BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
19.332

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

16/01/02
19.332
0.112

***EFEITOS DO ALFA-TOCOFEROL NAS VIAS
DE SINALIZAÇÃO ASSOCIADAS AO "BURST"
OXIDATIVO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS***

SANDRA SUELI CHAN

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADORA

Prof^ª Dr^a VIRGÍNIA BERLANGA CAMPOS JUNQUEIRA

SÃO PAULO

2000

DEDALUS - Acervo - CQ

30100003255

Ficha Catalográfica

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

Chan, Sandra Sueli
C454e Efeitos do alfa-tocoferol nas vias de sinalização associadas ao
"Burst" oxidativo de neutrófilos humanos / Sandra Sueli Chan.
-- São Paulo, 2000.
134p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Junqueira, Virgínia Berlanga Campos

1. Biologia celular 2. Bioquímica 3. Inflamação :
Medicina I. T. II. Junqueira, Virgínia Berlanga Campos,
orientador.

574.87 CDD

*"EFEITOS DO ALFA-TOCOFEROL NAS VIAS DE
SINALIZAÇÃO ASSOCIADAS AO "BURST"
OXIDATIVO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS".*

SANDRA SUELI CHAN

*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.*

Aprovada por:

Profa.Dra. VIRGINIA BERLANGA CAMPOS JUNQUEIRA
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. PAOLO DI MASCIO
IQ - USP

Profa.Dra. ALINE MARIA DA SILVA
IQ - USP

Prof. Dr. RUI CURI
ICB - USP

Profa. Dra. ANA CAMPA
FCF - USP

SÃO PAULO
04 DE OUTUBRO DE 2000.

Ao meu pai (in memoriam), lembrança sempre presente.

À minha mãe e aos meus familiares pelo carinho e apoio.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora e amiga, prof^a. Dr^a. Virgínia Berlanga Campos Junqueira, por todos esses anos de aprendizado, apoio e amizade, os quais foram muitos importantes para o meu amadurecimento profissional e pessoal.

Ao Dr. Hugo Pequeno Monteiro e aos profissionais da Fundação Pró-SAngue Hemocentro de São Paulo, pela oportunidade de utilização de suas instalações e equipamentos para a realização dos experimentos de “westernblot” e atividade de tirosinas fosfatases e, pela orientação técnico-científica.

À Fernanda Schindler, da Fundação Pró-Sangue de São Paulo, pela ajuda técnica e pela amizade.

Ao prof. Dr. Raul Maranhão e sua equipe , do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas, pela possibilidade de utilização de suas instalações e equipamentos.

Aos amigos de muitos anos do laboratório, Antonietta, Karin, Lígia Azzalis, Lígia Gomes, Leandro e Sandra Poppe e, aos amigos mais novos, Adriana, Alessandra, Alessandro e André pela amizade e apoio em todos os momentos que precisei.

Aos amigos do Laboratório Vitae, Luciano e Tânia Rodrigues pelo auxílio técnico-científico nas análises de vitamina E.

Ao Leandro Giavarotti pela ajuda na análise estatística dos resultados.

Ao Alessandro de Grande pela sua indispensável ajuda e orientação em informática.

À disciplina de Geriatria da UNIFESSP, sob a chefia do Dr. Luís Roberto Ramos, por nos ter acolhido neste departamento.

À Cibél e sua eficiente equipe da Pós-Graduação do Instituto de Química pela atenção e ajuda.

Ao Chico e ao Jailton pelo apoio técnico e pela amizade.

Aos amigos e aos professores do Instituto de Química pelo apoio, ajuda e orientação.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo e à FAPESP pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

RESUMO

Neste estudo foi verificado os efeitos do α -tocoferol (AT) nas vias de sinalização celular, dependentes de proteína quinase C (PKC) e de tirosinas quinases (TK), associadas ao "burst" oxidativo de neutrófilos humanos. Foram realizados também estudos comparativos com o inibidor da PKC, estaurosporina, com o inibidor de tirosinas quinases, genisteína e, com o análogo solúvel da vitamina E, Trolox. Foi feita a incorporação de AT *in vitro* às células, e então, estas foram estimuladas ou não com acetato de forbol miristato (PMA) ou com zymosan opsonizado (Zy). AT (40 μ M) inibiu a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelos neutrófilos estimulados com PMA ou Zy. Estaurosporina (10 nM), genisteína (100 μ M) e Trolox (40 μ M) também tiveram efeitos inibitórios. A atividade da PKC foi inibida pelo AT e pela estaurosporina, entretanto, a atividade da enzima não foi afetada pela genisteína e pelo Trolox. PMA e Zy promoveram um aumento da fosforilação em resíduos de tirosina de proteínas de neutrófilos. AT e estaurosporina provocaram um aumento adicional na fosforilação PMA-dependente, enquanto a genisteína causou uma diminuição e, Trolox não produziu nenhum efeito. Por outro lado, os quatro compostos foram inibitórios na fosforilação Zy-dependente. A atividade de tirosina fosfatases (PTPs) foi medida em neutrófilos estimulados e não-estimulados. PMA e Zy causaram uma diminuição na atividade de PTPs. A pré-incubação com AT e Trolox causou uma reversão destes efeitos inibitórios. O inibidor de serina/treonina fosfatases, caliculina A, também foi utilizado. Nós mostramos que este composto foi capaz de reverter os efeitos inibitórios do AT na produção de ERO e na atividade de PKC dos neutrófilos. Os resultados deste trabalho mostram que AT modulam ambas as vias de sinalização, PKC e TK-dependentes, associadas com o "burst" oxidativo de neutrófilos humanos e, que esta modulação pode ser devido a ativação de fosfatases pelo AT.

ABSTRACT

The effects of α -tocopherol succinate (TS) on the signaling pathways, dependent of protein kinase C (PKC) and tyrosine kinases (TK), associated with the oxidative burst of human neutrophils were analysed. Comparative studies with the PKC inhibitor, staurosporine, the TK inhibitor, genistein and the soluble analogues of vitamin E, Trolox were also performed. TS was incorporated into neutrophils and cells were then, stimulated or not with phorbol myristate acetate (PMA) or with opsonized zymosan (OZ). TS (40 $\mu\text{mol/l}$) inhibited the production of reactive oxygen species (ROS) by PMA or OZ-stimulated neutrophils. Staurosporine (10 nmol/l), genistein (100 $\mu\text{mol/l}$) and Trolox (40 $\mu\text{mol/l}$) were also inhibitory. PKC activity was inhibited by TS and staurosporine, however, the enzyme activity was not affected by genistein and Trolox. PMA and OZ promoted tyrosine phosphorylation in neutrophil proteins. TS and staurosporine caused a further increase of tyrosine phosphorylation of proteins in PMA-stimulated neutrophils, whereas, genistein diminished the levels of phosphorylation, and Trolox did not alter them. On the other hand, the four compounds decreased the tyrosine phosphorylated proteins in OZ-stimulated neutrophils. Protein tyrosine phosphatases (PTP) activity was measured in both resting and stimulated cells. PMA and OZ-stimulated neutrophils showed a decrease on PTP activity. Pre-incubation with TS or with Trolox caused partial recovery of the basal activity of stimulated neutrophils. The serine/threonine phosphatase inhibitor, calyculin A, was also utilized, and we showed that this compound was capable of reversing the inhibitory effects of TS on ROS production and PKC activity by neutrophils. These results show that TS modulates both PKC- and TK-dependent signaling pathways associated with the oxidative burst in human neutrophils, and this modulation could be due the activation of phosphatases by TS.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO

1.1 Neutrófilos e ativação da NADPH oxidase.....	1
1.2 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidas por neutrófilos.....	4
1.2.1 Ânion superóxido e peróxido de hidrogênio.....	4
1.2.2 Radical hidroxila e oxigênio singlete.....	4
1.2.3 Mieloperoxidase e HOCl.....	6
1.2.4 Espécies reativas do nitrogênio (ERN).....	6
1.3 Mecanismos de sinalização envolvidos na ativação da NADPH oxidase.....	7
1.3.1 Ativação da cascata de sinalização através da ligação receptor mediadas por proteínas G	8
1.3.2 Ativação da cascata de sinalização através da ligação ao receptor, mediada por outras proteínas.....	11
1.3.3 Cascata das MAP quinases.....	13
1.3.3.1 MEKKs.....	13
1.3.3.2 MEKs.....	14
1.3.3.3 MAPKs.....	14
1.3.3.4 Papel das MAP quinases na sinalização celular.....	15
1.3.3.5 MAP quinases e ativação de neutrófilos.....	15
1.3.4 PI 3-quinase e proteínas quinases citosólicas.....	17
1.3.5 PKC e ativação da NADPH oxidase.....	19
1.3.5.1 Estrutura e isoformas da PKC.....	20
1.3.5.2 Regulação da (PKC) por fosforilação.....	22
1.4 Proteínas tirosina fosfatases (PTPs).....	23
1.4.1 CD45.....	24
1.4.2 SHP-1.....	25
1.5 Proteínas serina/treonina fosfatases.....	26
1.5.1 Estrutura da PP2A.....	27
1.5.2 Regulação da quinase pela PP2A.....	28
1.5.2.1 Proteína quinase C.....	28

1.5.2.2	Quinases dependentes de Ca^{2+} e calmodulina.....	28
1.5.2.3	Cascata das MAP quinases.....	29
1.6	Modulação redox das vias de sinalização celular.....	29
1.6.1	Fontes extra- e intracelulares de oxidantes.....	30
1.6.2	Ação de oxidantes sobre tirosina quinases e fosfatases.....	31
1.6.3	Ação de oxidantes sobre serina/treonina quinases e fosfatases.....	33
1.7	Vitamina E.....	34
1.7.1	Estrutura química.....	34
1.7.2	Atividade biológica.....	35
1.7.3	Papel estrutural.....	36
1.7.4	Metabolismo.....	37
1.7.4.1	Absorção intestinal.....	37
1.7.4.2	Transporte sangüíneo para o fígado.....	37
1.7.4.3	Receptor hepático.....	37
1.7.4.4	Localização tissular e celular.....	38
1.7.5	Efeitos da vitamina E na fisiologia das células sangüínea e vasculares.....	40
1.7.5.1	Plaquetas.....	40
1.7.5.2	Fagócitos.....	41
1.7.5.3	Células endoteliais.....	41
1.7.5.4	Células do músculo liso vascular.....	42
1.7.6	Efeitos da vitamina E na atividade da PKC.....	43
2.	OBJETIVOS.....	49
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1	Reagentes e equipamentos.....	50
3.2	Equipamentos.....	51
3.3	Obtenção dos neutrófilos sangüíneos humanos.....	52
3.4	Determinação da concentração de vitamina E incorporada à membrana dos neutrófilos.....	53
3.5	Determinação da atividade fungicida (killing) de neutrófilos sangüíneos.....	53

3.6 Determinação da produção de ERO/ERN por neutrófilos sangüíneos, através da QL amplificada por luminol.....	54
3.6.1 Estudo do efeito do α -tocoferol na produção de ERO/ERN por neutrófilos, através da QL amplificada por luminol.....	55
3.6.2 Estudo comparativo dos efeitos do α -tocoferol, estaurosporina, genisteína e Trolox na produção de ERO/ERN por neutrófilos, através da QL.....	56
3.6.3 Estudo dos efeitos da caliculina A na produção de ERO/ERN por neutrófilos, através da QL.....	56
3.6.4 Estudo dos efeitos da caliculina A sobre a ação inibitória do α -tocoferol na produção de ERO/ERN por neutrófilos, através da QL.....	57
3.7 Determinação do padrão geral de fosforilação em resíduos de tirosina de proteínas de neutrófilos.....	58
3.7.1 Estudo do efeito do α -tocoferol nos níveis de fosforilação em tirosina de proteínas de neutrófilos.....	58
3.7.2 Estudo comparativo dos efeitos do α -tocoferol, estaurosporina, genisteína e Trolox nos níveis de fosforilação de proteínas de neutrófilos.....	60
3.8 Determinação da atividade da PKC de neutrófilos.....	60
3.8.1 Efeito do α -tocoferol na atividade de PKC de neutrófilos.....	60
3.8.2 Estudo dos efeitos da genisteína, estaurosporina e Trolox na atividade da PKC: comparação com o α -tocoferol.....	61
3.8.3 Estudo dos efeitos da caliculina A na atividade da PKC de neutrófilos.....	61
3.8.4 Estudo dos efeitos da caliculina A sobre a ação inibitória do α -tocoferol sobre a atividade de PKC de neutrófilos.....	62
3.9 Estudo dos efeitos do α -tocoferol e do Trolox na atividade de tirosina fosfatases de neutrófilos.....	63
3.9.1 Imunoprecipitação do receptor de EGF.....	63
3.9.2 Ensaio de proteínas tirosina fosfatases.....	63

4. RESULTADOS

4.1 Curva de incorporação de α -tocoferol pelas membranas de neutrófilos.....	65
4.2 Atividade fungicida.....	66
4.3 “Burst” respiratório.....	67
4.3.1 Efeito do α -tocoferol na produção de ERO/ERN por neutrófilos, através da QL amplificada por luminol.....	67
4.3.2 Estudo comparativo dos efeitos do α -tocoferol, Trolox, estaurosporina e genisteína na produção de ERO/ERN por neutrófilos, através da QL amplificada por luminol.....	71
4.3.3 Estudo dos efeitos da caliculina A na estimulação do “burst” oxidativo de neutrófilos, através da QL amplificada por luminol.....	73
4.3.4 Estudo dos efeitos da caliculina A sobre o efeito inibitório do α -tocoferol na estimulação do “burst” oxidativo de neutrófilos, medida pela QL amplificada por luminol.....	76
4.4 Atividade da proteína quinase C (PKC).....	78
4.4.1 Efeito do α -tocoferol na atividade da PKC de neutrófilos.....	78
4.4.2 Estudo dos efeitos da genisteína, estaurosporina e Trolox na atividade da PKC: comparação com o α -tocoferol.....	80
4.5 Fosforilação em resíduos de tirosina.....	83
4.5.1 Efeito do α -tocoferol nos níveis de fosforilação em tirosina de proteínas em neutrófilos.....	83
4.5.2 Estudo dos efeitos do α -tocoferol, Trolox, estaurosporina e genisteína nos níveis de fosforilação em tirosina de proteínas em neutrófilos.....	84
4.6 Estudo dos efeitos do α -tocoferol e do Trolox na atividade de tirosina fosfatases de neutrófilos.....	89

5. DISCUSSÃO

5.1 Incorporação do α -tocoferol pelas membrans dos neutrófilos.....	91
---	----

5.2 Atividade fungicida dos neutrófilos.....	92
5.3 Produção de ERO/ERN por neutrófilos humanos.....	93
5.3.1 Efeito do α -tocoferol na produção de ERO/ERN por neutrófilos.....	95
5.3.2 Estudo comparativo dos efeitos do α -tocoferol, Trolox, estaurosporina e genisteína sobre a produção de ERO/ERN por neutrófilos.....	96
5.3.3 Estudo dos efeitos da caliculina A sobre a produção de ERO/ERN e sobre os efeitos inibitórios do α -tocoferol em neutrófilos.....	99
5.4 Atividade da PKC de neutrófilos humanos.....	101
5.4.1 Efeito do α -tocoferol sobre a atividade da PKC de neutrófilos.....	102
5.4.2 Estudo comparativo dos efeitos do α -tocoferol, Trolox, estaurosporina e genisteína sobre a atividade da PKC.....	103
5.4.3 Estudo dos efeitos da caliculina A sobre a atividade da PKC de neutrófilos humanos.....	104
5.5 Fosforilação em resíduos de tirosinas de proteínas de neutrófilos humanos.....	105
5.5.1 Estudo dos efeitos do α -tocoferol sobre os níveis de fosforilação em tirosina de proteínas de neutrófilos.....	107
5.5.2 Estudo comparativo dos efeitos do α -tocoferol, Trolox, estaurosporina e genisteína nos níveis de fosforilação em tirosina de proteínas de neutrófilos.....	108
5.6 Efeito do α -tocoferol e do Trolox na atividade de PTPs de neutrófilos.....	109
6. CONCLUSÕES.....	112
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Neutrófilos e ativação da NADPH oxidase

Os neutrófilos são os leucócitos polimorfonucleares mais abundantes na circulação sangüínea e desempenham um papel essencial na resposta inflamatória e na defesa contra microorganismos invasores. Durante a resposta inflamatória, estas células são rapidamente mobilizadas para o local da lesão, onde elas fagocitam agentes patogênicos e/ou fragmentos de tecidos danificados, liberando, subsequentemente, espécies tóxicas derivadas do oxigênio, assim como, enzimas proteolíticas e proteínas catiônicas. Estes compostos irão por sua vez, destruir e digerir o microorganismo fagocitado. Entretanto, pode ocorrer extravasamento destes produtos tóxicos para o meio extracelular, o que resultará em lesão dos tecidos circundantes (*Babior, 1978; Klebanoff, 1980*). Estas lesões teciduais, causadas por espécies reativas do oxigênio (ERO) estão associadas a uma variedade de doenças inflamatórias, dentre elas, artrite reumatóide (*Kitsis & Weissmann, 1991*), lesão por isquemia e reperfusão (*Zimmerman & Granger, 1994*) e síndrome do distresse respiratório do adulto (*Boxer et al., 1990*).

