytes. The effect of NEM, divalent cations and glycolytic and mitochondrial inhibitors on the activation of the superoxide generating system. *J Clin Invest.* 61:1088-1096.
- Cohen P. (1992) Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. *TIBS.* 17: 408-413.
- Comporti M. (1989) Three models of free radical-induced cell injury. *Chem Biol Interact.* 72: 1-56.
- Costa P., Pilli R., Pinheiro S., Vasconcelos M. Série Química Orgânica: Substâncias Carboniladas e Derivados. Porto Alegre: Artmed Editora S.A. 2003.
- Cotgreave I.A., Gerdes R.G. (1998) Recent trends in glutathione biochemistry: glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation ?. *Biochem Biophys Res Commun.* 242: 1-9.
- Cross A.R. (1990) Inhibitors of the leukocyte superoxide generating oxidase. Mechanisms of action and methods for their elucidation. *Free Rad Biol Med.* 8: 71-93.
- Curnutte J.T., Babior B.M., Karnovsky M.L. (1979) Fluoride-mediated activation of the respiratory burst in human neutrophil. *J Clin Invest.* 63: 637-647.
- Dalle-Done I., Giustarini D., Rossi R., Colombo R., Milzani A. (2003) Reversible S-glutathionylation of Cys³⁷⁴ regulated actin filament formation by inducing structural changes in the actin molecule. *Free Rad Biol Med.* 34: 23-32.

Damre A.A., Damre A.S., Saraf M.N. (2003) Evaluation of sesquiterpene lactone fraction of *Saussurea lappa* on transudative, exudative and proliferative phases of inflammation. *Phytoter Res.* 17: 722-725.

David H.B. Células inflamatórias: estrutura e função *In: Imunologia Básica.* Stites D.P., Terr A.I. (ed) Rio de Janeiro: Prentice-Hall do Brasil. 1992.

De Coursey T.E., Morgan D., Cherny V.V. (2003) The voltage dependence of NADPH oxidase reveals why phagocytes need proton channels. *Nature.* 422: 531-534.

De Leo F.R., Quinn M.T. (1996) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leucoc Biol.* 60: 677-691.

Dekaris I., Marotti T., Sprong R.C., Van Oirschot J.F., Van Asbeck B.S. (1998) Hydrogen peroxide modulation of the superoxide anion production by stimulated neutrophils. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 20: 103-117.

Demasi M., Shringarpure R., Davies K.J.A. (2001) Glutathiolation of the proteasome is enhanced by proteolytic inhibitors. *Arch Biochem Biophys.* 389: 254-263.

De Pierre J.W., Karnovsky M.L. (1974) Ectoenzymes of guinea pig polymorphonuclear leukocyte. *J Biol Chem.* 249: 7111-7120.

Di Mascio P., Holtnagel H.C., Sperança M., Colepicolo P. (1995) Diurnal rhythm of β -carotene in photosynthetic alga *Gonyaulax polyedra*. *Biol Chem Hoppe-Seyler.* 376: 297-301.

Diekmann D., Abo A., Johnston C., Segal A.W., Hall A. (1994) Interaction of Rac with p67^{phox} and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science.* 265: 531-533.

Dinauer M.C., Orkin S.H., Brown R., Jesaitis A.J., Parkos C.A. (1987) The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex. *Nature.* 327: 717-720.

Downey G.P., Butler J.R., Brumell J., Borregaard N., Kjeldsen L., Sue-A-Quant A.K., Grinstein S. (1996) Chemotactic peptide-induced activation of MEK-2, the predominant isoform in human neutrophils. *J Biol Chem.* 270: 21005-21011.

Dutil E.R., Keranen L.M., Depaoli-Roach A.A., Newton A.C. (1994) In vivo regulation of protein kinase C by trans-phosphorylation followed by autophosphorylation. *J Biol Chem.* 269: 29359-29362.