A resposta dos neutrófilos aos agentes lesivos inicia-se pela sua ativação por diversos estímulos, que podem agir através da ligação a receptores de membrana da célula, como bactérias opsonizadas e o peptídeo sintético N-formil-metionil-fenilalanina (fMLP) ou, então, pela ativação direta de proteínas quinases intracelulares, como ésteres de forbol, que são agentes carcinogênicos e que tem a propriedade de ativar a proteína quinase C (*Babior, 1988*).

A produção do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pelos neutrófilos requer o desencadeamento de uma seqüência de eventos metabólicos denominados como "burst" oxidativo. Estes eventos envolvem o aumento do consumo de oxigênio, de glicose e de agentes redutores, como o nucleotídeo dicotinamida adenosina fosfato (NADPH) e também, a ativação de um complexo enzimático na membrana celular, denominado de NADPH oxidase (Babior, 1978).

A NADPH oxidase leucocitária catalisa a produção de $O_2^{\bullet-}$ através da redução unieletrônica do oxigênio molecular, utilizando NADPH como doador de elétrons (Babior, 1999):

Por sua vez, o $O_2^{\bullet-}$ é convertido rapidamente a outras espécies reativas de oxigênio secundárias, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) o radical hidroxila ($^{\bullet}OH$) e o ácido hipocloroso (HClO) os quais, juntamente com as proteínas liberadas dos grânulos citoplasmáticos, são os principais responsáveis pela ação microbicida e lesiva dos neutrófilos (Rosen et al., 1995).

O complexo enzimático NADPH oxidase é constituído por componentes que se encontram dissociados na célula em repouso. Estes são a $p40^{phox}$, a $p47^{phox}$ e a $p67^{phox}$, agrupados num complexo proteico citoplasmático de 240 kDa. Temos, também, o citocromo b_{558} , composto pelas proteínas $p22^{phox}$ e $gp91^{phox}$, localizadas nas membranas das vesículas secretórias e dos grânulos específicos citoplasmáticos. Participam também do complexo enzimático, duas proteínas de baixo peso molecular ligantes de nucleotídeo guanina: a Rac 2, que encontra-se

no citoplasma, formando um complexo dimérico com Rho-GDI (inibidor de dissociação do nucleotídeo guanina) e a Rap 1A, presente no citoesqueleto (Babior, 1999; DeLeo & Quinn, 1996).

No neutrófilo ativado, temos a fosforilação do componente citosólico $p47^{\text{phox}}$, resultando na migração de todo o complexo para a membrana plasmática. Uma vez na membrana, o complexo associa-se ao citocromo b_{558} , que migrou para a mesma através da fusão das vesículas secretórias e dos grânulos específicos. Durante a ativação, a Rac 2 liga-se ao trifosfato de guanina (GTP) e migra para a membrana juntamente com o complexo citosólico (Babior, 1999; DeLeo & Quinn, 1996). O acoplamento de todos os componentes à membrana formará, assim, o complexo cataliticamente ativo (figura 1).

Figura 1: Acoplamento dos componentes da NADPH oxidase após ativação dos neutrófilos. (Babior, 1999).

1.2 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidas por neutrófilos

1.2.1 Ânion superóxido e peróxido de hidrogênio

A ativação da NADPH oxidase dos neutrófilos, através da ligação de uma variedade de agentes a receptores de membrana, resulta na produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) por estas células (Babior, 1973). A maior parte do $O_2^{\bullet-}$ produzido é convertido por dismutação espontânea, ou catalisada pela superóxido dismutase, a peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Entretanto, o H_2O_2 tem atividade bactericida somente a altas concentrações (Hyslop *et al.*, 1995) e o $O_2^{\bullet-}$, gerado exogenamente, não tem uma atividade bactericida direta (Klebanoff, 1974; Rosen & Klebanoff, 1979). Portanto, a ação microbicida dos neutrófilos, provavelmente, é devida à ação de oxidantes secundários, produzidos a partir do $O_2^{\bullet-}$ e do H_2O_2 (figura 2) (Hampton *et al.*, 1998).

O H_2O_2 pode ser neutralizado por peroxidases ou pela catalase intracelulares, resultando na produção de H_2O (Rosen *et al.*, 1995).

1.2.2 Radical hidroxila e oxigênio singlete

Na presença de íons metálicos, como íons férricos, o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) pode ser produzido, através da reação de Haber-Weiss:

Nos neutrófilos, $\cdot\text{OH}$ também pode ser produzido pela reação do ácido hipocloroso (HOCl) com $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Ramos *et al.*, 1992):

Por ser altamente reativo, $\cdot\text{OH}$ possui uma ação microbicida limitada; mesmo dentro do fagossomo, este radical, provavelmente, reage com outros alvos, antes de atingir o microorganismo (Wolcott *et al.*, 1994).

O oxigênio singlete pode ser produzido nos neutrófilos pela reação do H_2O_2 com o HOCl (figura 2). Steinberg *et al.* (1992) mostraram que a produção de oxigênio singlete por estas células é superior a 19%. Contudo, a importância deste composto como agente bactericida em neutrófilos, não está bem estabelecida.

1.2.3 Mieloperoxidase e HOCl

A maior parte do H_2O_2 produzido pelos neutrófilos, é convertido a HOCl, pela ação da enzima mieloperoxidase (MPO) contida nos grânulos azurófilos dos neutrófilos (*Kettle & Winterbourn, 1997*). O HOCl, por sua vez, é o principal e o mais potente oxidante microbida produzido pelos neutrófilos (*Klebanoff, 1968*). Cloraminas podem ser geradas pela reação do HOCl com aminas, as quais, também, possuem uma ação microbida (*Thomas & Leam, 1991; Grisham et al., 1984*) (figura 2). A MPO pode gerar peróxidos e derivados fenólicos hidroxilados como salicilatos (*Kettle & Winterbourn, 1994; Winterbourn et al, 1997*).

1.2.4 Espécies reativas de nitrogênio (ERN)

A enzima óxido nítrico sintase (NO sintase) oxida a L-arginina, formando L-citrulina e óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$). Há duas isoformas da NO sintase: a constitutiva e a induzida. Esta última, que é encontrada nos fagócitos, pode ser induzida por uma variedade de endotoxinas ou citocinas (*Moncada & Higgi, 1993*).

Tem sido demonstrado que o $\text{O}_2^{\bullet-}$ reage com $\text{NO}^\bullet$, formando peroxinitrito (ONOO^-) (*Hue & Padmaja, 1993*). Este pode se decompor dando origem a $^\bullet\text{OH}$ e $\text{NO}_2^\bullet$ (*Beckman et al., 1990*):

Estudos em neutrófilos, mostraram que estas células, quando estimuladas por agentes infecciosos, expressam a $\text{NO}^\bullet$ sintase induzida (Wheeker *et al.*, 1997). Adicionalmente, outra fonte de ERN nos neutrófilos, é através da oxidação de nitritos, tanto pela MPO, como pelo HOCl (Van der Ulitet *et al.*, 1997) (figura 2).

Figura 2: Oxidantes produzidos pelos neutrófilos humanos (Hampton *et al.*, 1998).

1.3 Mecanismos de sinalização envolvidos na ativação da NADPH oxidase

A cascata de sinalização intracelular compreende um sistema complexo de amplificação, que inicia-se a partir de um sinal extracelular na membrana plasmática, terminando por acionar uma resposta celular, como proliferação, diferenciação, síntese de proteínas ou ativação. A partir da estimulação da membrana, seguida da quebra de lipídios constituintes desta, haverá a liberação de segundos mensageiros que, por sua vez, irão ativar uma cascata de interações entre proteínas. Estas interações são, geralmente, resultantes de modificações covalentes, ocasionadas por reações de fosforilação em resíduos de tirosina e/ou de serina/treonina (*Hug & Sarre, 1993*).

Têm sido demonstrado haver um aumento de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina, durante a ativação de neutrófilos, resultando em produção de ERO (*Berkow et al., 1989; Gomes-Cambronero, 1989; Berkow & Dodson, 1990; Rollet et al., 1994*). Por exemplo, as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP quinases) são fosforiladas em tirosina, após a ativação de neutrófilos por diversos agonistas que induzem a produção de ERO (*Fialkow et al., 1994*). As MAP quinases são serina/treonina quinases, que nos neutrófilos, uma vez ativadas, irão fosforilar os componentes da NADPH oxidase, p47^{phox} e p67^{phox} (*El Benna et al., 1996; El Benna et al., 1997*).

O estado de fosforilação, em resíduos de serina, treonina ou de tirosina, das proteínas envolvidas na cascata de ativação do “burst” oxidativo dos neutrófilos, é determinado pelo balanço entre as atividades das proteínas quinases e das proteínas fosfatases intracelulares.

1.3.1 Ativação da cascata de sinalização através da ligação ao receptor, mediada por proteínas G

A maioria das funções dos neutrófilos mediadas por receptores são desencadeadas por proteínas ligantes de GTP (proteínas G) as quais providenciam uma conexão entre os receptores de membrana ocupados e a ativação de enzimas intracelulares, como fosfolipases e quinases. Existem dois grupos de proteínas G: as heterotriméricas e as de baixo peso molecular. Ambas desempenham papéis importantes na modulação de várias funções dos neutrófilos.

As proteínas G heterotriméricas regulam a atividade da adenilato ciclase, sendo as que ativam a enzima, denominadas de G_s e, as que inibem, de G_i . A adenilato ciclase ativada pelas proteínas G, irá agir sobre o seu substrato, resultando em produção de AMP cíclico. Além da regulação da adenilato ciclase, estas proteínas G regulam a atividade de muitas fosfolipases. Nos neutrófilos, a ativação da fosfolipase C, desencadeada pela proteína G, irá resultar na clivagem de fosfolipídios de membrana, gerando os segundos mensageiros, diaciglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3) (McPhail *et al.*, 1991). Este último irá promover o aumento de cálcio citosólico, através da liberação do íon de seus estoques intracelulares. O cálcio, por sua vez, tem seu papel no deslocamento da proteína quinase C (PKC) para a membrana celular, necessária para a ativação desta enzima (Baggiolini & Thelen, 1991). O outro segundo mensageiro, o DAG, ativa a PKC, ligando-se ao seu domínio regulatório e promovendo o seu desligamento do pseudosubstrato inibitório (Nishizuka, 1988). A PKC, ativa diversas proteínas

citossólicas, fosforilando estas em seus resíduos de serina e treonina (*Hug & Sarre, 1993*). Dentre as proteínas fosforiladas pela PKC temos a p47^{phox} e a p67^{phox}, componentes citosólicos da NADPH oxidase, os quais uma vez fosforilados, irão se deslocar e se acoplar aos componentes de membrana da NADPH oxidase (*Clark, 1990; Labadia & Huang, 1996; El Benna et al, 1996; El Benna et al., 1997*). As MAP quinases também podem ser fosforiladas pela PKC em seu resíduos de serina/treonina (*Thomas et al., 1992; Zu et al., 1996*). (figura 3).

Além das proteínas G heterotriméricas de alto peso molecular, uma superfamília de proteínas ligantes de GTP de baixo peso molecular, estruturalmente relacionadas com *ras*, desempenham papel fundamental no crescimento e diferenciação celulares. A superfamília de proteínas *ras* nas células de mamíferos é dividida em três grupos, dependendo do grau de homologia entre as proteínas: (i) *proteínas ras*, que são 85% homólogas entre si, havendo também mais três outras subfamílias, as proteínas Rap, R-ras e Ral; (ii) *proteínas rab*, estão presentes no Golgi e, podem estar envolvidas no transporte de proteínas entre compartimentos subcelulares e (iii) *proteínas rho* (ex.: Rho A e Rac) que estão envolvidas no acoplamento dos microfilamentos de actina. Um número crescente de evidências experimentais sugere que essas proteínas G de baixo peso molecular participam da degranulação e fusão de fagolisossomas e da movimentação de grânulos, em neutrófilos (*Edwards, 1994*).

Figura 3: Cascata de sinalização da ativação da NADPH oxidase, mediada por proteína G. A ligação do receptor de membrana a um estímulo extracelular, irá ativar a proteína G, resultando na clivagem de lipídios pela fosfolipase C, dando origem aos segundos mensageiros, IP₃ e DAG. O IP₃ irá promover o aumento de Ca²⁺ citosólico, responsável pela mobilização da proteína quinase C (PKC). O DAG irá ativar a PKC e, esta, irá fosforilar os componentes da NADPH oxidase, p47^{phox} e p67^{phox} e, também, MAP quinases.

1.3.2 Ativação da cascata de sinalização através da ligação ao receptor, mediada por outras proteínas

A ligação de um estímulo a um receptor quinase na membrana, resultará em oligomerização do receptor e sua subsequente autofosforilação em resíduo de tirosina. O receptor autofosforilado irá ligar-se a proteínas com domínios de homologia src 2 (SH2) os quais reconhecem sítios fosforilados em tirosina de proteínas e receptores. As proteínas com domínios SH2 podem ser enzimas como, as tirosinas quinases da família src, a fosfolipase C γ e a ras-GAP, ou então,

proteínas adaptadoras, sem atividade catalítica, como Shc, Grb2 e Nck (*Buday, 1999*).

Os domínios de homologia src 3 (SH3) são encontrados em muitas proteínas envolvidas na cascata de sinalização de tirosinas quinases, na organização do citoesqueleto e em complexos enzimáticos, como a NADPH oxidase dos fagócitos (*Pawson, 1995; Leto et al., 1994; Finan et al., 1994*). Eles tem a propriedade de se ligar em resíduos de prolina de proteínas (*Ren et al., 1993*).

As proteínas adaptadoras Grb2 e Shc tem sido implicadas na ativação da cascata de sinalização dependente de tirosinas quinases, resultando na ativação da NADPH oxidase dos fagócitos. A Grb2 possui, em sua estrutura, dois domínios SH3 com um domínio SH2 no centro. Esta estrutura possibilita que a proteína ligue-se a fosfotirosinas de proteínas, através de seu domínio SH2 e a regiões ricas em prolinas pelos domínios SH3 (*Buday, 1999*). A Shc, por sua vez, contém apenas o domínio SH2 e é fosforilada em tirosina após a ligação deste a uma fosfotirosina. A Shc fosforilada cria um sítio de ligação para o domínio SH2 da Grb2 (*Rozakis-Adcock et al., 1992; Pelicci et al., 1992*).

Um receptor fosforilado em resíduo de tirosina pode, portanto, ligar-se tanto ao domínio SH2 da Grb2, como no mesmo domínio da Shc, esta última, ligando-se à Grb2 (*Buday & Downward, 1993*). A Grb2 ativada associa-se à proteína de troca de Ras GTP/GDP, Sos, induzindo a ativação de Ras e a iniciação da cascata das MAP quinases (*Worthen et al., 1994; Buhl et al., 1994*) (figura 4).

Figura 4: Cascata da sinalização mediada por proteínas adaptadoras. A ligação de um estímulo a um receptor quinase de membrana irá resultar em sua oligomerização e autofosforilação em resíduos de tirosina. Domínios SH2 de proteínas adaptadoras citosólicas (Shc, GRB2) ligam-se ao resíduos fosforilados do receptor. Shc ligada ao receptor se autofosforila, ligando-se ao domínio SH2 da GRB2. A ocupação do domínio SH2 da GRB2 faz com que esta ligue-se, através de seu domínio SH3, a resíduos de prolina da proteína Sos. Sos, então, irá desencadear a troca de GDP por GTP da proteína Ras, iniciando a cascata das MAP quinases.

1.3.3 Cascata das MAP quinases

A cascata das proteínas ativadas por mitógenos (MAPKs) denominadas também de proteínas reguladas por sinais extracelulares (ERKs) é encontrada em todos os organismos eucariotos. Nesta via de sinalização, há a participação de três quinases: a MAPK, a qual é ativada pela MAPK/ERK quinase (MEK) que, por sua vez, é ativada pela MEK quinase (MEKK) (Cobb & Goldsmith, 1995).