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

- Eaton P., Fuller W., Shattock M.J. (2000) S-thiolation of HSP27 regulates its multimeric aggregate size independently of phosphorylation. *J Biol Chem.* 277: 21189-21196.
- Eaton P., Byers H.L., Leeds N., Ward M.A., Schattock M.J. (2002) Detection, quantitation, purification, and identification of cardiac proteins S-thiolated during ischemia and reperfusion. *J Biol Chem.* 277: 9806-9811.
- Edwards S.W., Holden C.S., Humpreys J.M., Hart C.A. (1989) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) primes the respiratory burst and stimulates protein biosynthesis in human neutrophils. *FEBS Letters.* 256: 62-66.
- Figueiredo-Pereira M.E., Yakushin S., Cohen G. (1998) Disruption of the intracellular sulfhydryl homeostasis by cadmium-induced oxidative stress leads to protein thiolation and ubiquitination in neuronal cells. *J Biol Chem.* 273: 12703-12709.
- Filomeni G., Rotilio G., Ciriolo M.R. (2002) Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochem Pharmacol.* 64: 1957-1064.
- Flausino D., Sakamoto H.T., Pereira A.M.S., Lopes N.P. (2000) Constituintes químicos da superfície foliar de *Lychnophora ericoides*. In 23ª. Reunião Anual da SBQ. Poços de Caldas. Livro de Resumos PN 105.
- Flint A.J., Paladini R.D., Koshland D.E. (1990) Autophosphorylation of protein kinase C at three separated regions of its primary sequence. *Science.* 24: 408-411.
- Fontayne A., Dang P.M.C., Gougerot-Pocidalo M.A., El Benna J. (2002) Phosphorylation of p47^{phox} sites by PKC α , β II, δ , and ζ : effect on binding to p22^{phox} and on NADPH oxidase activation. *Biochem.* 41: 7743-7757.
- Fujii H., Ichimori K., Hoshiai K., Nakazawa H. (1997) Nitric oxide inactivates NADPH oxidase in pig neutrophils by inhibiting its assembling process. *J Biol Chem.* 272(52): 32773-32778.
- Garret R.H., Grisham C.M. Molecular Aspects of Cell Biology. New York: Saunders College Publishing, 1995.
- Gay J.C., Raddassi K., Truet III A.P., Murray J.J. (1997) Phosphatase activity regulates superoxide anion generation and intracellular signaling in human neutrophils. *Biochim Biophys Acta.* 1336: 243-253.
- Ghosh S., May M.J., Kopp E.B. (1998) NF- κ B and rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 16: 225-260.
- Giannini C., Debitus C., Lucas R., Ubeda A., Payá M., Hooper N.A.J., D'Auria M.V. (2001) New sesquiterpene derivatives from the sponge *Dysidea* species with a selective inhibitor profile against human phospholipase A₂ and other

leukocyte functions. *J Nat Prod.* 64: 612-615.

Glette J., Sandberg S., Hopen G., Solberg C.O. (1984) Influence of tetracyclines on human polymorphonuclear leukocyte function. *Antimicrob Ag Chemother.* 25: 354-357.

Gobbo Neto L., Santos M.D., Lopes J.L.C., Lopes N.P. (2002) Flavonóides de *Lychnophora ericoides*. In 25^a. Reunião Anual da SBQ. Poços de Caldas, Livro de Resumos PN 053.

Gómez-Cambronero J., Huang C.K., Bonak V.A., Wang E., Casneille J.E., Shiraishi T. Sha'fi R.I. (1989) Tyrosine phosphorylation in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun.* 53: 1478-1485.

Gopalakrishna R., Anderson W.B. (1987) Susceptibility of protein kinase C to oxidative inactivation: loss of both phosphotranferase activity and phorbol diester binding. *FEBS Lett.* 225: 233-237.

Gopalakrishna R., Anderson W.B. (1989) Ca²⁺- and phospholipids-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86: 6758-6762.

Gopalakrishna R., Chen Z.H., Gundimeda U. (1993) Nitric oxide and nitric oxide-generating agents induce a reversible inactivation of protein kinase C activity and phorbol Ester binding. *J Biol Chem.* 268: 27180-27185.

Gopalakrhisna R., Gundimeda U., Chen Z. (1997) Cancer preventive selenocompounds induce a specific redox modification of cysteine-rich regions in calcium-dependent isoenzymes of protein kinase C. *Arch Biochem Biophys.* 348: 25-36.

Gopalakrishna R., Jaken S. (2000) Protein kinase C signalling and oxidative stress. *Free Rad Biol Med.* 28: 1349-1361.

Gordon B.B. Mass spectrometric techniques. In Wilson K. & Walker J. (ed). Principles and Techniques of Practical Biochemistry. Cambridge: University Press. 5 ed., 2001.

Gottlieb O.R., Kaplan M.A.C., Borin M.R.M.B. Biodiversidade – Um enfoque químico e biológico. Rio de Janeiro: Editora da UFRJ, 1996.

Griffith O.W. (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem.* 106: 207-212.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. New York: Oxford University Press. 3 ed., 1999.

Hamburger M., Hostettmann K. (1991) Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochem.* 30: 3864-3874.

- Hampton M.B.; Kettle A.J., Winterbourn C.C. (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*. 92: 3007-3017.
- Harborne J.B. (1989) Recent advances in chemical ecology. *Nat Prod Rep*. 6: 85-109.
- Hatanaka E., Ribeiro F.P., Campa A. (2003) The acute phase serum amyloid A primes neutrophils. *Immunol Med Microbiol*. 38: 81-84.
- Hatori H. (1961) Studies in the labile, stable NADPH oxidase, and peroxidase staining reactions in the isolated particles of horses granulocyte. *Nagoya J Med Sci*. 23: 362-378.
- Hayes J.D., McLellan L.I. (1999) Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Rad Res*. 31: 273-300.
- Heilmann J., Wasescha M.R., Schmidt T.J. (2001) The influence of glutathione and cysteine levels on the cytotoxicity of helenanolide type sesquiterpene lactones against KB cells. *Bioorg Med Chem*. 9: 2189-2194.
- Heyworth P.G., Karnovsky M.L., Badwey J.A. (1989) Protein phosphorylation associated with synergistic stimulation of neutrophils. *J Biol Chem*. 264: 14935-14939.
- Heyworth P.G., Badwey J.A. (1990) Protein phosphorylation associated with the stimulation of neutrophils. Modulation of superoxide production by protein kinase C and calcium. *J Bioenerg Biomem*. 22: 1-26.
- Huang C.K., Laramée G.F., Casnillie J.E. (1988) Chemotactic factor induced tyrosine phosphorylation of membrane associated proteins in rabbit peritoneal neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*. 151: 794-801.
- Huang K.P., Huang F.L. (2002) Glutathionylation of proteins by glutathione disulfide S-oxide. *Biochem Pharmacol*. 64: 1049-1056.
- Hug H., Sarre T.F. (1993) Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction. *Biochem J*. 291: 329-343.
- Hurst N.P., French J.K., Bell A.L., Nuki G., O'Donnell M.L., Betts W.H., Cleland L.G. (1986) Differential effects of mepacrine, chloroquine and hydroxychloroquine on superoxide anion generation, phospholipids methylation and arachidonic acid release by human blood monocytes. *Biochem Pharmacol*. 35: 3083-3089.
- Isogai Y., Shiro Y., Nasuda-Kouyama A., Iisuka T. (1991) Superoxide production by cytochrome b558 purified from neutrophils in a reconstituted system with an exogenous reductase. *J Biol Chem*. 266: 13481-13484.

- Janiszewski M., Pedro M.A., Scheffer R.C., Van Asseldonk J.T.H., Souza L.C., Luz P.L., Augusto O., Laurindo F.R.M. (2000) Inhibition of vascular NADH/NADPH oxidase activity by thiol reagents: lack of correlation with cellular glutathione redox status. *Free Rad Biol Med*. 29: 889-899.
- Jesaitis A.J., Quinn M.T., Mukherjee G., Ward P.A., Dratz E.A. *In: The Molecular Basis of Oxidative Damage by Leukocytes*. Jesaitis A.J., Dratz E.A. (ed) Montana: Big Sky, 1991.
- Jodynys-Liebert J., Murias M., Bloszyk E. (1999) Effect of several sesquiterpene lactones on lipid peroxidation and glutathione level. *Plant Med*. 65: 320-324.
- Johansson S., Göransson U., Luijendijk T., Backlund A., Claeson P., Bohlin L. (2002) A neutrophil multitarget functional bioassay to detect anti-inflammatory natural products. *J Nat Prod*. 65: 32-41.
- Joly A.B. Botânica – Introdução à Taxonomia Vegetal. São Paulo: Companhia Editora Nacional. 7 ed., 1985.
- Kent J.D., Sergeant S., Burns D.J., McPhail L.C. (1996) Identification and regulation of protein kinase C- δ in human neutrophils. *J Immunol*. 157: 4641-4647.
- Khan A.U., Wilson T. (1995) Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chem Biol*. 2: 437-445.
- Kilpatrick L.E., McCawley L., Nachiappan V., Greer W., Majumdar S., Korchak H.M., Douglas S.D. (1992) Alpha-1-antichymotrypsin inhibits the NADPH oxidase-enzyme complex in phorbol ester-stimulated neutrophil membranes. *J Immunol*. 149: 3059-3065.
- Kilpatrick L.E., Kabakovics E., McCawley L., Kane L.H., Korchak H.M. (1995) Cromolyn inhibits assembly of the NADPH oxidase and superoxide anion generation by human neutrophils. *J Immunol*. 154: 3429-3436.
- Klatt P., Pineda Molina E., Lacoba M.G., Padilla C.A., Martinez Galisteo E., Bárcena J.A., Lamas S. (1999) Redox regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathionylation. *FASEB J*. 13: 1481-1490.
- Klatt P., Lamas S. (2000) Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem*. 267: 4928-4944.
- Kleinman W.A., Komninou D., leutzinger Y., Colosino S., Cox J., Lang C.A., Richie Jr. J.P. (2003) Protein glutathiolation in human blood. *Biochem Pharmacol*. 65: 741-746.
- Ko H.J., Weng J.R., Tsao L.T., Yen M.H., Wang J.P., Lin C.N. (2004) Anti-inflammatory flavonoids and pterocarpanoid from *Crotalaria pallida* and *C. assamica*. *Bioorg Med Chem Lett*. 14: 1011-1014.