1.3.3.1 MEKKs

As primeiras MEKKs a serem descobertas foram as da família Raf. Elas são produtos oncogênicos e ativam especificamente MEK1 e MEK2 da cascata MAPK/ERK. Esta família é representada pela Raf-1, A-Raf e B-Raf (Wu *et al.*, 1996). Outras MEKKs são a MEK quinase 1 (MEKK1) (Lange-Carter *et al.*, 1993) a MEK quinase 2 (MEKK2) a MEK quinase 3 (MEKK3) (Robinson & Cobb, 1997) a MEK quinase 4 (MEKK 4) (Yashar *et al.*, 1993) e o produto proto-oncogênico Mos (Posada *et al.*, 1993). A MEKK1 pode ativar a via das proteínas quinases ativadas por estresse (JNK/SAPKs) como também as vias das ERKs, dependendo do tipo celular (Robinson & Cobb, 1997). MEKK2 ativa preferencialmente as JNK/SAPKS, enquanto MEKK3, ativa preferencialmente ERKs (Blank *et al.*, 1996). Foi mostrado que a MEKK4 pode ativar *in vitro* JNK/SAPK e p38/HOG1, mas não ERK1 ou ERK2 (Lin *et al.*, 1995).

1.3.3.2 MEKs

Foi relatado a existência de seis membros da família MEK, as proteínas MEK1-6. MEK1 e MEK2 ativam ERK1 e ERK2; MEK3 age sobre p38; MEK4 age na via das JNK/SAPKs e, talvez, sobre p38; MEK5 liga-se a ERK5 e MEK6 ativa a p38 (Waskiewicz & Cooper, 1995; Han *et al.*, 1996).

1.3.3.3 MAPKs

As MAPKs são agrupadas em subfamílias baseando-se em sua semelhança sequencial, em seus mecanismos de regulação e, em sua sensibilidade à ativação pelas diferentes MEKs. As três subfamílias descritas são as ERKs, as JNK/SAPKs e a p38. Para serem ativadas, elas precisam ser fosforiladas em resíduos de tirosina, assim como, em resíduos de serina/treonina (Cobb & Goldsmith, 1995).

1.3.3.4 Papel das MAPK quinases na sinalização celular

Muitos trabalhos tem mostrado que as ERK1 e ERK2 podem ser ativadas por diferentes mitógenos, desempenhando, portanto, um importante papel na proliferação e diferenciação celular (Robinson & Cobb, 1997). As JNK/SAPKs também podem participar na sinalização induzida por mitogénos (Sakata *et al.*, 1995), enquanto que a p38 é um regulador negativo da proliferação celular (Lavoie *et al.*, 1996).

Substâncias causadoras de estresse celular, como choque térmico ou osmótico, citocinas, inibidores de síntese proteica, oxidantes e a radiação UV, entre outras, ativam JNK/SAPKs e p38, resultando em inibição do crescimento e aumento da diferenciação celular (Robinson & Cobb, 1997).

O papel das MAP quinases na sinalização celular, levando à apoptose, é ainda controverso. ERK e JNK/SAPK possuem efeitos antagônicos nesta resposta celular, ERK protegendo a célula da morte, enquanto JNK/SAPK tem um papel de

indutor de apoptose (*Sakata et al., 1995*). A MAP quinase p38 também induz morte celular programada (*Xia et al., 1995*).

1.3.3.5 MAP quinases e ativação de neutrófilos

Tem sido demonstrada a existência de duas isoformas das MEKs em neutrófilos humanos, MEK1 e MEK2, sendo esta última, a mais abundante e ativa neste tipo celular (*Downey et al., 1996*).

Estímulos que se ligam a receptores de membrana nos neutrófilos, como produtos bacterianos, componentes do sistema complemento e da cascata da coagulação e fatores solúveis, como as citocinas, podem ativar as vias de sinalização dependentes da GTPase de baixo peso molecular, p21^{ras}. Esta por sua vez, ativará Raf, levando à fosforilação e ativação das MEKs, as quais irão fosforilar e ativar ERK1 (p44^{Map quinase}) e ERK2 (p42^{MAP quinase}) nestas células (*Worthen et al., 1994*).

Downey *et al.* (1996) demonstraram que MEK1 e MEK2 podem ser ativadas em neutrófilos estimulados por ésteres de forbol, sugerindo que a PKC esteja envolvida nesta ativação. Estes mesmos autores, demonstraram que a wortmanina, um inibidor de PI-3 quinase, inibiu fortemente a atividade da MEK2 e, moderadamente, a da MEK1. Estes resultados sugerem a existência de vias diferentes para a ativação das duas isoformas. Foi demonstrado também, que a ERK1 é mais sensível à inibição pela wortmanina que a ERK2. Provavelmente, o substrato de MEK2 é a ERK1 e, ERK2, o substrato de MEK1 (*Downey et al., 1996*).

Nahas *et al.* (1996) mostraram que polissacarídeos bacterianos (LPS) induzem a fosforilação em resíduo de tirosina da p38, mas não das ERK1 e ERK2, em neutrófilos humanos.

As ERKs participam na ativação do “burst” oxidativo em neutrófilos, fosforilando em resíduos de serina a p47^{phox} e a p67^{phox}, os componentes citosólicos da NADPH oxidase (El Benna *et al.*, 1996; El Benna *et al.*, 1997) (figura 5).

Figura 5: Cascata das MAP quinases, resultando na fosforilação dos componentes da NADPH oxidase. A ligação de GRB2, através de seu domínio SH2, ao receptor autofosforilado irá ativar Sos. Sos promove a troca de GDP por GTP de Ras que, por sua vez, irá ativar a MAP quinase quinase quinase (MEKK), Raf. Esta fosforila e ativa a MAP quinase quinase (MEK) que irá fosforilar as MAP quinases ERK1 e ERK2. A proteína quinase C (PKC) também fosforila as ERKs. Os componentes citosólicos da NADPH oxidase (p47^{phox} e p67^{phox}) podem ser fosforilados pelas ERKs e pela PKC sendo, em seguida deslocados para a membrana celular, onde irão se acoplar aos componentes de membrana do complexo enzimático.

1.3.4 Fosfatidil inositol 3 quinase e proteínas tirosinas quinases citosólicas

A fosfatidil inositol 3 quinase (PI-3 quinase) catalisa a formação de fosfatidilinositol 3 fosfato (PIP3) importante segundo mensageiro, que irá ativar a liberação de íons cálcio dos estoques citossólicos (Arcaro & Wymann, 1994; Okada, 1994). Esta enzima é formada por uma subunidade regulatória de 85 kDa e por uma subunidade catalítica de 110 kDa. Foi demonstrado que Rac 1 (uma proteína G de baixo peso molecular) é ativada por sua interação com a subunidade de 85 kDa da PI-3 quinase. A Rac 1 ativada, irá-se acoplar à NADPH oxidase na membrana (Greenberg, 1995). Por outro lado, Ras (também proteína G de baixo peso molecular) liga-se à subunidade de 110 kDa da PI-3 quinase, resultando na ativação da cascata das MAP quinases (Rodriguez-Viciano et al., 1994).

Por possuir um domínio SH2, a PI-3 quinase pode se ligar a receptores autofosforilados em tirosina e ser ativada. Através deste domínio, ela também se liga a fosfotirosinas de proteínas adaptadoras, como a GRB2 e Shc e de tirosina quinases citosólicas, como Lyn e Hck (Ptasznik et al., 1995).

Lyn e Hck, também podem ser ativadas pela ligação ao receptor Fc (Barrola et al., 1997). Resíduos de tirosina pertencentes à Lyn ou Hck podem, então, se ligar ao domínio SH2 da proteína adaptadora Shc, fosforilando o domínio SH2 desta última. A fosforilação de um resíduo de tirosina em Shc cria um sítio de associação desta proteína com o domínio SH2 da PI-3 quinase. A formação deste complexo poderá resultar em fosforilação da PI-3 quinase, que por sua vez irá ativar rac, outro componente citosólico da NADPH oxidase (Ptasznik et al., 1995). Outra via também pode ser ativada por este complexo, através da fosforilação da

proteína Grb2, a qual se ligará a h-Sos1, resultando na ativação de uma cadeia de reações de fosforilação. As proteínas ativadas nesta via são: RAS→RAF→MEK→MAP quinase (Worthen *et al.*, 1994; Buhl *et al.*, 1994). Esta última irá fosforilar os componentes da NADPH oxidase, $p47^{\text{phox}}$ e $p67^{\text{phox}}$ (El Benna *et al.*, 1996; El Benna *et al.*, 1997) (figura 6).

Figura 6: Cascata de sinalização e ativação da NADPH oxidase mediada pela PI-3 quinase. A subunidade catalítica da PI 3-quinase (p110) pode se ligar, através de seu domínio SH2, a receptores autofosforilados e ser ativada. Esta irá ativar Ras, dando início à cascata das MAP quinases, resultando na fosforilação dos componentes citosólicos da NADPH oxidase, $p47^{\text{phox}}$ e $p67^{\text{phox}}$. O domínio SH2 da subunidade catalítica da PI-3 quinase também pode-se ligar às proteínas adaptadoras GRB2 e Shc ou, então, a tirosina quinases citosólicas (Lyn, Hck). A subunidade regulatória da P1-3 quinase (p85) liga-se a Rac, promovendo seu deslocamento para a membrana, onde esta irá ligar-se aos componentes da NADPH oxidase.

1.3.5 PKC e ativação da NADPH oxidase

A proteína quinase C é (PKC) uma serina/treonina quinase que age em processos regulatórios de diferentes compartimentos subcelulares. Dentre seus numerosos substratos, encontramos três classes: proteínas envolvidas nas vias de transdução de sinal, proteínas participantes dos processos metabólicos e proteínas que agem na expressão gênica (*Hug & Sarre, 1993*).

Diversos resultados são concordantes no que diz respeito a participação da PKC na ativação da NADPH oxidase. Dentre eles podemos citar que: i) a migração da PKC para a membrana, se correlaciona com a produção de $O_2^{\bullet-}$ (*Wolfson et al., 1985*) e ii) o PMA, um agonista da PKC, estimula o “burst” oxidativo em monócitos (*Kadri-Hassani et al., 1995*) e em neutrófilos (*Naussef et al., 1991*), com concomitante fosforilação e deslocamento da $p47^{phox}$. Adicionalmente, foi demonstrado que a $p67^{phox}$ também é fosforilada pela PKC, porém, o número de sítios de fosforilação é menor do que o da $p47^{phox}$ (*El Benna et al., 1997*). Num sistema *in vitro*, acelular, a NADPH oxidase foi ativada pela adição de PKC e de seus cofatores (*Cox et al., 1985; El Benna et al., 1995*) ou pela adição de $p47^{phox}$ purificada e fosforilada (*Park et al., 1997*) sugerindo que somente a fosforilação da $p47^{phox}$ é suficiente para ativar a oxidase.

1.3.5.1 Estrutura e isoformas da PKC

A PKC é uma família de enzimas composta de múltiplas isoformas, podendo ser dividida em três grupos:

- a) As PKCs convencionais, ou cPKC, que são cálcio-dependentes, requerendo fosfatidilserina e ligação de diacilglicerol (DAG) ou ésteres de forbol para serem ativadas. Estas são: as isoformas α , β_I , β_{II} e γ . Suas cadeias peptídicas apresentam 4 regiões conservadas (C1 a C4) e 5 regiões variáveis (V1 a V5).
- b) As PKCs *novel*, ou nPKCs, necessitam de fosfatidilserina e DAG para serem ativadas, mas independem de íons cálcio. Estas são representadas pelas isoformas δ , L (humanas) η (murina) θ , μ (humana) e PKD (murina). Elas não possuem a região C2, que contém o sítio para a fixação do cálcio.
- c) As PKCs atípicas, ou aPKC, que dependem de fosfatidilserina mas, independem de DAG e cálcio para sua ativação. Suas representantes são as isoformas ζ e λ . Sua região C1 não possui o sítio de fixação para DAG ou ésteres de forbol (Newton, 1995).

As PKCs possuem um domínio regulatório N-Terminal e um domínio catalítico C-terminal, separadas por uma região de dobradiça (entre a região V3) sensível à degradação proteolítica (figura 7).

A região C1 possui uma zona rica em resíduos de cisteína constituída de duas cópias de uma mesma seqüência (com exceção das PKCs atípicas, as quais possuem apenas uma cópia). Nela está localizado o sítio de ligação do DAG e dos ésteres de forbol. A ligação de um destes agentes resulta no deslocamento do pseudosubstrato inibitório (Cazaubon et al., 1990).

A região C2 contém numerosos resíduos ácidos correspondendo ao sítio de fixação do Ca^{2+} (Newton, 1995).

A região C3 liga-se ao ATP numa seqüência de consenso que se mantém conservada em diferentes quinases (Taylor & Radzio-Andzelm, 1994).

A região C4 compreende o sítio de fixação do substrato e de transferência do fosfato. A distância que separa o sítio de ligação do ATP e o sítio de transferência de fosfato é altamente conservada entre as isoformas (ao redor de 110 aminoácidos).

Demonstrou-se que, em neutrófilos existem três isoformas das cPKCs (PKC- α , PKC- β I e PKC- β II) a aPKC (PKC- ζ) e a PKC- ϵ , representante da classe das η -PKC (Majumdar et al., 1991; Kent et al., 1996).

Figura 7: Estrutura das isoformas da PKC.

1.3.5.2 Regulação da PKC por fosforilação

A PKC é sintetizada na membrana celulares numa forma defosforilada, inativa, com peso molecular de 74 kDa. A enzima é convertida a uma forma ativa,

de 77 à 80 kDa, através de modificação pós-traducional, envolvendo pelo menos duas etapas de fosforilações. Na primeira fosforilação, ocorre a participação de uma PKC quinase que fosforila a enzima na região da alça de ativação, posicionando os resíduos para a ação catalítica. A enzima ligada à membrana é, então, estimulada pela fosfatidilserina (FS) para se autofosforilar na região carboxi-terminal (*Borner et al., 1989; Dutil et al., 1994*). A isoforma β da PKC sofre, adicionalmente, mais duas autofosforilações, uma nos resíduos de serina e treonina da região amino-terminal e, outra, na região de “dobradiça” entre o domínio regulatório e o domínio quinase catalítico (*Flint et al. 1990*).

Tem sido mostrado que a auto-fosforilação da PKC altera sua afinidade por ésteres de forbol e sua associação à membrana, aumenta sua sensibilidade ao cálcio e à auto-regulação proteolítica (*Wolf et al., 1985*).

A exposição prolongada a ésteres de forbol leva à diminuição da atividade de PKC e, também, a um acúmulo da forma inativa de 74 kDa da enzima (*Borner et al., 1989*). Além disso, a incubação com as proteínas serina fosfatases (PSPs) PP1 e PP2A, resulta em completa defosforilação da forma de 77 kDa para a forma de 74 kDa da enzima (*Borner et al., 1989*).

Trabalhos realizados pelo grupo de A. Azzi, mostraram que a expressão, a fosforilação e a atividade da isoforma alfa da PKC podem ser reguladas pelo α -tocoferol (*Tasinato et al., 1997*). Esta regulação é feita, provavelmente, pela ativação de uma fosfatase (*Tasinato et al., 1995*). Estudos deste grupo mostraram também, que ambas PP1 e PP2A inibem reversivelmente a atividade da α -PKC, indicando que estas enzimas agem nos sítios de auto-fosforilação da enzima e não, no seu

sítio de trans-fosforilação, onde a fosforilação pela quinase é irreversível (*Ricciarelli & Azzi, 1998*).

1.4 Proteínas tirosina fosfatases (PTPs)

As principais PTPs presentes nos neutrófilos humanos são a CD45, localizada na membrana plasmática e nos grânulos secretórios (*Cui et al., 1994*) e a tirosina fosfatase 1 contendo homologia Src (SHP-1) também conhecida como proteína tirosina fosfatase 1C (PTP1C) localizada no citosol da célula (*Brumell et al., 1997*).

1.4.1 CD45

A CD45 constitui uma família de glicoproteínas de alto peso molecular e são expressas, unicamente, em células nucleadas hematopoiéticas. Ela possui um domínio extracelular amino-terminal, uma única região de transmembrana e, um domínio citoplasmático contendo domínios altamente conservados, com atividade de tirosina fosfatase (figura 8) (*Trowbridge et al., 1991; Brady-Kalnay & Tonks, 1995*).