- Kobayashi T., Robinson J.M., Seguchi H. (1998) Identification of intracellular sites of superoxide production in stimulated neutrophils. *J Cell Sci.* 111: 81-91.
- Kutchan T.M (2001) Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiol.* 125: 58-60.
- Kwok B.H.B., Koh B., Ndubuisi M.I., Elofsson M., Crews C.M. (2001) The anti-inflammatory natural product pathenolide from the medicinal herb feverfew directly binds to and inhibits I κ B kinase. *Chem Biol.* 8: 759-766.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Landino L.M., Moynihan K.L., Todd J.V., Kennett K.L. (2004) Modulation of the redox state of tubulin by the glutathione/glutaredoxin reductase system. *Biochem Biophys Res Commun.* 314: 555-560.
- Lärfars G., Gyllenhammar H. (1998) Stimulus-dependent transduction mechanisms for nitric oxide release in human polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J Lab Clin Med.* 132: 54-60.
- Laudanna C., Campbell J.J., Butcher E.C. (1996) Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. *Science.* 271: 981-983.
- Leite M.N., Del Vecchio G. (2000) Contribuição para o estudo farmacognóstico da *Lychnophora ericoides*. In XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Recife, Livro de Resumos FG 070.
- Leto T.L., Lomax K.J., Volpp B.D., Nunoi H., Sechler J.M., Nauseef W.M., Clarck R.A., Gallin J.I., Malech H.L. (1990) Cloning of a 67-kDa neutrophil oxidase factor with similarity to a noncatalytic region of p60c-src. *Science.* 248: 727-730.
- Leusen J.H.W., Verhoeven A.J., Roos D. (1996) Interactions between the components of the human NADPH oxidase: a review about the intrigues in the PHOX family. *Front Biosci.* 1: 72-90.
- Lind C., Gerdes R., Schuppe-Koistinen I., Cotgreave I.A. (1998) Studies on the mechanism of oxidative modification of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by glutathione: catalysis by glutaredoxin. *Biochem Biophys Res Commun.* 247: 481-486.
- Lomax K.J., Leto T.L., Nunoi H., Gallin J.I., Malech H.L. (1989) Recombinant 47-kilodalton cytosol factor restores NADPH oxidase in chronic granulomatous disease. *Science.* 245: 409-412.
- Lopes L.R., Dagher M.C., Gutierrez A., Young B., Bouin A.P., Fuchs A., Babior B.M. (2004) Phosphorylated p40^{PHOX} as a negative regulator of NADPH oxidase. *Biochem.* 43: 3723-3730.

- Lu H.W., Sugahara K., Sagara Y., Masuoka N., Asaka Y., Manabe M., Kodama H. (2001) Effect of three flavonoids, 5,7,3',4'-tetrahydroxy-methoxy flavone, luteolin, and quercetin, on the stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation of proteins in human neutrophil. *Arch Biochem Biophys.* 393: 73-77.
- LyB G., Knorre A., Schmidt T.J., Pahl H.L., Merfort I. (1998) The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF- κ B by directly targeting p65. *J Biol Chem.* 273: 33508-33516.
- Majumdar S., Rossi M.W., Fujiki T., Phillips W.A., Disa S., Queen C.F., Johnston R.B., Rosen O.M., Corkey B.E., Korchak H.M. (1991) Protein kinase C isotypes and signaling in neutrophils. *J Biol Chem.* 266: 9285-9294.
- Maridonneau-Parini I., Tringale S.M., Tauber A.I. (1986) Identification of distinct activation pathways of the human neutrophil NADPH-oxidase. *J Immunol.* 137: 2925-2929.
- Matsuda H., Kagerura T., Toguchida I., Ueda H., Morikawa T., Yoshikawa M. (2000) Inhibitory effects of sesquiterpene from bay leaf on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages: structure requirement and role of heat shock protein induction. *Life Sci.* 66: 2151-2157.
- Matsuda H., Toguchida I., Ninomyia K., Kageura T., Morikawa T., Yoshikawa M. (2003) Effects of sesquiterpenes and amino acid-sesquiterpene conjugates from the roots of *Saussurea lappa* on inducible nitric oxide synthase and heat shock protein in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Bioorg Med Chem.* 11: 709-715.
- Matsusaka T., Fujikawa K., Nishio Y., Mukaida N., Matsushima K., Kishimoto T., Akira S. (1993) Transcription factors NF- κ B and NF-IL6 synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90: 10193-10197.
- Mawatari S., Murakami K. (2004) Different types of glutathionylation of hemoglobin can exist in intact erythrocytes. *Arch Biochem Biophys.* 421: 108-114.
- Mazor R.L., Menendez I.Y., Ryan M.A., Fiedler M.A., Wong R.W. (2000) Sesquiterpene lactones are potent inhibitors of interleukin 8 gene expression in cultured human respiratory epithelium. *Cytokine.* 12: 239-245.
- McColls R., Paquin R., Beaulieu A.D. (1990) Selective synthesis and secretion of a 23kDa protein by neutrophils following stimulation with granulocyte-macrophages colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. *Biochem Biophys Res Commun.* 172: 1209-1216.
- McCord J.M., Fridovich I. (1968) The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem.* 243: 5753-5760.

- McLafferty F.M., Turecek F. *In: Interpretation of Mass Spectra*. Mill Valley: University Science Books. 1993.
- Mello-Filho A.C., Meneguini R. (1985) Protection of mammalian cells by ophenanthroline from lethal and DNA-damaging effects produced by oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun*. 172: 1209-1216.
- Meng Z., Zhou Y., Lu J., Sugahara K., Xu S., Kodama H. (2001) Effect of five flavonoid compounds isolated from *Quercus dentata* Thunb on superoxide generation in human neutrophils and phosphorylation of neutrophil proteins. *Clin Chim Acta*. 306: 97-102.
- Meshulam T., Diamond R.D., Lyman C.A., Wysong D.R., Melnick D.A. (1988) Temporal association of calcium mobilization, inositol triphosphate generation, and superoxide anion release by human neutrophils by serum opsonized and nonopsonized particulate stimuli. *Biochem Biophys Res Commun*. 150: 532-539.
- Millward T.A., Zolnierowicz S., Hemmings B.A. (1999) Regulation of protein kinase cascates by protein phosphatases 2A. *TIBS*. 24: 186-191.
- Mitchell A.E., Zheng J., Hammock B.D., Lo Bello M., Jones D. (1998) Structural and functional consequences of haloenol lactone inactivation of murine and human glutathione S-transferase. *Biochem*. 37: 6752-6759.
- Mizel S.B., Jaret P. *Self Defense*. San Diego: Harcourt Brace Jovanovich, 1985.
- Moerman D.E. (1996) An analysis of the food plants and drug plants of native North America. *J Ethnopharmacol*. 52: 1-22.
- Mohr S., Hallak H., De Boitte A., Lapetina E.G., Brüne B. (1999) Nitric oxide-induced S-glutathionylation and inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem*. 274: 9427-9430.
- Moraes M.C.B., Lago C.L. (2003) Espectrometria de massas com ionização por "electrospray" aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. *Quim Nova*. 26: 556-563.
- Morel F., Doussiere J., Vignais P.V. (1991) The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. *Eur J Biochem*. 201: 523-546.
- Moridani M.Y., Pourahmad J., Bui H., Siraki A., O'Brien P.J. (2003) Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Rad Biol Med*. 34: 243-253.
- Mukanganyama S., Naik Y.S., Widersten M., Mannervik B., Hasler J.A. (2001) Proposed reductive metabolism of artemisinin by glutathione transferases *in vitro*. *Free Rad Res*. 35: 427-434.

- Muscat J.E., Kleinman W., Colosimo S., Muir A., Lazzarus P., park J., Richie Jr. J.P.(2004) Enhanced protein glutathiolation and oxidative stress in cigarette smokers. *Free Rad Biol Med.* 36: 464-470.
- Myers N., Mittermeier R.A.,Fonseca G.A.B., Kent J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature.* 403: 853-858.
- Nakagawa Y., Moldéus P., Cotgreave I.A. (1992) The S-thiolation of hepatocellular protein thiols during diquat metabolism. *Biochem Pharmacol.* 43: 2519-2525.
- Newburger P.E., Chovaniec M.E., Cohen H.J. (1980) Activity and activation of the granulocyte superoxide-generating system. *Blood.* 55(1): 85-92.
- Newton A. (1995) Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem.* 270: 28495-28498.
- Niedel J.E., Kuhn L.J., Vanderbark G.R. (1983) Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80: 36-38.
- Núñez C.V., Zacheu F.M., Pinto E., Roque N.F., Colepicolo P., Brigagão M.R.P.L. (2003) Sesquiterpene lactone from *Wunderlichia crulsiana* inhibits the respiratory burst of leukocytes triggered by distinct biochemical pathways. *Life Sci.* 73: 2161-2169.
- Ogino T., Packer L., Maguire J.J. (1997) Neutrophil antioxidant capacity during the respiratory burst: loss of glutathione induced by chloramines. *Free Rad Biol Med.* 23: 445-452.
- Oliveira A.B., Saúde D.A., Perry K.S.P., Duarte D.S., Raslan D.S., Boaventura M.A.D., Chiari E. (1996) Trypanocidal sesquiterpenes from *Lychnophora* species. *Phytother Res.* 10: 292-295.
- Ostrakhovitch E.A., Afanasev I.B. (2001) Oxidative stress in rheumatoid arthritis: suppression by rutin and other antioxidants and chelators. *Biochem Pharmacol.* 62(6): 743-746.
- Paolicchi A., Dominici S., Pieri L.,Maellaro E., Pompella A. (2002) Glutathione catabolism as a signaling mechanism. *Biochem Pharmacol.* 64: 1927-1035.
- Padgett C.M., Whorton A.R. (1998) Cellular responses to nitric oxide ;role of protein S-thiolation/dethiolation. *Arch Biochem Biophys.* 358: 232-242.
- Parkos C.A., Allen R.A., Cochrane C.G., Jesaitis A.J. (1987) Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22,000. *J Clin Invest.* 80:732-748.
- Parkos C.A., Dinauer M.C., Walker L.E., Allen R.A., Jesaitis A.J., Orkin S.H. (1988) Primary structure, and unique expression of the 22-kilodalton light chain

of human neutrophil cytochrome b. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85: 3319-3323.

Paron M.E., Machado J.O., Lopes N.P. (2002) Associação micorrízica em *Lychnophora ericoides* Mart (arnica-da-serra). In XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Cuiabá, CD-ROM de Resumos AG055.

Pastor P.G., De Rosa S., De Giulio A., Oayá M., Alcaraz M.J. (1999) Modulation of acute and chronic inflammatory processes by cacospongionolide B, a novel inhibitor of human synovial phospholipase A₂. *Brit J Pharmacol*. 126: 301-311.

Pérez-García F., Marin E., Cañigüeral S., Adzet T. (1996) Anti-inflammatory action of *Pluchea sagitalis*: involvement of an antioxidant mechanism. *Life Sci*. 59: 2033-2040.