Figura 8: Representação esquemática da estrutura da CD45. O sistema de numeração utilizado é para a CD45R (ABC) de camundongo ou para a isoforma da célula B da CD45. As regiões A, B e C são segmentos extra (resíduos 8-50, 51-99 e 100-146, respectivamente) codificados por uma ligação alternativa de exons 4, 5 e 6. O domínio externo (resíduos 1-541) a região transmembranar (resíduos 542-563) e o domínio citoplasmático (resíduos 564-1268) estão representados (*Trowbridge et al., 1991*).

A regulação da atividade funcional da CD45 pode ser feita por interações ou modificações pós-traducionais, tanto de seu domínio extracelular, como de seu domínio citoplasmático (*Okumura & Thomas, 1995*). O domínio extracelular, altamente glicosilado, possui semelhanças estruturais com receptores tirosina quinases para fatores de crescimento, acreditando-se que sua regulação se dá através de sua ligação a ligantes, como os fatores de crescimento e interleucinas, resultando em sua fosforilação em resíduos de tirosina e subsequente ativação (*Trowbridge et al., 1991; Okumura & Thomas, 1995*). Outro mecanismo que regula a função da CD45 envolve interações de seu domínio citoplasmático com outras proteínas. Por

exemplo, têm sido mostrado que a fosforilação em tirosina da CD45 pela p50^{csk} cria um sítio de ligação na fosfatase para o domínio de homologia src 2 (SH2) da p56^{lck}.

CD45 pode exercer um controle sobre a adesão celular através da interação de seu domínio extracelular com ligantes, resultando na ativação de cascatas de sinalização que regulam a adesão dependente de integrina. A CD45 pode também ligar-se, diretamente, a proteínas que modulam a adesão celular (Brady-Kalnay & Tonks, 1995). Cui *et al.* (1994) demonstraram que após a ativação de neutrófilos com sobrenadante de cultura de bactérias, há a migração da forma cataliticamente ativa da CD45 localizada nos grânulos específicos para a membrana plasmática, seguida de sua união, neste local, aos componentes inativos da enzima.

1.4.2 SHP-1

A tirosina fosfatase 1 contendo homologia src 2 (SHP-1) também conhecida como proteína fosfatase 1C (PTP1C) fosfatase celular hematopoiética, PTP-N6 e SHPTP-1 é expressa, predominantemente, nas células hematopoiéticas e, contém dois domínios SH2 amino-terminais e um domínio com atividade de tirosina fosfatase (figura 9) (Streuli, 1996). Domínios SH2 contém regiões altamente conservadas envolvidas na ligação em resíduos de fosfotirosina, ou na formação de núcleos hidrofóbicos. Estudos têm mostrado que os domínios SH2 da PTP1C ligam-se a receptores fosforilados do fator de crescimento epidermal (EGFR) e da interleucina-3 (IL-3) *in vitro*, resultando na

fosforilação em resíduo de tirosina da fosfatase e subsequente regulação da atividade de catalítica da mesma (Feng & Pawson, 1994).

Figura 9: Estrutura da PTP1C, que contém dois domínios SH2 e um domínio da atividade de tirosina fosfatase (PTPase) (Feng & Pawson, 1994).

Alguns possíveis mecanismos de ação da PTP1C sobre a cascata de sinalização celular, tem sido demonstrados: (a) PTP1C liga-se através de seu domínio SH2 a um sítio fosforilado em tirosina de um fator de crescimento e, defosforila outro sítio fosforilado em tirosina do mesmo fator de crescimento; (b) a ligação de PTP1C ao fator de crescimento pode fazer com que a fosfatase aja em outra fosfoproteína contendo SH2, que também está ligada ao fator de crescimento; (c) PTP1C, através de seus sítios fosforilados em tirosina, pode se ligar a outras fosfoproteínas solúveis contendo SH2, as quais tornam-se alvo para a ação da PTP1C, e (d) PTP1C pode se ligar, através de seus domínios SH2, a outras proteínas que estão fosforiladas em resíduos de tirosina e, defosforilá-las (Feng & Pawson, 1994).

Entretanto, pouco se sabe sobre o papel da PTP1C na regulação das respostas antimicrobianas de neutrófilos. Nas células não estimuladas, a enzima é encontrada predominantemente no citosol. A estimulação com éster de forbol ou com estímulos particulados induz o deslocamento da PTP1C para o citoesqueleto. Estes agonistas inibem a atividade de tirosina fosfatase da enzima, contribuindo para o acúmulo de proteínas fosforiladas em tirosina e ativação dos neutrófilos. A

inibição da atividade da PTP1C é ocasionada por sua fosforilação em resíduos de serina e treonina catalisada, provavelmente, pela PKC (*Brumell et al., 1997*).

1.5 Proteínas serina/treonina fosfatases

Foram identificadas, em células de eucariotos, quatro principais classes de proteínas serina treoninas fosfatases (PSPs). As fosfatases tipo 1 (PP1) são proteínas particuladas, defosforilam, especificamente, a subunidade β da fosforilase quinase, podendo ser inibidas pelas proteínas inibidor-1 e inibidor-2. Por sua vez, as proteínas fosfatases tipo 2 (PP2A, PP2b, PP2C) citosólicas, defosforilam a subunidade α da fosforilase quinase e não são reguladas pelos inibidores 1 e 2 (*Cohen & Cohen, 1989*).

A PP1, em células do músculo esquelético de mamíferos, está associada, na sua forma ativa, a partículas de glicogênio, miofibrilas e ao retículo endoplasmático (*Cohen & Cohen, 1989*).

A PP2A parece ser a principal proteína serina/treonina fosfatase nas células eucarióticas que regula, negativamente, as quinases ativadas. Existem muitas evidências que a atividade da PP2A é regulada por sinais extracelulares durante o ciclo celular (*Millward et al., 1999*). A PP2A está implicada na regulação do metabolismo celular, replicação do DNA, transcrição, tradução, progressão do ciclo celular, morfogênese, desenvolvimento e transformação (*Wera & Hemmings, 1995*).

1.5.1. Estrutura da PP2A

A subunidade catalítica (C) da PP2A pode se complexar com uma variedade de subunidades regulatórias, modulando, desta maneira, sua atividade, especificidade e localização celular. A subunidade C é uma subunidade regulatória de 65 kDa denominada de PR65 e, está complexada a uma subunidade denominada, subunidade A. A função da subunidade PR65 é a de recrutar subunidades regulatórias adicionais, como a subunidade PR55 ou subunidade B, a subunidade PR61 ou subunidade B' e a subunidade PR72 ou subunidade B'' (figura 10) (Millward *et al.*, 1999).

Figura 10: Holoenzimas da proteína fosfatase 2A (PP2A) de mamíferos. A subunidade catalítica (C) está ligada constitutivamente à subunidade A de suporte (A ou PR65). Este heterodímero pode, adicionalmente, complexar com uma outra subunidade regulatória B, cuja ligação ao núcleo dimérico parece ser mutuamente exclusivo. Existem duas isoformas da subunidade C (α e β) e duas isoformas da PR65 (α e β). Tem sido identificadas três isoformas da PR65 (α , e as isoformas específicas cerebrais β e γ). Cinco genes codificam os membros da família PR61 (também conhecida como B' ou B56) e alguns transcritos sofrem ligação alternativa para produzir mais de 11 isoformas. A família B'' compreende as subunidades de 72 kDa (PR72) e a de 130 kDa (PR130) que são geradas por ligação alternativa de um único gene, bem como, PR59, o produto de um gene estritamente relacionado (Millward *et al.*, 1999).

1.5.2 Regulação de quinases pela PP2A

1.5.2.1 Regulação da proteína quinase C

Uma propriedade importante da PKC é sua auto-regulação negativa em resposta a um estímulo prolongado, processo que envolve tanto defosforilação para produzir uma forma inativa, como degradação proteolítica (Borner *et al.*, 1989). Foi demonstrado que um trímero da PP2A, que contém a subunidade PR55, tem a capacidade de inativar a isoforma α da PKC *in vitro* (Ricciarelli & Azzi, 1998). O tratamento das células com ambos inibidores de PP2A, ácido okadaico e caliculina A, preveniu a defosforilação da PKC α . Estes autores mostraram também que o α -tocoferol pode se ligar, diretamente, a PP2A, ativando-a, *in vitro*.

1.5.2.2 Regulação de quinases dependentes de Ca²⁺ e calmodulina

O Ca²⁺ pode ativar cascatas de quinases através da ligação ao seu receptor intracelular, calmodulina (CaM) e aos domínios regulatórios de diversas isoformas da PKC. As quinases dependentes de Ca²⁺/calmodulina (CaM quinases) são ativadas pela ligação ao complexo Ca²⁺-CaM, mas dependem, também, de fosforilação. A PP2A pode defosforilar *in vitro* preparações ativadas de CaM quinase I, de CaM quinase II e de CaM quinase IV. A enzima pode também defosforilar a própria CaM, que existe como muitas formas diferentemente fosforiladas (Millward *et al.*, 1999).

1.5.2.3 Regulação da cascata das MAP quinases

Numerosas observações sugerem que PP2A desempenha um papel importante na regulação negativa da via das MAP quinases. A PP2A, *in vitro*, pode defosforilar e inativar MEK1 e quinases da família ERK, sendo que este efeito pode ser revertido pelo tratamento com ácido okadaico (*Anderson et al., 1990; Gomez & Cohen, 1991*). Embora, PP2A possa defosforilar, *in vitro*, as MAP quinases ativadas por estresse, p38 e JNK1, a PP2C é, provavelmente, mais importante na regulação negativa intracelular das vias das ERKs. A super-expressão da PP2C diminui a atividade, estimulada por estresse, das SEK1, MKK3, MKK6 e MKK7 nas células transfectadas, mas não afeta a atividade basal ou estimulada, por fator de crescimento, da MEK1 (*Hanada et al., 1998*).

1.6 Modulação redox das vias de sinalização celular

Já está bem estabelecido que os processos de sinalização celular iniciam-se a partir de associações não-covalentes de hormônios, fatores de crescimento, citocinas, produtos bacterianos, entre outros, com receptores de membrana e proteínas intracelulares. Entretanto, um número crescente de trabalhos tem mostrado que o estado redox geral da célula desempenha um importante papel nos mecanismos desencadeados por essas moléculas. O estado redox intracelular, que é controlado principalmente, pela glutatona reduzida (GSH) e,

que reflete um balanço entre os níveis de sulfidrilas e dissulfetos, pode ser alterado por ERO e outros oxidantes (Meister & Anderson, 1983).

Alterações no estado redox intracelular irão alterar a atividade de uma variedade de enzimas. Por exemplo, todas as proteínas tirosina fosfatases possuem um resíduo de cisteína conservado em seu domínio catalítico, que precisa ser mantido na sua forma reduzida para a atividade ótima da enzima (Stan & Dixon, 1994). A tabela 1 mostra algumas moléculas sinalizadoras que são reguladas pelo estado redox celular (Kamata & Hirata, 1999).

1.6.1 Fontes extra- e intracelulares de oxidantes

As espécies reativas de oxigênio (ERO) como H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$ e $\text{OH}^\bullet$, podem ser produzidas por diversos sistemas intracelulares (figura 11) (Kamata & Hirata, 1999). O metabolismo energético celular baseia-se na produção mitocondrial de moléculas de adenosina trifosfato (ATP) resultante de uma cadeia de reações de transferência de elétrons, onde o aceptor final é o O_2 , com produção de H_2O . Durante as sucessivas reduções do O_2 , há a formação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 e, ao redor de 1 a 2% dessas ERO, podem extravasar da mitocôndria para outros compartimentos celulares (Boveris & Chance, 1973). Outra cadeia de transporte de elétrons é a do retículo endoplasmático que pode gerar $\text{O}_2^{\bullet-}$ através do citocromo P450 (Cross & James, 1991).

Tabela 1: Moléculas sinalizadoras reguladas pelo estado redox das células.

Molécula sinalizadora	Efeito dos oxidantes
1. Proteínas tirosinas quinases Receptor de EGF, receptor de insulina, receptor de PDGF Src, Lck, Fyn, ZAP-70, Syk, Lyn, Fgr, Hck, Btk, Ltk	Ativação
2. Proteínas tirosinas fosfatases Os resíduos de cisteínas reduzidos são essenciais	Inativação
3. Proteínas serina/treonina quinases MAP quinase, JNK, p38, BMK1, Akt, S6 quinase, PKC	Ativação (Ativação/inativação)
4. Proteínas serina/treonina fosfatases PP1, PP2A, calcineurina	Inativação
5. Proteínas G pequenas Ras	Ativação
6. Lipídios sinalizadores PLC, PLD, PLA ₂ , PI 3-quinase	Ativação
7. Sinalização por Ca ²⁺ Receptor de Ins(1,4,5)P ₃ , receptor de rianodina, Ca ²⁺ -ATPase, bomba de Ca ²⁺ /Na ⁺	Ativação
8. Fatores de transcrição Ap-1 (c-Fos, c-Jun), NFκB (p50), Rel, USF, TTF-1, Gr, BPV1E2, NFI, Myb, NF-Y, p53, PEBP2/AML, Oct-2, Egr-1, BZLF1, Ets, GABP, receptor de Ah, ATF, CREB.	Inativação

Abreviações: EGF-fator de crescimento epidérmico; PDGF-fator de crescimento derivado de plaquetas; ZAP-poli-peptídeo associado a ζ de 70 kDa; JNK-c-jun quinase N-terminal; BMK1-"Big" MAP quinase; PP-proteína fosfatase; PLD-fosfolipase D; PLA₂-fosfolipase A₂; PI-fosfatidilinositol; Ins(1,4,5)P₃-inositol 1,4,5-trifosfato; AP-1-proteína 1 ativadora; USF-fator estimulatório "upstream"; TTF-1-fator-1 de transcrição da tireóide; GR- receptor de glicocorticóide; BPV1E2- vírus do papiloma bovino tipo 1 E2; NF-fator nuclear; PEBP2/AML-proteína ligadora do amplificador do vírus polioma/leucemia mielóide aguda; BZLF1-proteína ativadora de transcrição codificada no vírus Epstein-Barr; GABP-proteína ligadora de GA; ATF- fator de ativação de transcrição; CREB-proteína ligadora do elemento responsivo ao AMPc.

Figura 11: Vias metabólicas das espécies reativas do oxigênio (ERO). ERO, como H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ e $\cdot\text{OH}$ são produzidas nas células por diferentes vias. $\text{O}_2^{\cdot-}$ é gerado pelo extravasamento de elétrons da mitocôndria. $\text{O}_2^{\cdot-}$ também é produzido pela NADPH citocromo P450 redutase, hipoxantina/xantina oxidase, NADPH oxidase, lipoxigenase e ciclooxigenase. A superóxido dismutase converte $\text{O}_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e então H_2O_2 é degradado a H_2O pela glutatona (GSH) peroxidase e catalase. Tirodoxina (TRX) tem atividade redutora de H_2O_2 , bem como, uma função de recuperação de proteínas oxidadas. H_2O_2 reagindo com $\text{O}_2^{\cdot-}$ produz que é altamente reativo, pela reação de Haber-Weiss. ERO também são produzidas por radiação ionizante (Kamata & Hirata, 1999).

Outros complexos enzimáticos geradores de $\text{O}_2^{\cdot-}$ são a hipoxantina/xantina oxidase, a NADPH oxidase, a lipoxigenase e a ciclooxigenase. Na presença de íons de cobre ou férricos, pode haver a produção de radicais $\cdot\text{OH}$, pela reação de Haber-Weiss, utilizando mecanismo descrito por Fenton. Fontes exógenas de ERO que podem atingir as células são os raios γ e a radiação ultravioleta (UV).

Sistemas de inativação dessas ERO, também estão presentes nas células. A superóxido dismutase (SOD) converte $\text{O}_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , que poderá, então, ser degradado a H_2O por outras enzimas, como a catalase e a glutatona peroxidase.

(Meister & Anderson, 1983). A tiredoxina (TRX) é uma pequena proteína multifuncional que possui um grupo disulfeto/ditiol em seu sítio ativo conservado, dando a esta molécula a capacidade de reduzir ERO e proteínas oxidadas. A TRX oxidada é restaurada pela TRX redutase (Mitsui et al., 1992).