Picman A.K. (1986) Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochem Syst Ecol*. 14: 255-281.

Pompella A., Visvikis A., Paolicchi A., De Tata V., Casini A.F. (2003) The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol*. 66: 1499-1503.

Pontremoli S., Melloni E., Salamino F., Sparatore B., Michetti M., Sacco O., Horecker B.L. (1986) Phosphorylation of proteins in human neutrophils activated with phorbol myristate acetate or with chemotactic factor. *Arch Biochem Biophys*. 250: 23-29.

Pontremoli S., Salamino F., Sparatore B., De Tullio R., Patrone M., Tizianelo A., Melloni E. (1989) Enhanced activation of the respiratory burst oxidase in neutrophils from hypertensive patients. *Biochem Biophys Res Commun*. 158(3): 966-972.

Puertas A.P., Martins D.T.O. (2002) Levantamento etnobotânico de plantas medicinais conhecidas em Mato Grosso (MT) como arnica. In XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Cuiabá, CD-ROM de Resumos BO 083.

Rabadji R.C., Brigagão M.R.P.L., Camarero V.C.P.C., Colepicolo P. (1996) Oscillation of reactive oxygen species released by activated neutrophils. *Biol Rhythm Res*. 27: 269-280.

Raggi M.A., Mandrioli R., Casamenti G., Marini M. (1998) HPLC determination of glutathione and other thiols in human mononuclear blood cells. *Biomed Chromatogr*. 12: 262-266.

Ravichandran V., Seres T., Moriguchi T., Thomas J.A., Johnston Jr R.B. (1994) S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by the phagocytosis-associated respiratory burst in blood monocytes. *J Biol Chem*. 269(40): 25010-25015.

Recio M.C., Giner R.M., Uriburu L., Manez S., Cerda M., De la Fuente J.R.,

- Rios J.L. (2000) In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. *Life Sci.* 66: 2501-2518.
- Reeves E.M., Lu H., Jacobs H.L., Messina C.G.M., Bolsover S., Gabella G., Potma E.O., Warley A., Roes J., Segal A.W. (2002) Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K^+ flux. *Nature*. 416: 291-297.
- Rest R.F., Farrel C.F., Naidu F.L. (1988) Manose inhibits the human neutrophil oxidative burst. *J Leuk Biol.* 43: 158-164.
- Rodenas J., Mitjavila M.T., Carbonell T. (1998) Nitric oxide inhibits superoxide production by inflammatory polymorphonuclear leukocytes. *Am J Physiol.* 274: 827-830.
- Rodriguez E., West J.E. (1995) International research on biomedicines from the tropical rain forest. *Interciencia.* 20: 149-143.
- Rollet-Labelle E., Caon A., Roberge C.J., Liao N.W., Malawista S.E., McColl S.R., Naccache P.H. (1994) Tyrosine phosphorylation in activated human neutrophils: comparison of the effects of different classes of agonists and identification of the signaling pathways involved. *J Immunol.* 153: 3533-3563.
- Rollet-Labelle E., Grange M.J., Elbim C., Marquetty C., Gougerot-Pocidalo M.A., Pasquier C. (1998) Hydroxyl radical as a potential intracellular mediator of polymorphonuclear neutrophil apoptosis. *Free Rad Biol Med.* 24(4): 563-572.
- Roos D., Winterbourn C.C. (2002) Lethal weapons. *Science.* 296: 669-671.
- Rotrosen D., Leto T.L. (1990) Phosphorylation of neutrophil 47-kDa cytosolic oxidase factor. Translocation to membrane is associated with distinct phosphorylation events. *J Biol Chem.* 265: 19910-19915.
- Rotrosen D., Yeung C.L., Leto T.L., Malech H.L., Kwong C.H. (1992) Cytochrome b558: the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase. *Science.* 265: 1459-1462.
- Rüngeler P., Castro V., Mora G., Gören N., Vichnewski W., Pahl H.L., Merfort I., Schmidt T.J. (1999) Inhibition of transcription factor NF- κ B by sesquiterpene lactone: a proposed molecular mechanism of action. *Bioorg Med Chem.* 7: 2343-2352.
- Ryu J.H., Lee H.J., Jeong Y.S., Ryu S.Y., Han Y.N. (1998) Yomgin, an inhibitor of nitric oxide production in LPS-activated macrophages. *Arch Pharmacol Res.* 21: 481-484.
- Sakamoto H.T., Flausino D., Castellano E.E., Stark C.B.W., Gates P.J., Lopes N.P. (2003) Sesquiterpene lactones from *Lychnophora ericoides*. *J Nat Prod.* 66: 693-695.
- Salysers A.A.; Whitt D. Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach.

Washington: ASM Press, 1994.

Santos M.D., Gobbo Neto L., Pizza C., Lopes N.P. (2000) Estudo fitoquímico do extrato polar das raízes de *Lychnophora ericoides*. In XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Recife, Livro de Resumos FG 067.

Santos M.D., Gobbo Neto L., Lopes N.P. (2001) Constituintes polares da raiz da arnica brasileira. In 24ª. Reunião Anual da SBQ. Poços de Caldas, Livro de Resumos PN 142.

Sargentini S.R., Vichnewski W. (2000) Sonication and liquid chromatography as a rapid technique for extraction and fractionation of plant material. *Phytochem Anal.* 11: 69-73.

Sbarra A.J., Karnovsky M.L. (1959) The biochemical basis of phagocytosis. *J Biol Chem.* 234(6): 1355-1362.

Schell-Frederick E. (1974) Stimulation of the oxidative metabolism of polymorphonuclear leukocytes by the calcium ionophore A23187. *FEBS Lett.* 48: 37-40.

Schmidt R.J., Chung L.Y. (1993) Perturbation of glutathione status and generation of oxidative stress in mouse skin following application of contact allergenic sesquiterpene lactones and isothiocyanates. *Xenobiotica.* 23: 889-897.

Schmidt T.J. (1997) Helenanolide-type sesquiterpene lactones- III. Rates and stereochemistry in the reaction of helenalin and related helenanolides with sulfhydryl containing biomolecules. *Bioorg Med Chem.* 5: 645-653.

Schmidt T.J., LyB G., Pahl H.L., Merfort I. (1999) Helenanolide type sesquiterpene lactones. Part 5: The role of glutathione addition under physiological conditions. *Bioorg Med Chem.* 7: 2849-2855.

Schmidt T.J. (2000) Glutathione adducts of helenalin and 11 α ,13-dihydrohelenalin acetate inhibit glutathione S-transferase from horse liver. *Planta Med.* 66: 106-109.

Schuppe I., Moldéus P., Cotgreave I.A. (1992) Protein-specific S-thiolation in human endothelial cells during oxidative stress. *Biochem Pharmacol.* 44: 1757-1764.

Segal A.W., Abo A. (1993) The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *TIBS.* 18: 43-47.

Segal B.H., Leto T.L., Gallin J.I., Malech H.L., Holland S.M. (2000) Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine.* 79(3): 170-200.

Selloum L., Reichl S., Muller M., Sebihi L., Arnhold J. (2001) Effects of

flavonoids on the generation of superoxide anion radicals by xanthine oxidase and stimulated neutrophils. *Arch Biochem Biophys*. 395: 49-56.

Semir J. (1991) Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart (Vernonieae, Compositae). Tese de Doutorado, IB/UNICAMP, Campinas, 2 v.

Seres T., Knickelbien R.G., Warshaw J.B., Johnston Jr R.B. (2000) The phagocytosis-associated respiratory burst in human monocytes is associated with increased uptake of glutathione. *J Immunol*. 165: 3333-3340.

Shinagawa Y., Tanaka C., Teraoka A. (1966) A new cytochrome in neutrophilic granules of rabbit leukocyte. *J Biochem*. 59: 622-624.

Siedle B., Gustavsson L., Johansson S., Murillo R., Castro V., Bohlin L., Merfort I. (2003) The effect of sesquiterpene lactones on the release of human neutrophil elastase. *Biochem Pharmacol*. 7559:1-7.

Siems W. G., Capuozzo E., Verginelli D., Salerno C., Crifo C., Grune T. (1997) Inhibition of NADPH oxidase-mediated superoxide radical formation in PMA-stimulated human neutrophils by 4-hydroxynonenal- Binding to-SH and NH₂ groups. *Free Rad Res*. 27: 353-358.

Sies H. (1986) Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem Int Ed Engl*. 25: 1058-1071.

Sies H. (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Free Rad Biol Med*. 27: 916-921.

Silván A.M., Abad M.J., Bermejo P., Villar A. (1996) Inhibition by hydroxyachillin, sesquiterpene lactone from *Tanacetum micropphyllum*, of PMA-induced mouse ear oedema. *Inflamm Res*. 45: 289-292.

Simchovitz L., Mehta J., Spilberg I. (1979) Chemotatic factor induced generation of superoxide radicals by human neutrophils. Effect of metabolic inhibitors and anti-inflammatory drugs. *Arthritis Rheumatism*. 22: 755-763.

Sobota R., Szwed M., Kasza A., Bugno M., Kordula T. (2000) Parthenolide inhibits activation of signal transducers and activation of transcription (STATs) induced by cytokines of the IL-6 family. *Biochem Biophys Res Commun*. 267: 329-333.

Stamler J.S., Hueladen A. (1998) Oxidative modifications in nitrosative stress. *Nat Struct Biol*. 5: 247-249.

Stolarek R., Bialasiewicz P., Nowak D. (2002) N-aceylcysteine effect on the luminol-dependent chemiluminescence pattern of reactive oxygen species generation by human polymorphonuclear leukocytes. *Pulmonary Pharmacol Therap*. 15: 385-392.

Stringer R.E., Edwards S.W. (1995) Potentiation of the respiratory burst of

human neutrophils by cycloheximide: regulation of reactive oxidant production by a protein(s) with rapid turnover? *Inflamm Res.* 44: 158-163.

Strnad C.F., Parente J.E., Wong K. (1986) Use of fluoride ion as a probe for the guanine nucleotide-binding proteins involved in the phosphoinositide-dependent neutrophil transduction pathway. *FEBS Letter.* 206: 20-24.