Espécies reativas de nitrogênio (ERN) como $\text{NO}^\bullet$, $\text{ONOO}^{\bullet-}$ e NO^+ são originadas nas células a partir da produção de $\text{NO}^\bullet$, catalisada pelas duas isoformas da NO sintase, a constitutiva e a induzida (Moncada & Higgs, 1993). O $\text{NO}^\bullet$, também, pode ser gerado a partir de nitratos orgânicos e outros doadores de $\text{NO}^\bullet$. Nas células endoteliais, o $\text{NO}^\bullet$ é produzido pela ação da NO sintase constitutiva e, tem como função ativar a guanilato ciclase das células do músculo liso, promovendo seu relaxamento. Por outro lado, o $\text{NO}^\bullet$ produzido pelos fagócitos resultante da atividade da NO sintase induzida, tem uma ação citotóxica (Ignarro et al., 1981).

1.6.2 Ação de oxidantes sobre tirosina quinases e fosfatases

Foi demonstrado que oxidantes como H_2O_2 e vanadato e, o produto da mistura de ambos, o pervanato, induzem a ativação do receptor para insulina, através do aumento da fosforilação em tirosina, resultando no aumento do transporte e da utilização de glicose e, também, na lipogênese (Czech et al., 1974; May & Haen, 1979). H_2O_2 , UV e o agente alquilante iodoacetamida induzem a fosforilação dos receptores de EGF e de PDGF, estimulando o crescimento celular (Burdon & Rice-Evans, 1989; Gallagher et al., 1993). H_2O_2 também induz a associação do complexo Shc-Grb2-Sos com o receptor de EGF (Rao, 1996).

Além dos receptores tirosina quinases, muitas outras tirosina quinases citossólicas, como a c-Src, são ativadas por estresse oxidativo (Abel *et al.*, 1997). H_2O_2 , pervanadato e UV induzem a fosforilação em tirosina de Lck (Nakamura *et al.*, 1993) e de Fyn (Secrist *et al.*, 1993).

A atividade das PTPs também é afetada pelo estado redox intracelular. Agentes oxidantes, como a diamida e H_2O_2 , inibem a atividades dessas fosfatases em células HER14, através da oxidação de resíduos de cisteína, localizados em seu domínio catalítico (Monteiro *et al.*, 1991; Sullivan *et al.*, 1994).

O NO^* , por sua vez, pode agir como um promotor do crescimento celular ou como um agente antiproliferativo, dependendo da célula e de sua concentração (Garg & Hassid, 1989; Ziche *et al.*, 1994). NO^* e seus derivados podem reagir com grupos sulfidrilas produzindo S-nitrosotióis, tendo como alvo proteínas que contém grupos sulfidrilas (proteínas quinases; fosfatases; fatores de transcrição) (Stamler, 1994).

Experimentos utilizando doadores exógenos de NO^* , nitroprussiato de sódio (SNP) e S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), mostraram que estes compostos foram capazes de ativar Ras em células T humanas (Lander *et al.*, 1995). A ação foi direta e reversível e, foi devida à S-nitrosilação de um resíduo de cisteína crítico, que estimulou a troca de nucleotídeo guanina. Adicionalmente, foi mostrado um efeito direto destes doadores de NO^* na fosforilação/defosforilação em tirosina de receptores de EGF de células HER14 transfectados em fibroblastos murina (Peranovich *et al.*, 1995).

Os efeitos do NO^{*} sobre as proteínas tirosinas fosfatases (PTPs) descritos na literatura são contraditórios. Esta molécula mostrou estimular a atividade das PTPs em linfócitos e inibir a mesma, em fibroblastos (*Monteiro & Stern, 1996*).

1.6.3 Ação de oxidantes sobre serina/treonina quinases e fosfatases

As ERO ativam proteínas quinases da cascata das MAP quinases através de um mecanismo dependente de Ras (*Rao, 1996; Guyton et al., 1996*). Adicionalmente, mostrou-se que H₂O₂ e outras ERO, produzidas endogenamente pela ação de UV e os ésteres de forbol, estimulam a atividade de MAP quinases em células NIH-3T3 e, em células do músculo liso, através da indução de sua expressão gênica (*Stevenson et al., 1994; Rao et al., 1993*).

A regulação da atividade da PKC por oxidantes é mais complexa, pois estes podem ter tanto um efeito estimulatório como inibitório, dependendo do domínio estrutural da enzima atingido. O tratamento de células com H₂O₂, resulta num aumento da atividade da enzima (*Whisler et al., 1995; Brawn et al., 1995*). Estudos mais recentes, mostraram que H₂O₂ provoca um aumento da fosforilação da PKC, que se correlaciona com o aumento da atividade da mesma (*Konishi et al., 1997*). A utilização da enzima purificada, mostrou que a modificação oxidativa no domínio regulatório amino-terminal, que contém uma estrutura zinco-tiolato, gera uma PKC ativada (*Gopalakrishna & Anderson, 1989*), enquanto que a oxidação do domínio catalítico carbo-terminal, resulta na inativação da quinase (*Gopalakrishna & Anderson, 1987*).

Num estudo mais recente Gopalakrishna *et. al.* (1993) mostraram que agentes geradores de NO[•] diminuem a atividade da PKC. Esta inativação é bloqueada pelo sequestrador de NO[•] oxihemoglobina ou revertido pelo antioxidante ditioneitol (DTT). Provavelmente, a ação do NO[•] se dá através da s-nitrosilação de tióis, formando pontes de dissulfetos oxidados.

As serina/treonina fosfatases também são reguladas por oxidantes. Estudos *in vitro* mostraram que a oxidação de tióis das proteínas fosfatases 1 e 2A, inibe suas atividades (Nemani & Lee, 1993). Num trabalho posterior, Fialkow *et al.* (1994) mostraram que H₂O₂ e diamida induzem a ativação das MAP quinases, ERK1 e ERK2, aumentando sua fosforilação em resíduos de tirosina e treonina, através da ativação de MEK. Esta ativação é potencializada pela inibição da fosfatase CD45 pelos oxidantes, mostrada neste mesmo trabalho.

1.7 Vitamina E

1.7.1 Estrutura Química

O termo vitamina E abrange a família dos tocoferóis e dos trocotrienóis. Eles são constituídos de um anel cromanol hidrofílico (função álcool) e de uma cadeia lateral fitil hidrofóbica (cadeia carbônica ramificada). A vitamina E é uma molécula lipídica anfótera, classificada como lipídio polar de classe I. Nas membranas celulares, a molécula está orientada paralelamente aos fosfolipídios, com a cabeça hidrofílica situada na folha externa da bicamada lipídica. Nas

lipoproteínas, a vitamina E situa-se na superfície, como os fosfolipídios e o colesterol.

O composto natural da vitamina E mais abundante é o RRR- α -tocoferol. As formas α -, β -, γ - e δ -tocoferol diferem entre si pelo número e posição das metilas no anel cromanol (figura 12). A molécula apresenta 3 centros quirais, os quais lhe confere propriedades rotatórias sob a luz e permitem de definir os estereoisômeros (Burton, 1990).

1.7.2 Atividade Biológica

A propriedade antioxidante da vitamina E é devida ao seu grupamento hidroxila, o qual lhe confere a propriedade de doar um radical hidreto $H^\bullet$.

As reações de ácidos graxos polinsaturados (RH) são iniciadas pela retirada de um próton ou de um hidrogênio ligado a um carbono di-alílico ($-CH=CH-\underline{CH_2}-CH+CH-$), produzindo um radical $R^\bullet$. A adição de uma molécula de O_2 dará origem a um radical acil-peroxila ($ROO^\bullet$). Esta reação inicia a propagação em cadeia da oxidação de lipídios (lipoperoxidação) pois o $ROO^\bullet$ irá se transformar em hidroperóxido ($ROOH$) através da retirada de um próton de um novo ácido graxo ($RH \rightarrow R^\bullet$).

A vitamina E age como um bloqueador desta cadeia de reações peroxidativas, cedendo o radical $H^\bullet$ de sua função OH, estabilizando, desta maneira, o $ROO^\bullet$ que se transforma em $ROOH$. Esta reação resultará na formação de um radical estável da vitamina E, o tocoferoxil (vit E- $O^\bullet$). A afinidade da vitamina E pelo radical $ROO^\bullet$ é bem superior a dos ácidos graxos, sendo sua

função antioxidante eficaz, mesmo na proporção de uma molécula de vitamina E por 1000 moléculas de fosfolipídios (Léger, 1992). O radical vitE-O[•] pode ser reduzido novamente a vit E-OH pelo ácido ascórbico (vitamina C). A ausência de níveis adequados de ácido ascórbico, pode conferir à vitamina E um papel pró-oxidante (Kagan *et al.*, 1992).

1.7.3 Papel estrutural

As membranas lipídicas têm a propriedade de se organizar em diferentes tipos de fases, caracterizadas por níveis diferentes de organização, de fluidez e de difusão lateral. Na fase “gel sólida” (L_β) há pouca mobilidade dos ácidos graxos, devido às numerosas interações hidrofóbicas entre eles. Enquanto que na fase “cristal líquida” (L_α) as interações cooperativas são menores, possibilitando uma maior mobilidade lipídica. A passagem de uma fase a outra, pode ser resultante de uma mudança de temperatura, da presença de certos grupamentos químicos, ou ainda da introdução de um novo composto químico. A insaturação das cadeias de ácidos graxos favorece a fase L_α. Estudos, utilizando sondas paramagnéticas, mostraram que o α-tocoferol e o colesterol exercem um efeito “tampão” sobre as bicamadas de fosfolipídios saturados, aumentando a desordem da fase L_β e a ordem da fase L_α (Srivastava *et al.*, 1989; Léger, 1992). A atividade da vitamina E depende de sua mobilidade intramembranar, sendo que sua velocidade de difusão lateral, através dos ácidos graxos na fase L_α, é 100 vezes maior do que na fase L_β (Léger, 1992).

Figura 12: Estrutura química dos tocoferóis e tocotrienóis.

1.7.4 Metabolismo

1.7.4.1 Absorção intestinal

Em razão de sua natureza lipídica, a absorção da vitamina E é realizada de maneira semelhante aos lipídios, necessitando para tal, das lipases digestivas, produzidas pelo pâncreas e, dos sais biliares, originários do fígado. A absorção intestinal da vitamina E é pequena em relação à quantidade ingerida, variando entre 5 a 30%, dependendo da natureza do alimento e da forma ingerida (esterificada ou livre) (Thakur & Srivastava, 1996).

1.7.4.2 Transporte sanguíneo para o fígado

Após a absorção intestinal, a vitamina E integra-se aos quilomicrons e, nesta forma, ela é liberada dentro da linfa e depois, para a circulação sanguínea. Os quilomicrons são partículas lipídicas grandes, ricas em triglicerídios, contendo também apoproteínas do tipo A e a apoB 48, que são sintetizadas pelos enterócitos. A incorporação da vitamina E nos quilomicrons, após sua absorção pelo trato gastrointestinal é observada nas primeiras 6 horas e, os níveis basais retornam ao normal, após 12 horas da ingestão (figura 13) (*Burton, 1990*).

1.7.4.3 Receptor hepático

A vitamina E é integrada à lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) a qual é sintetizada pelo fígado, a partir de lipídios dos quilomicrons e da apoB-100 (*Cogny et al., 1994*). Tem sido confirmada a existência de uma proteína de transferência do RRR- α -tocoferol, a qual já foi purificada e clonada (*Arita et al., 1995*). Uma mutação em seu gene, causa uma deficiência familiar (carência idiopática) de vitamina E rara (*Traber et al., 1990*). Assim, o fígado exerceria uma discriminação entre as formas de tocoferóis α , β , γ e δ e entre os isômeros RRR e SRR do α -tocoferol, em favor do RRR- α -tocoferol. A proteína de transporte do RRR- α -tocoferol regula a quantidade máxima de vitamina E plasmática a ser absorvida, dependendo da quantidade hepática da proteína. Desta maneira, a concentração máxima de vitamina E plasmática pode ser aumentada de no máximo três vezes (*Traber, 1994*).

A vitamina E permanece nas partículas lipídicas durante a remodelagem das VLDL em lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e, depois, em lipoproteínas de baixa densidade (LDL). A proteína de transferência de lipídios plasmáticos (PLTP: plasma lipid transfer protein) facilita as mudanças do α -tocoferol para as diferentes classes de lipoproteínas (Kostner *et al.*, 1995). A vitamina E encontra-se principalmente nas partículas de LDL e HDL (Cogny *et al.*, 1994).

1.7.4.4 Localização tissular e celular

A vitamina E está distribuída nos diferentes órgãos, na seguinte ordem decrescente de concentração: fígado, músculos esqueléticos, tecido adiposo, pulmões e baço. No sangue, as hemácias e as plaquetas são as células mais ricas em vitamina E. Esta, por sua vez, penetra nas células por intermédio das LDL e do receptor apoB/E. A transferência para as células pode ser feita também a partir dos quilomicrons e das VLDL, após a ação da lipoproteína lipase (Traber *et al.*, 1985).

Existem poucos estudos referentes à localização subcelular da vitamina E. Entretanto, devido ao seu caráter lipofílico, sua localização é, preferencialmente, no ambiente fosfolipídico das membranas. Sakamoto *et al.* (1990) demonstraram que em macrófagos de ratos, ela se encontra, em sua totalidade, na membrana. Por outro lado, foi demonstrado que nas células do músculo liso vascular, o α -tocoferol está associado a uma proteína citosólica, mas unicamente na fase G1 do ciclo celular (Nalecz *et al.*, 1992). Este receptor citosólico da vitamina E existiria somente nas células do músculo liso e não nos fagócitos.

Figura 13: Biodisponibilidade da vitamina E.

1.7.5 Efeitos da vitamina E na fisiologia das células sangüíneas e vasculares

1.7.5.1 Plaquetas

Durante os anos 70, a vitamina E foi testada como um agente antiagregante e inibidor da liberação de produtos de ativação plaquetária (Kurokawa *et al.*, 1971; Steiner & Anastasi, 1976). A adesão e a agregação plaquetária na presença de PMA, ADP, ácido araquidônico, foram inibidas pela adição de

vitamina E em plaquetas *in vitro* (Freedman et al., 1996) ou *in vivo* (Freedman et al., 1996; Calzada et al., 1997, Jandak et al., 1989).

1.7.5.2 Fagócitos

Estudos de Baehner et al. (1977) mostraram os efeitos da suplementação oral de vitamina E em humanos sobre as funções de PMN. Eles observaram que nos indivíduos suplementados, os PMN apresentaram um atividade fagocítica aumentada e, uma atividade microbicida diminuída em relação aos indivíduos controle.

Outros estudos mostraram, em fagócitos, uma produção de $O_2^{\bullet-}$ diminuída em indivíduos que receberam 1200 UI de vitamina E por dia, durante 8 semanas (Devaraj et al., 1997). O efeito inibidor da vitamina E sobre a produção de $O_2^{\bullet-}$ também foi observada em macrófagos de ratos estimulados por PMA (Sakamoto et al., 1990) mas não de macrófagos estimulados por concavaliina A (Yano & Ichikawa, 1993) nem de PMN humanos estimulados com zymosan opsonizado (Okano et al., 1991).

Adicionalmente, a incubação *in vitro* de neutrófilos peritoneais de ratos, estimulados por PMA, com concentrações crescentes de vitamina E, mostrou uma inibição dose-dependente da produção de $O_2^{\bullet-}$ por estas células (Kanno et al., 1995).

1.7.5.3 Células endoteliais

O tratamento de células endoteliais aórticas com vitamina E aumenta sua sobrevivência e diminui a produção de IL-1 por estas células, após um estresse oxidante (Martin *et al.*, 1996).

O α -tocoferol estimula a produção de prostaciclina PGI₂ pelas células endoteliais (Tran & Chan, 1990; Huang *et al.*, 1988) ou provoca um aumento adicional desta, quando as células são tratadas com ácido araquidônico ou soro (Kunisaki *et al.*, 1992). A atividade do ativador tissular de plasminogênio é inibida e, os níveis de fator de Von Willebrand plasmáticos são diminuídos pelo α -tocoferol (Huang *et al.*, 1988).

Em células endoteliais humanas estimuladas por IL-1, trombina ou PMA, o α -tocoferol inibe a adesão de monócitos e a expressão da E-selectina (Faruqi *et al.*, 1994). O pré-tratamento de células endoteliais com vitamina E causa uma diminuição da produção das moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1 e da aderência de monócitos a estas células, na presença de LDL oxidada ou nativa (Cominacini *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1997). Recentemente, foi demonstrado que a adesão de neutrófilos humanos, estimulados por fMLP ou LDL oxidada, às células endoteliais HUVECs, é diminuída pelo α -tocoferol (Yoshida *et al.*, 1999).

1.7.5.4 Células do músculo liso

Trabalhos do grupo de A. Azzi mostraram uma inibição pelo α -tocoferol da proliferação das células do músculo liso aórtico, estimuladas por SVF, LDL, PDGF

ou endotelina (Boscoboinik et al., 1991; Ozer et al., 1993; Azzi et al., 1995). A proliferação das células do músculo liso induzidas por LDL oxidada e pela lisofosfatidilcolina é inibida pela vitamina E (Lafont et al., 1995; Chai et al., 1996).

A suplementação oral de coelhos hipercolesterolêmicos com vitamina E é capaz de prevenir o acúmulo de lipídios e a formação de células espumosas, além de normalizar as estruturas subcelulares das células musculares lisas, afetadas pela sobrecarga de colesterol (Sirikçi et al., 1996).

1.7.6 Efeitos da vitamina E na atividade da PKC

Em células musculares lisas vasculares, A7r5, a proliferação celular e a atividade da PKC são inibidas pelo α -tocoferol, mas não pelo β -tocoferol, trolox ou BHT (Boscoboinik et al., 1991). Adicionalmente, o β -tocoferol tem a capacidade de anular os efeitos do α -tocoferol sobre as células, quando os dois compostos são adicionados simultaneamente (Tasinato et al., 1995).

O α -tocoferol, *in vitro*, também inibe a atividade da PKC em células endoteliais aórticas (Keaney et al., 1996) e em plaquetas (Freedman et al., 1996).

Em monócitos humanos, a atividade da PKC é fortemente inibida pela incubação *in vitro* com α -tocoferol. A inibição foi menos intensa com o β -tocoferol e, o trolox não mostra nenhum efeito sobre a atividade da enzima (Cachia et al., 1998). A vitamina E administrada *in vivo*, também apresentou propriedades inibitórias sobre a atividade da PKC de macrófagos peritoneais de ratos, estimulados com PMA (Sakamoto et al., 1990). Ambas as inibições, dos monócitos e

dos macrófagos, são acompanhadas de uma diminuição da produção de superóxido por estas células.

O deslocamento da PKC para membrana de células musculares lisas estimuladas por PMA, não é inibido pela incubação *in vitro* com α -tocoferol. Entretanto, num meio em rico em glicose, o α -tocoferol inibe a migração da PKC dessas células (Kunisaki *et al.*, 1994). A migração da PKC também é inibida pela vitamina E em células humanas eritroleucêmicas HEL e na linhagem megacarioblástica Meg-01 (Steiner *et al.*, 1997).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo estudar a ação do α -tocoferol na ativação da NADPH oxidase de neutrófilos sangüíneos humanos, bem como nas vias de sinalização envolvidas nesta ativação.

Realizamos para isto, a incorporação *in vitro* do α -tocoferol nas membranas dos neutrófilos humanos isolados e estudamos seu efeito na função microbicida destas células e na produção de oxidantes pelas mesmas. Estudamos, em seguida, a ação da vitamina E nas duas vias de sinalização envolvidas na ativação da NADPH oxidase, a via dependente de PKC e a independente de PKC. Este estudo foi realizado através da utilização de inibidores específicos, de PKC, de proteínas tirosina quinases e de proteínas fosfatases. Foram realizadas, também as medidas diretas da atividade da proteína quinase C e da atividade de tirosina fosfatases, além da determinação dos níveis de fosforilação de resíduos de tirosina em proteínas.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Os reagentes Hystopaque-1077, dextran, cloreto de sódio, glicose, glicerol, cloreto de magnésio, cloreto de cálcio, cloreto de manganês, succinato de α -tocoferol (AT), ácido ascórbico, albumina bovina, SDS, azul de bromofenol, poliacrilamida, corante de May-Grunwald, corante de Giemsa, luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona), PMA (phorbol-12-miristate-13-acetate), zymosan A, tris-HCl, tris-base, glicina, proteína A-sepharose CL4B, TEMED, ponceau red, Triton X-100, β -mercaptoetanol, EDTA, EGTA, ortovanadato de sódio, fluoreto de sódio, pirofosfato de sódio e PMSF foram obtidos da SIGMA Chemical Co. (St. Louis, MO).

Trolox[®] foi obtido da Aldrich (Milwaukee, WI).

Os solventes utilizados, etanol, metanol, hexano, acetona, dimetilsulfóxido, foram obtidos da MERCK (Darmstadt, Alemanha).

Membranas de nitrocelulose, padrões de peso molecular, reagente de Bradford e Tween-20, foram adquiridos da BIO-RAD (Hercules, CA).

O kit BIOTRAK para a determinação da atividade de PKC e o sistema ECL de revelação de "Westernblot" foram adquiridos da Amersham Life Sciences (Buckinghamshire).

[γ ³²P]ATP foi obtido da New Life Science Products (Boston, MA).

Estaurosporina, genisteína e caliculina A foram obtidos da CALBIOCHEM.

O anticorpo monoclonal anti-fosfotirosina PY20 foi obtido da Transduction Laboratory (Lexington, KY) e, o anticorpo monoclonal mAB 108.1 anti-receptor de EGF foi gentilmente cedido pelo Dr. Joseph Schlessinger da New York University, USA.

3.2 Equipamentos

- Equipamento de HPLC Waters com detector eletroquímico
- Luminômetro BIO-ORBIT modelo 1251
- Banho termostatzado com agitação New Brunswick modelo G76
- Balança analítica Shimadzu Libror modelo AEG-220
- Medidor de pH Metrohm Herisau modelo E 520
- Agitador de tubos Mistral
- Microscópio óptico Zeiss
- Citocentrífuga INCIBRÁS
- Centrífuga refrigerada HIMAC modelo CR 20B2
- Agitador magnético com aquecimento Pyro-magnestir LAB-LINE
- Equipamento para eletroforese BIO-RAD
- Equipamento de transferência semi-seca Pharmacia Novablot system
- Cintilador Beckman modelo LS 5000 TD equipado com programa para contagem de fótons
- Sonicador de células Col Parmer Instrument Co., modelo 4710
- Secador de gel Life Technologies Inc. GD 40150

- Espectrofotômetro Beckman DU7400
- Densitômetro à laser LKB ultrascan
- Centrífuga Eppendorf 5415C

3.3 Obtenção dos neutrófilos sangüíneos humanos

Para a obtenção de neutrófilos foram colhidas amostras de sangue venoso heparinizadas (0,1 U.I./ml) de doadores voluntários sadios. Os neutrófilos foram isolados do sangue total, através de centrifugação em gradiente de densidade, utilizando Hystopaque-1077. Após a centrifugação, à 600 x g, por 20 minutos, à temperatura ambiente, o plasma foi retirado e a sedimentação dos eritrócitos foi feita através da resuspensão em Dextran, deixando as amostras em repouso por 30 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi separado e centrifugado à 600 x g, por 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado, restando um *pellet* constituído de eritrócitos e neutrófilos. A hemólise dos eritrócitos contaminantes foi realizada com água gelada, por 120 segundos, adicionando-se em seguida NaCl 2,7% e PBS (Boyum, 1968). Os neutrófilos obtidos, após centrifugação à 500 x g, por 15 minutos, à 4°C, foram lavados mais uma vez e resuspendidos com PBS adicionado de glicose (100 mg/ml), MgCl₂ (50 mM) e CaCl₂ (100 mM). A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer (>95% de neutrófilos) e o teste de viabilidade pelo método de azul de tripan (exclusão de corante).

3.4 Determinação da concentração de vitamina E incorporada à membrana dos neutrófilos

Os neutrófilos (2×10^6 células/ml) foram pré-incubados com concentrações crescentes de AT (0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 e 40 μ M) por 30 minutos, à 37°C, com agitação constante. Após este período, as suspensões foram centrifugadas à 600 x g, por 10 minutos, à 4°C e os *pellets* ressuspensos em 500 μ l de PBS. As amostras foram mantidas à -85°C até a realização da extração do α -tocoferol.

A extração do α -tocoferol das membranas dos neutrófilos foi realizada segundo a técnica descrita por Hatam & Kayden (1979). A suspensão de neutrófilos foi tratada com 2 ml de uma solução 1% de ácido ascórbico em etanol 100% e aquecida à 70°C por 2 minutos. Após o resfriamento em gelo, foram adicionados 1 ml de H₂O destilada e 4 ml de hexano. Os tubos foram agitados vigorosamente por 2 minutos e as fases separadas por centrifugação (5 minutos, 3000 rpm). Uma alíquota da fase do hexano (3 ml) foi retirada e colocada em tubo de vidro de 10 ml para a evaporação em N₂. As amostras foram ressuspensas em 100 μ l de metanol e, alíquotas de 20 μ l foram utilizadas para determinação por HPLC do pico relativo ao α -tocoferol (Lang *et al.*, 1986).

3.5 Determinação da atividade fungicida (*killing*) de neutrófilos sangüíneos

200 μ l da suspensão de neutrófilos (1×10^6 células/ml) foram incubadas com 10, 20 ou 40 μ l de AT, durante 30 minutos, à 37°C, com agitação constante. Células controle, sem o antioxidante, também foram incubadas nas mesmas

condições. Após este período, o ensaio foi realizado segundo técnica modificada por Zeligs (1981). Foram adicionados às suspensões de células, 200 µl de uma suspensão de cultura de 24 horas de *Candida albicans*, em NaCl 0,9% (7×10^6 leveduras/ml) e 200 µl de soro homólogo para a opsonização do microorganismo ("pool" de soro humano colhido no dia). Os tubos foram incubados à 37°C, durante 30 minutos sob agitação constante. Após o período de incubação, as lâminas foram obtidas através da citocentrifugação de 100 µl das amostras à 400 x g, durante 5 minutos. A coloração das lâminas foi realizada com corante de May-Grunwald-Giemsa modificado (Rosenfeld, 1947). As lâminas foram observadas em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes. A atividade fungicida foi avaliada através de um escore, onde foram contados os neutrófilos: (i) com apenas leveduras vivas em seu interior; (ii) com 1 a 2 leveduras mortas; (iii) com 3 a 4 leveduras mortas e: (iv) com mais de 4 leveduras mortas. Os valores obtidos de cada grupo em 100 neutrófilos contados foram multiplicados por 0, 1, 2 3, respectivamente e, finalmente somados, resultando no valor do escore. As leveduras vivas apresentaram coloração azul e as mortas apresentaram-se descoradas (Chan et al., 1998).

3.6 Determinação da produção de ERO/ERN por neutrófilos sangüíneos medida através da quimioluminescência (QL) amplificada por luminol

A luminescência é a emissão de luz por um processo não-térmico. No caso particular da quimioluminescência (QL) a luz é produzida através de uma reação química. As moléculas responsáveis pela emissão de luz absorvem energia

liberada por reações químicas e tornam-se excitadas. Neste estado, alguns elétrons periféricos da molécula vão para um nível energético mais alto. Perdendo energia, esses elétrons retornam a um nível energético mais baixo. Esta energia perdida é emitida como fótons e medida como luz (Trush *et al.*, 1978; Allen, 1986).

A QL ou emissão de fótons por neutrófilos ativados, quer pela fagocitose, quer por outros estímulos, foi descrita pela primeira vez por Allen *et al.* (1972). Os oxidantes produzidos por estas células irão oxidar substratos endógenos, formando intermediários de vida curta, com capacidade de emitir luz de baixa intensidade, denominada de QL nativa (Frizsche & De Weck, 1988).

Com o objetivo de aumentar a produção de luz, obtendo-se assim, uma reação de maior sensibilidade, o composto luminol (5-amino-2,-diidro-1,4-ftalazinediona) tem sido utilizado como um agente amplificador da QL produzida pelas células (Stevens, 1987). O mecanismo de reação do luminol baseia-se na sua oxidação a um intermediário que, subsequentemente, converte-se ao produto aminoftalato, com emissão de luz no espectro visível (450 nm) (Allen, 1986).

3.6.1 Estudo do efeito do α -tocoferol na produção de ERO/ERN por neutrófilos

Os neutrófilos (1×10^5 células/ml) foram incubados com 10, 20 ou 40 μ M de AT, à 37°C, por 30 minutos, com agitação constante. Células controle, sem o antioxidante, também foram incubadas com PBS, nas mesmas condições. Após a incubação das células, o ensaio de QL foi realizado, utilizando como estímulos do "burst" oxidativo dos neutrófilos, acetato de forbol miristato (PMA) (20 ng/ml) ou

partículas de zymosan opsonizadas (Zy) (100 partículas/célula). O luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona) (10^{-4} M) foi utilizado como amplificador da luz emitida. Os volumes dos tubos de reação foi levado a 1 ml com PBS, pH 7,4. A emissão de luz foi medida em um luminômetro BIO-ORBIT, modelo 1251, com agitação constante e temperatura controlada (37°C) (Easmon et al., 1980; Dechalet et al., 1982; Halstenssen et al., 1986). Os valores de QL foram expressos em mV/min/ 10^5 células.

3.6.2 Estudo comparativo dos efeitos do α -tocoferol, estaurosporina, genisteína e Trolox na produção de ERO/ERN por neutrófilos

Os neutrófilos (1×10^5 células/ml) foram incubados com AT (40 μM), com Trolox (40 μM), com estaurosporina (10 nM) ou com genisteína (100 μM) durante 30 minutos, a 37°C , sob agitação constante. Os estímulos utilizados para a ativação do “burst” oxidativo foram o PMA (20 ng/ml) e o Zy (100 partículas/célula). A técnica da medida da QL está descrita no item 3.6.1.

3.6.3 Estudo dos efeitos da caliculina A na na produção de ERO/ERN por neutrófilos

Neutrófilos (1×10^5 células/ml) foram incubados com diferentes concentrações de caliculina A (0,1, 5, 10 e 100 nM) por 10 minutos, a 37°C , sob agitação constante. Células controle, sem o inibidor também foram incubadas sob as mesmas condições. Os estímulos utilizados para a ativação do “burst”

oxidativo foram o PMA (20 ng/ml) ou o Zy (100 partículas/célula). A técnica da medida da QL está descrita no item 3.6.1.

3.6.4 Estudo dos efeitos da caliculina A sobre a ação inibitória do α -tocoferol na produção de ERO/ERN por neutrófilos

Neutrófilos (1×10^5 células/ml) foram incubados com AT (40 μ M) durante 30 minutos, a 37°C, sob agitação constante. Células controle, sem a vitamina, também foram incubadas nas mesmas condições. Após a incorporação da vitamina E, os neutrófilos foram incubados com diferentes concentrações de caliculina A (0,1, 5, 10 e 100 nM) por 10 minutos, a 37°C, sob agitação constante. Células controle, sem o inibidor, foram incubadas, com PBS, nas mesmas condições. Os estímulos utilizados para a ativação do “burst” oxidativo foram o PMA (20 ng/ml) e o Zy (100 partículas/célula). A técnica da QL está descrita no no item 3.6.1.

3.7 Determinação do padrão geral de fosforilação em resíduos de tirosina de proteínas de neutrófilos

3.7.1 Estudo do efeito do α -tocoferol nos níveis de fosforilação em tirosina de proteínas de neutrófilos

Os neutrófilos (2×10^6 células/ml) foram incubados com 10, 20 ou 40 μ M de AT, à 37°C, por 30 minutos, com agitação constante. Células controle, sem o antioxidante, também foram incubadas, com PBS, nas mesmas condições. Após este período, as células foram estimuladas ou não, com PMA (20ng), por 5 minutos, à 37°C, sob agitação constante ou, com Zy (100 partículas/célula) por 15 minutos, à 37°C, sob agitação constante. Em seguida, a lise dos neutrófilos foi realizada de acordo com a seguinte metodologia: após a centrifugação das amostras (600 x g, 10 minutos, 4°C) e retirada dos sobrenadantes, foram adicionados aos "pellets" 300 μ l de tampão de lise A (HEPES 20 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM; glicerol 10%; Triton X-100 1%; $MgCl_2$ 1,5 mM; EGTA 1 mM) adicionado de inibidores de proteases (aprotinina 1 μ g/ml; leupeptina 1 μ g/ml e PMSF 1mM) e de inibidores de fosfatases (ortovanadato de sódio 2 mM, fluoreto de sódio 50 mM e pirofosfato de sódio 10 mM). A sonicação das células foi realizada em sonicador da Cole Parmer Instrument Co., modelo 4710, utilizando 15% de potência em 3 ciclos de 10 segundos e descanso de 10 segundos entre cada ciclo (Nahas *et al.*, 1996). As amostras sonicadas foram centrifugadas (2400 x g, 5 minutos, 4°C) e o sobrendante foi retirado e mantido sob refrigeração à -

85°C, até o momento do ensaio. A concentração de proteína nos lisados foi determinada pela técnica de Bradford (*Bradford, 1976*).