Suzuki H., Pabst M.J., Johnston R.B. (1985) Enhancement by Ca^{2+} or Mg^{2+} of catalytic activity of the superoxide-producing NADPH oxidase in membrane fractions of human neutrophils and monocytes. *J Biol Chem.* 260: 3635-3639.

Takada A., Cohen S. Introduction: inflammatory mediators: an overview. *In: Chemical Mediators of Inflammation and Immunity.* Cohen S., Hayashi H., Saito K., Takada A. (ed) Tokyo: Academic Press, 1986.

Takemura O.S., Banno O., Nozawa Y. (1997) Inhibition of N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine-stimulated tyrosine phosphorylation and phospholipase D activation by quercetin in rabbit neutrophils. *Biochem Pharmacol.* 53: 1503-1510.

Tamura M., Kanno M., Kai T. (2001) Destabilization of neutrophils NADPH oxidase by ATP and other trinucleotides and its prevention by Mg^{2+} . *Biochim Biophys Acta.* 1510:270-277.

Taylor S.S., Radzio-Andzelm E. (1994) Three protein kinase structures define a common motif. *Structure.* 2: 345-352.

Thomas J.A., Chai Y.C., Jung C.H. (1994) Protein S-thiolation and dethiolation. *Methods Enzymol.* 233: 385-395.

Thomas J.A., Poland B., Honzatko R. (1995) Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. *Arch Biochem Biophys.* 319: 1-9.

Van Bladeren P.J. (1988) Formation of toxic metabolites from drugs and other xenobiotics by glutathione conjugation. *Trends Pharmacol Sci.* 9: 295-299.

Van Bruggen R., Anthony E., Borja M.F., Roos D. (2003) Continuous translocation of RAC2 and the NADPH oxidase component p67phox during phagocytosis. *J Biol Chem.* 278: 9097-9102.

Vieira R.F., Martins M.V.M. (2000) Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado: uma compilação de dados. *Rev Bras Pl Méd.* 3: 13-36.

Volpp B.D., Nauseef W.M., Donelson J.E., Moser D.R., Clarck R.A. (1989) Cloning of the cDNA and functional expression of the 47-kilodalton cytosolic component of human neutrophil respiratory burst. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86: 7195-7199.

Wagner H. (1977) Pharmaceutical and economic uses of the Compositae. *In: Heywood V.H., Harborne J.B., Turner B.L. (ed) The biology and chemistry of*

the Compositae. London: Academic Press Inc.

Wang J.P., Tsao L.T., Shen A.Y., Raung S.L., Chang L.C. (1999) 2-hidroxymethyl-1-naphthol diacetate (TAC) supresses the superoxide anion generation in rat neutrophils. *Free Rad Biol Med.* 26: 1010-1018.

Ward N.E., Stewart J.R., Ioannides C.G., O'Brian C.A. (2000) Oxidant-induced S-glutathiolation inactivates protein kinase C- α (PKC- α): a potential mechanism of PKC isozyme regulation. *Biochem.* 39: 10319-10329.

Wen J., You K.R., Lee S.Y., Song C.H., Kim D.G. (2002) Oxidative stress-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 277: 38954-38964.

White J.R., Huang C.K., Hill J.M., Naccache P.H., Becker E.L., Shaafi R.I. (1984) Effect of phorbol 12-myristate 13-acetate and its analogue 4 α -phorbol 12,13-didecanoate on protein phosphorylation and lysosomal enzyme release in rabbit neutrophils. *J Biol Chem.* 259: 8605-8611.

Whitin J.C., Chapman C.E., Simons E.R., Chovaniec M.E., Cohen H.J. (1980) Correlation between membrane potential changes and superoxide production in human granulocytes stimulated by phorbol myristate acetate. *J Biol Chem.* 255: 1874-1878.

Witko-Sarsat V., Rieu P., Descamps-Latscha B., Lesavre P., Halbwachs-Mecarelli L. (2000) Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest.* 80: 617-653.

Witz G., Lawrie J.N., Amoruso M.A., Goldstein B.D. (1987) Inhibition by reactive aldehydes of superoxide anion radical production from stimulated polymorphonuclear leukocytes and pulmonary alveolar macrophages. *Biochem Pharmacol.* 36: 721-726.

Yahyapour N., Eriksson C., Kjellstrand P., Wieslander A., Nygren H. (2001) Protection by glutathione of neutrophils against the toxic effects of peritoneal dialysis fluid. *Toxicol in vitro.* 15: 655-661.

Yu Y., Chadee K. (1998) Prostaglandin F₂ stimulates IL-8 gene expression in human colonic epithelium by a posttranscriptional mechanism. *J Immunol.* 161: 37464-3752.

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

Zhang B., Centra M., Cao G.L., Ratych R.E., Domachowske J.B., Malech H.L., Rosen G.M. (1997) Are free radicals responsible for endothelial cell killing of *Staphylococcus aureus*? *Immunol Lett.* 58: 113-120.

Zheng J., Mitchell A.E., Jones A.D., Hammock B.D. (1996) Haloenol lactone is a new isozyme-selective and active site-direct inactivator of glutathione S-transferase. *J Biol Chem.* 271: 20421-20425.