Para a realização do "immunoblotting" foram misturadas 50 µg de proteína de cada amostra de lisado de neutrófilos com 50 µl de tampão de amostra 3 vezes concentrado (tris-HCl 150 mM, pH 6,84; β-mercaptoetanol 10%; SDS 4%; azul de bromofenol 0,2% e glicerol 20%). Estas misturas foram fervidas por 5 minutos, e separadas eletroforeticamente em gel de poliacrilamida-SDS 10%, "overnight", utilizando-se corrente de 8 mA. Após a corrida eletroforética, o gel foi transferido para matriz de nitrocelulose. A transferência foi efetuada em 2 horas, à 200 mA, em Tris-base 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,037% e metanol 20%. Para o bloqueio de possíveis anticorpos interferentes, o "blot" de nitrocelulose foi saturado com Tris 10 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM (TBS) e albumina bovina 5%, durante 2 à 4 horas, à temperatura ambiente. Após este período, foi realizada uma incubação, "overnight", do "blot" com anticorpos primários anti-fosfotirosina. Em seguida fez-se a lavagem do "blot" com TBS-Tween-20 0,1% (3 vezes) e, então, a incubação com anticorpo secundário associado à peroxidase de raiz forte (HRP) por 1 hora. Foram realizadas, novamente, 3 lavagens com TBS-Tween-20 0,1%, seguidas de incubação, por 1 a 2 minutos, com uma solução contendo luminol e fenóis (solução de revelação para o sistema ECL[®]) o qual tem a propriedade de impressionar filmes autoradiográficos. A revelação dos filmes autoradiográficos foi realizada na sala de revelação do Instituto do Coração do Hospital da Clínicas, São Paulo.

3.7.2 Estudo comparativo dos efeitos do α -tocoferol, estaurosporina, genisteína e Trolox nos níveis de fosforilação em tirosina de proteínas de neutrófilos

Os neutrófilos (2×10^6 células/ml) foram incubados com AT (40 μ M), com Trolox (40 μ M), com estaurosporina (10 nM) ou com genisteína (100 μ M) durante 30 minutos, à 37°C, sob agitação constante. Após a incubação das células, estas foram ativadas com PMA (20 ng) durante 5 minutos, ou com Zy (100 partículas por célula) por 15 minutos. As células foram, então, lisadas com tampão de lise A e a concentração de proteínas foi determinada pela técnica de Bradford (Bradford, 1976). A técnica de "Westernblot" com anticorpo antifosfotirosina utilizada no ensaio, está descrita no item 3.7.2.

3.8 Determinação da atividade da proteína quinase C (PKC) de neutrófilos

3.8.1 Efeito do α -tocoferol na atividade da PKC de neutrófilos

Os neutrófilos (1×10^6 células/ml) foram incubados com 10, 20 ou 40 μ M de AT, à 37°C, por 30 minutos, sob agitação constante. Células controle, sem a vitamina E, também foram incubadas, com PBS, nas mesmas condições. Para a determinação da atividade da PKC de lisados totais, a lise foi realizada de acordo com a técnica descrita no item 3.7.1, utilizando-se, entretanto, o tampão de lise B (50 mM de Tris, 5 mM de EDTA, 10mM de EGTA, 0,3 % β -mercaptoetanol, 50

$\mu\text{g/ml}$ de PMSF e 10 mM de benzamidina, pH 7,5). Em um grupo de experimentos foram adicionados ao tampão de lise, inibidores de fosfases (ortovanadato de sódio 2 mM, fluoreto de sódio 50 mM e pirofosfato de sódio 10 mM) e, em outro grupo, estes inibidores não foram adicionados. O ensaio da PKC foi realizado utilizando-se o kit BIOTRAK da Amersham LIFE SCIENCES. Foram utilizados no ensaio 10 μg de proteína do lisado de neutrófilos.

3.8.2 Estudo comparativo dos efeitos do α -tocoferol, da genisteína, estaurosporina e Trolox sobre a atividade da PKC

Neutrófilos (1×10^6 células/ml) foram incubados com AT (40 μM), Trolox (40 μM), genisteína (100 μM) ou estaurosporina (10 nM) durante 30 minutos, a 37°C, sob agitação constante. Células controle foram incubadas com PBS, sob as mesmas condições. Após o período de incubação, as células foram lavadas e ressuspensas em tampão de lise B, sem inibidores de fosfatases. As células foram, então, lisadas por sonicação e a concentração de proteína determinada pela técnica de Bradford. A atividade da PKC foi determinada usando o KIT BIOTRAK da Amersham LIFE SCIENCES (Buckinghamshire, UK).

3.8.3 Estudo dos efeitos da caliculina A na atividade da PKC de neutrófilos

Neutrófilos (1×10^6 células/ml) foram incubados com diferentes concentrações de caliculina A (0,1, 5, 10 e 100 nM) por 10 minutos, a 37°C, sob agitação constante. Células controle, sem o inibidor, também foram incubadas,

com PBS, nas mesmas condições. As células foram lavadas e ressuspensas em tampão de lise B, sem inibidores de fosfatases. As células foram, então, lisadas por sonicação e a concentração de proteína foi determinada pela técnica de Bradford. A atividade da PKC foi determinada usando o KIT BIOTRAK da Amersham LIFE SCIENCES (Buckinghamshire, UK).

3.8.4 Estudo dos efeitos da caliculina A sobre a ação inibitória do α -tocoferol na atividade de PKC de neutrófilos

Neutrófilos (1×10^6 células/ml) foram incubados com AT (40 μ M) por 30 minutos, a 37°C, sob agitação constante. Células controle, sem a vitamina, foram incubadas, com PBS, nas mesmas condições. Após a incorporação da vitamina E, as células foram lavadas e ressuspensas em tampão de lise B, sem inibidores de fosfatases. As células foram, então, lisadas por sonicação e a concentração de proteína foi determinada pela técnica de Bradford. A atividade da PKC foi determinada usando o KIT BIOTRAK da Amersham LIFE SCIENCES (Buckinghamshire, UK).

3.9 Estudo dos efeitos do α -tocoferol e do Trolox na atividade de tirosinas fosfatases de neutrófilos

3.9.1 Imunoprecipitação do receptor de EGF

Células A431 foram lisadas em tampão de lise A (20 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 10% de glicerol, 1% de Triton X-100, 1,5 mM de $MgCl_2$, 1 mM de EGTA, pH 7,5) adicionado de inibidores de proteases (1 μ g/ml de aprotinina, 1 μ g/ml leupeptina e 1 mM de PMSF). A imunoprecipitação do receptor de EGF destas células foi realizada com o anticorpo monoclonal mAB 108.1 anti-receptor de EGF, conjugado com proteína A-sepharose CL4B. Após a lavagem dos receptores imunoprecipitados com tampão quinase (20 mM de HEPES, pH 7,5, 5 mM $MnCl_2$ e 2 mM $MgCl_2$) foram adicionados 8 μ Ci de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ e a mistura foi incubada por 5 minutos a 25°C. A reação foi interrompida pela adição de tampão HNTG (20 mM de HEPES, pH 7,5, 150 mM de NaCl, 10% de glicerol, 0,1 % de Triton X-100) seguida por três lavagens neste tampão. O imunoprecipitado foi ressuspensionado no mesmo tampão e mantido a 4°C para posterior uso.

3.9.2 Ensaio da atividade de proteínas tirosina fosfatases

Neutrófilos (1×10^6 células/ml) foram incubados com AT (40 μ M) ou com Trolox (40 μ M), por 30 minutos, a 37°C, sob agitação constante. Células controle foram incubadas com PBS. As células foram, então, estimuladas com PMA (20 ng/ml) por 5 minutos ou, com Zy (100 partículas/célula) por 15 minutos. Após

estimulação, as células foram lavadas com PBS e os “pellets” foram ressuspensos em 300 µl de tampão de lise A, adicionados de inibidores de proteases (1 µg/ml de aprotinina, 1 µg/ml leupeptina e 1 mM de PMSF). As células foram, então, lisadas por sonicação e a concentração de proteína foi determinada pela técnica de Bradford. O volume de lisado celular correspondendo a 100 µg de proteína foi misturado a 20 µl de uma suspensão contendo imunoprecipitado de receptores de EGF fosforilado com ^{32}P , preparado como descrito no item 3.9.1. As reações foram incubadas por 30 minutos a 37°C, com agitação e interrompidas pela centrifugação dos imunoprecipitados, à 3000 x g, por 2 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi imediatamente aspirado e 50 µl de tampão de amostra SDS/PAGE 2x concentrado foram adicionados aos imunoprecipitados. As amostras foram fervidas por 5 minutos e resolvidas por SDS/PAGE (géis 7,5%). Após a secagem, os géis foram expostos a filmes autoradiográficos por 2 a 12 horas à temperatura ambiente. A intensidade da banda correspondente ao receptor de EGF foi quantificado por análise densitométrica, utilizando-se o densitômetro a laser LKB Ultrosan.

3.10 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se a Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para comparação múltipla de médias (Zar, 1996). Adotou-se o nível de 5% de significância para as diferenças encontradas.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Curva de incorporação de α -tocoferol pelas membranas de neutrófilos

A figura 14 mostra a curva de incorporação de α -tocoferol pelas membranas de neutrófilos, após a incubação das células com concentrações crescentes de succinato de α -tocoferol. Podemos verificar que a incorporação de vitamina começa a ser significativa a partir da concentração de 5 μ M, atingindo a saturação com 20 μ M de succinato de α -tocoferol.

Figura 14: Curva de incorporação de α -tocoferol em membranas de neutrófilos. As células (2×10^6) foram incubadas com succinato de α -tocoferol, por 30 minutos, à 37°C, sob agitação constante. O gráfico mostra um experimento representativo de 5 realizados.

4.2 Atividade fungicida

A figura 15 mostra a reprodução fotográfica em microscopia óptica (aumento de 1000x) de neutrófilos fagocitando leveduras (*Candida albicans*). As leveduras coradas estão vivas e as descoradas estão mortas.

Os valores da atividade fungicida de neutrófilos, após incubação com 3 concentrações de succinato de α -tocoferol (10, 20 e 40 μ M) foram obtidos, através de um escore, descrito por Chan *et al.* (1998) e se encontram na tabela 2. Podemos notar que a incorporação de vitamina E nas membranas de neutrófilos não alterou a capacidade fungicida destas células.

Figura 15: Reprodução fotográfica de microscopia óptica (aumento de 1000x) de neutrófilos fagocitando leveduras de *C. albicans*. (1) neutrófilos; (2) neutrófilos fagocitando leveduras; (3) leveduras vivas; (4) leveduras mortas. As lâminas foram coradas pela coloração de Rosenfeld.

Concentração de succinato de α -tocoferol ($\mu\text{mol/l}$)	Atividade Fungicida (escore)
Controle	59.5 ± 3.4
10	62.2 ± 6.9
20	57.5 ± 5.4
40	58.4 ± 5.6

Tabela 2: Atividade fungicida de neutrófilos, utilizando *C. albicans* como organismo alvo. Neutrófilos (1×10^6 células) foram incubados *C. albicans* (7×10^6 leveduras) e 200 μl de soro homólogo, por 30 minutos, à 37°C, sob agitação. As amostras foram citocentrifugadas, as lâminas coradas com corante de Rosenfeld e examinadas em microscopia óptica (aumento de 1000x). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP), para 4 experimentos independentes.

4.3 “Burst” Oxidativo

4.3.1 Efeito do α -tocoferol na produção de ERO/ERN por neutrófilos, medido através da QL amplificada por luminol

A figura 16 apresenta um experimento típico (de 3 reprodutíveis) e mostra a produção de ERO/ERN pelos neutrófilos incubados com 3 concentrações de AT (10, 20 e 40 μM) medida através da QL amplificada por luminol. Foi observada uma pequena produção de ERO/ERN, a qual foi crescente com a concentração de α -tocoferol utilizada.

Figura 16: Produção de ERO/ERN por neutrófilos (10^5 células) incubados com AT (10, 20, 40 μ M) por 30 minutos à 37°C, sob agitação, medida pela QL amplificada por luminol. O gráfico mostra um experimento representativo de 4 reprodutíveis.

A figura 17 mostra as curvas de QL obtidas de neutrófilos incubados com PMA (20 ng/ml) Zy (100 partículas/célula) ou AT (40 μ M). Podemos observar que o maior pico de QL foi obtido com as células estimuladas com PMA atingindo, em 8 minutos, 127,3 mV/ 10^5 células. Com Zy, o pico de QL foi de 54,2 mV, em 12 minutos de medida e, com AT (40 μ M) de 16,9 mV, em 2 minutos. A QL das células controle, ou seja, sem estímulo, foi praticamente igual a zero, não variando durante todo o tempo do experimento.

Figura 17: Produção de ERO/ERN por neutrófilos (10^5 células) incubados com PMA (20ng/ml) Zy (100 partículas/célula) ou AT (40 μ M) por 30 minutos à 37°C, sob agitação, medida pela QL amplificada por luminol. O gráfico mostra um experimento representativo de 4 reproduzíveis.

Figura 18: % de inibição da produção de ERO/ERN, medida por QL amplificada por luminol, de neutrófilos (10^5 células) estimulados com PMA (20ng) pré-incubados com AT (10, 20, 40 μ M) por 30 minutos à 37°C, sob agitação. O gráfico representa a média $\pm$ DP para 3 experimentos independentes. * Valores significativamente diferentes ao das células estimuladas com PMA ($p < 0,05$).

Na figura 18 observam-se as porcentagens de inibição na produção de ERO/ERN por neutrófilos estimulados com PMA (20 ng/ml) que foram pré-incubados com AT (10, 20 e 40 μ M). As inibições médias foram de 68,4% com as células pré-incubadas com 10 μ M de α -tocoferol, 81% com 20 μ M e de 86,4% com 40 μ M do antioxidante. Estas inibições foram estatisticamente significativas em relação aos valores obtidos com as células estimuladas por PMA, porém não diferem entre si.

A figura 19 mostra as porcentagens de inibição, pelo AT, da produção de ERO/ERN por neutrófilos estimulados com partículas de Zy (100 partículas/célula). As inibições médias foram de 55,2% após a incubação das células com 10 μ M de succinato de α -tocoferol, de 48,9% com 20 μ M e, de 61,9% com 40 μ M. Estas inibições foram estatisticamente significativas em relação aos valores obtidos com as células estimuladas por Zy.

Figura 19: % de inibição da produção de ERO/ERN, medida por QL amplificada por luminol, de neutrófilos (10^5 células) estimulados com Zy (100 partículas/célula) pré-incubados com AT (10, 20, 40 μ M) por 30 minutos à 37°C, sob agitação. O gráfico representa a média $\pm$ DP, para 3 experimentos independentes. *Valores significativamente diferentes ao das células estimuladas com Zy ($p < 0,05$).

4.3.2 Estudo comparativo dos efeitos do α -tocoferol, Trolox, estaurosporina e genisteína sobre a produção de ERO/ERN por neutrófilos, medida através da QL amplificada por luminol

A comparação dos efeitos inibitórios do AT, do Trolox, da estaurosporina e da genisteína sobre a ativação do "burst" oxidativo em neutrófilos humanos, ativados por PMA (20 ng/ml) ou por partículas de zymosan opsonizadas (100 partículas/célula) foi realizada utilizando-se a técnica de quimioluminescência (QL) amplificada por luminol.

As porcentagens médias de inibição do "burst" oxidativo dos neutrófilos estimulados com PMA, pelo AT (40 μ M) e pela genisteína (100 μ M) foram semelhantes ($86,4 \pm 0,86\%$ e $83,2 \pm 11,5\%$, respectivamente). A estaurosporina bloqueou quase que completamente a QL produzida por estas células, apresentando $99,1 \pm 0,77\%$ de inibição. Entretanto, o análogo solúvel da vitamina E, o Trolox, em concentrações iguais ao AT, mostrou uma porcentagem de inibição de apenas $30,5 \pm 8,5\%$ (figura 20). As inibições observadas foram estatisticamente significativas em relação aos valores obtidos com as células estimuladas por PMA.

A figura 21 mostra os efeitos inibitórios dos 4 compostos estudados sobre a produção de ERO/ERN por neutrófilos, estimulados com partículas de zymosan opsonizadas (100 partículas/célula). As porcentagens de inibição da QL induzidas pelo AT, Trolox e estaurosporina, se encontram ao redor de 50% (porcentagens médias de inibição $57,0 \pm 14,4\%$, $47,6 \pm 2,4\%$ e $51,3 \pm 5,5\%$, respectivamente). O inibidor de tirosinas quinases, genisteína, por sua vez, provocou uma inibição

média, do "burst" oxidativo, de $95,4 \pm 1,1\%$. As inibições observadas foram estatisticamente significativas em relação aos valores obtidos com as células estimuladas por Zy.

Figura 20: % de inibição da produção de ERO/ERN por neutrófilos (10^5 células) estimulados com PMA (20ng/ml) e pré-incubados por 30 minutos com: (i) succinato de α -tocoferol (40 μ M); (ii) Trolox (40 μ M); (iii) estaurosporina (10 nM) e (iv) genisteína (100 μ M). Os valores apresentados no gráfico mostram a média $\pm$ DP, para 3 ou mais experimentos independentes. * Valores significativamente diferentes ao das células estimuladas com PMA ($p < 0,05$).

Figura 21: % de inibição da produção de ERO/ERN por neutrófilos (10^5 células) estimulados com Zy (200 partículas/célula) e pré-incubados por 30 minutos com: (i) succinato de α -tocoferol (40 μ M); (ii) Trolox (40 μ M); (iii) estaurosporina (10 nM) e (iv) genisteína (100 μ M). Os valores apresentados no gráfico mostram a média $\pm$ DP, para 3 ou mais experimentos. *Valores significativamente diferentes ao das células estimuladas com Zy ($p < 0,05$).

4.3.3 Estudo dos efeitos da caliculina A na estimulação do “burst” oxidativo de neutrófilos, utilizando medidas de QL amplificada por luminol

Os resultados estão expressos em porcentagem de produção de QL máxima (média $\pm$ DP) em relação às células estimuladas com PMA ou Zy (100%) (figuras 22, 23).

A inibição da QL dos neutrófilos estimulados com PMA, pelo AT, foi de $79,7 \pm 8,0\%$, a qual foi estatisticamente significativa em relação às células não incubadas com AT. A caliculina A, em altas concentrações (100 nM) causou uma inibição significativa do “burst” oxidativo semelhante ao do AT, $82,0 \pm 3,0\%$. Entretanto, em concentrações mais baixas, ou seja, 0,1, 5, e 10 nM, a caliculina

A, produziu um aumento significativo da QL nas células estimuladas com PMA, de $131,3 \pm 6,4\%$, $126,5 \pm 4,7\%$ e $131,6 \pm 6,0\%$, respectivamente (figura 22).

Figura 22: Produção de ERO/ERN por neutrófilos sanguíneos (1×10^5 células/ml) incubados com AT ($40 \mu\text{M}$) por 30 minutos à 37°C ou com caliculina A (0,1, 5, 10 e 100 nM) por 10 minutos à 37°C . Células controle foram incubadas com PBS. A estimulação das células foi feita com PMA (20 ng/ml) e o ensaio de QL foi realizado de acordo com a metodologia descrita. Os resultados representam a média $\pm$ DP das porcentagens da QL máxima, em relação às células controle, de 3 ou mais experimentos independentes. *Valores significativamente diferentes ao das células estimuladas com PMA ($p < 0,05$). #Valores significativamente diferentes ao das células incubadas com AT e estimuladas por PMA.

Figura 23: Produção de ERO/ERN por neutrófilos sanguíneos (1×10^5 células/ml) incubados com AT (40 μ M) por 30 minutos à 37°C ou com caliculina A (0,1, 5, 10 e 100 nM) por 10 minutos à 37°C. Células controle foram incubadas com PBS. A estimulação das células foi feita com Zy (100 partículas/célula) e o ensaio de QL foi realizado de acordo com a metodologia descrita. Os resultados representam a média $\pm$ DP das porcentagens QL máxima, em relação às células controle, de 3 ou mais experimentos independentes. * Valores significativamente diferentes ao das células estimuladas com Zy ($p < 0,05$). # Valores significativamente diferentes ao das células incubadas com AT e estimuladas por Zy.

Nos experimentos onde as células foram estimuladas com Zy, a inibição da QL pelo AT, foi de $55,0 \pm 8,2\%$, a qual foi estatisticamente significativa em relação às células não tratadas com AT. A incubação das células com caliculina A nas concentrações de 0,1, 5 e 100 nM, resultou em inibições da QL, estatisticamente significativas, de $77,8 \pm 10,5\%$, $41,6 \pm 8,2$ e $94,2 \pm 3,4\%$, respectivamente. Por outro lado, a incubação com 10 nM de caliculina A causou um aumento na produção de ERO/ERN, de $33,7 \pm 8,7\%$ em relação às células estimuladas com Zy (figura 23).

4.3.4 Estudo dos efeitos da caliculina A sobre o efeito inibitório do α -tocoferol na estimulação do “burst” oxidativo de neutrófilos, medida através da QL amplificada por luminol

Os resultados estão expressos em porcentagem de produção de QL máxima (média $\pm$ DP) em relação às células estimuladas com PMA ou Zy (100%) (figuras 24, 25).

As incubações dos neutrófilos, previamente tratados com AT, com caliculina A, nas concentrações de 0,1, 5 e 10 nM, reverteram o efeito inibitório do AT na produção de ERO/ERN, por neutrófilos estimulados com PMA ($64,6 \pm 5,7\%$, $58,3 \pm 9,9\%$ e $62,2 \pm 9,4\%$, respectivamente). Por outro lado, na concentração de 100 nM, a caliculina A exacerbou a inibição causada pelo AT ($91,5 \pm 2,6\%$ de inibição) (figura 24).

Quando partículas de Zy foram usadas como estímulo do “burst” oxidativo das células incorporadas com AT, a caliculina A não foi capaz de reverter a inibição pelo AT. As porcentagens médias de inibição foram de $83,3 \pm 3,5\%$, $88,4 \pm 4,2\%$, $83,0 \pm 11,1\%$ e $89,8 \pm 8,1\%$, nas concentrações de 0,1, 5, 10 e 100 nM, respectivamente (figura 25).

Figura 24: Produção de ERO/ERN por neutrófilos sangüíneos (1×10^5 células/ml) incubados ou não com caliculina A (0,1, 5, 10 e 100 nM) por 10 minutos, à 37°C. As células foram pré-incubadas com AT (40 μ M) por 30 minutos, à 37°C. As células controle foram incubadas com PBS. A estimulação da células foi realizada com PMA (20 ng/ml) e o ensaio de QL realizado de acordo com a metodologia descrita. Os resultados representam a média $\pm$ DP das porcentagens da QL, em relação às células controle, de 3 ou mais experimentos independentes. *Valores significativamente diferentes ao das células estimuladas com PMA ($p < 0,05$).

Figura 25: Produção de ERO/ERN por neutrófilos sangüíneos (1×10^5 células/ml) incubados ou não com caliculina A (0,1, 5, 10 e 100 nM) por 10 minutos, à 37°C. As células foram pré-incubadas com AT (40 μ M) por 30 minutos, à 37°C. As células controle foram incubadas com PBS. A estimulação da células foi realizada com Zy (100 partícula/célula) e o ensaio de QL foi realizado de acordo com a metodologia descrita. Os resultados representam a média $\pm$ DP das porcentagens da QL, em relação às células controle, de 3 ou mais experimentos independentes. * Valores significativamente diferentes ao das células estimuladas com Zy ($p < 0,05$). # Valores significativamente diferentes ao das células incubadas com AT e estimuladas por Zy.

4.4 Atividade da Proteína Quinase C (PKC)

4.4.1 Efeito do α -tocoferol na atividade da PKC de neutrófilos

Os resultados estão expressos em porcentagem da atividade da PKC, em relação às células controles (100%).

A incubação dos neutrófilos com AT causou uma inibição da atividade da PKC no lisado total das células, na ausência de inibidores de fosfatases (figura 26). Entretanto, quando estes foram adicionados (ortovanadato de sódio 2 mM, fluoreto de sódio 50 mM e pirofosfato de sódio 10 mM) não houve inibição da

atividade de PKC; em um experimento observamos um aumento desta (experimento 3-figura 27).

Figura 26: % da atividade de PKC de lisado total neutrófilos, incubados com AT (10, 20 e 40 μ M) por 30 minutos à 37°C, em relação às células controle. No tampão de lise não foram adicionados inibidores de fosfatases. O gráfico mostra os resultados de 3 experimentos independentes.

Figura 27: % da atividade de PKC no lisado total neutrófilos, incubados com AT (10, 20 e 40 μ M) por 30 minutos à 37°C, em relação às células controle. No tampão de lise foram adicionados inibidores de fosfatases (ortovanadato de sódio 2 mM, fluoreto de sódio 50 mM e pirofosfato de sódio 10 mM). O gráfico mostra os resultados de 3 experimentos independentes.

4.4.2 Estudo comparativo dos efeitos do α -tocoferol, da genisteína, da estaurosporina e do Trolox sobre a atividade da PKC

Os resultados estão expressos em porcentagem de atividade de PKC, em relação às células controle (100%).

A atividade de PKC de neutrófilos humanos foi inibida, após a incubação das células com AT. Foi observada uma diminuição, estatisticamente significativa, na atividade da enzima para $46,5 \pm 5,5\%$ em relação as células não incubadas com o antioxidante (figura 28). A incubação com estaurosporina reduziu drasticamente a atividade da PKC, para $28,3 \pm 4,2\%$, a qual foi estatisticamente significativa. Por outro lado, Trolox e genisteína, não apresentaram nenhum efeito significativo sobre a atividade da PKC (figura 28).

Figura 28: Atividade de PKC de neutrófilos sangüíneos (1×10^6 células/ml) incubados com AT (40 μ M), Trolox (40 μ M), genisteína (100 μ M) ou estaurosporina (10 nM) por 30 minutos, à 37°C. As células controle foram incubadas com PBS nas mesmas condições. Os resultados são expressos como a porcentagem da média $\pm$ DP da atividade de PKC, em relação às células controle, para 3 ou mais experimentos independentes. *Valores significativamente diferentes ao da células controle ($p < 0,05$).

4.4.3 Estudo dos efeitos da caliculina A sobre a atividade da PKC de neutrófilos e sobre os efeitos inibitórios do α -tocoferol sobre a PKC

Os resultados estão expressos em porcentagem de atividade da PKC em relação às células controle (100%) a saber, não incubadas com AT (40 μ M) e/ou caliculina A em diferentes concentrações (0,1, 5, 10 e 100 nM) (figura 29).

Figura 29: Atividade de PKC de lisados de neutrófilos sangüíneos (1×10^6 células/ml) incubados ou não com caliculina A (0,1, 5, 10 e 100 nM) por 10 minutos, à 37°C. As células foram, previamente, incubadas com AT (40 μ M) ou com PBS por 30 minutos, à 37°C. Os resultados são expressos como a média $\pm$ DP da % de atividade da PKC em relação às células controle, de 3 ou mais experimentos independentes. *Valores significativamente diferentes ao das células controle ($p < 0,05$). #Valores significativamente diferentes ao das células incubadas com AT ($p < 0,05$).

A atividade da PKC nos neutrófilos incubados com AT foi de $46,4 \pm 3,4\%$ em relação às células controle, diferença esta, estatisticamente significativa. A incubação das células, após a incorporação do α -tocoferol, com 0,1 nM de caliculina A, causou um aumento de $72,1 \pm 6,9\%$ na atividade da PKC, em relação às células controle, aumento este estatisticamente significativo. Na concentração de 5 nM, a caliculina A também reverteu, parcialmente, o efeito inibitório da vitamina E sobre a enzima, sendo a atividade da PKC dessas células de $64,7 \pm 10,8\%$ do controle. Entretanto, nas concentrações de 10 nM e 100 nM, a caliculina A não alterou significativamente a ação inibitória da vitamina sobre a PKC ($50,3 \pm 3,8\%$ e $41,3 \pm 4,8\%$ de atividade) das células. A incubação das células com caliculina A nas concentrações de 0,1, 5, 10 e 100 nM, causou uma inibição significativa da atividade da PKC destas, sendo estas atividades de $46,7 \pm$

4,9%, $39,2 \pm 7,5\%$, $37,8 \pm 4,9\%$ e $42,4 \pm 7,9\%$ do controle, respectivamente (figura 29).

4.5 Fosforilação em Resíduos de Tirosina

4.5.1 Efeito do α -tocoferol sobre os níveis de fosforilação em tirosina de proteínas em neutrófilos

A figura 30 mostra o padrão geral de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina, em neutrófilos humanos. Podemos verificar que não houve uma mudança no padrão de fosforilação nas células incubadas com AT em relação às células controle, com exceção da concentração de $40 \mu\text{M}$, que apresentou uma leve diminuição nos níveis de fosforilação (figura 30 A; 4). A estimulação das células com PMA (20 ng/ml) por 5 minutos, causou um aumento nos níveis de fosforilação em tirosina, quando estes são comparados ao padrão das células não-estimuladas (figura 30 B, 2); a pré-incubação destas células com AT ($40 \mu\text{M}$) por 30 minutos, seguida de estimulação, causou um aumento adicional no padrão geral de fosforilação (figura 30 B; 3). Na figura 30 C, podemos observar que a estimulação das células com Zy, por 15 minutos, também resultou em aumento de fosforilação em tirosina de proteínas, quando comparadas às células controle. Entretanto, ao contrário do que ocorreu com o PMA, a pré-incubação dos neutrófilos com o antioxidante ($40 \mu\text{M}$) resultou numa diminuição desses níveis de fosforilação (figura 30 C; 3).

Figura 30: Autoradiograma mostrando "immunoblotting" de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina de neutrófilos humanos, isolados de sangue periférico. Em cada "lane" foram aplicados 50µg de proteína de lisado total de células. (A) 1: Células controle, sem estímulo; 2: Células incubadas com 10µM de succinato de α -tocoferol; 3: Células incubadas com 20µM de succinato de α -tocoferol; 4: Células incubadas com 40µM de AT. (B) 1: Células controle, sem estímulo; 2: Células estimuladas com PMA ; 3: Células pré-incubadas com AT (40µM) e estimuladas com PMA. (C) 1: Células controle, sem estímulo; 2: Células estimuladas com Zy; 3: Células pré-incubadas com AT (40µM) e estimuladas com Zy. A figura representa um experimento de 5 reprodutíveis e independentes.

4.5.2 Estudo dos efeitos do α -tocoferol, Trolox, estaurosporina e genisteína sobre os níveis de fosforilação em tirosina de proteínas de neutrófilos

A figura 31 mostra um aumento nos níveis de fosforilação em tirosina de proteínas de neutrófilos estimulados com PMA ("lanes" C e G). A pré-incubação destas células com AT causou um aumento adicional nos níveis de fosforilação, das células estimuladas por PMA ("lane" D). O Trolox, entretanto, não causou alteração nos níveis de fosforilação das células estimuladas por PMA ("lane" H).

A estimulação das células com PMA resultou em um aumento nos níveis de fosforilação em tirosina (figura 32, "lanes" B e E) aumento este que é ainda maior quando as células são pré-incubadas com estaurosporina (10 nM) (figura 32, "lane" C). Por outro lado, a pré-incubação das células com genisteína (100 μ M) seguida da estimulação com PMA, resulta em diminuição do padrão de fosforilação da proteínas (figura 32, "lane" F).

Figura 31: Autoradiograma mostrando "westernblot" de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina de neutrófilos humanos. Em cada "lane" foram aplicados 30 μ g de proteína de lisado total de células. A e E: Células controle, sem estímulo. B: Células pré-incubadas com AT (40 μ M) por 30 minutos, sem estímulo. C e G: Células estimuladas com PMA (20 ng/ml) por 5 minutos. D: Células pré-incubadas com AT (40 μ M) por 30 minutos e estimuladas com PMA (20 ng/ml) por 5 minutos. F: Células incubadas com Trolox (40 μ M) por 30 minutos. H: Células pré-incubadas com Trolox (40 μ M) por 30 minutos e estimuladas com PMA por 5 minutos. A figura representa um experimento de 5 reprodutíveis e independentes.

Figura 32: Autoradiograma mostrando "westernblot" de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina de neutrófilos humanos. Em cada "lane" foram aplicados 30 µg de proteína de lisado total de células. **A e D:** Células controle, sem estímulo. **B e E:** Células estimuladas com PMA (20 ng/ml) por 5 minutos. **C:** Células pré-incubadas com estaurosporina (10 nM) por 30 minutos e estimuladas com PMA (20 ng/ml) por 5 minutos. **F:** Células pré-incubadas com genisteína (100 µM) por 30 minutos e estimuladas com PMA (20 ng/ml) por 5 minutos. A figura representa um experimento de 5 reprodutíveis e independentes.

A figura 33 mostra os efeitos do AT e do Trolox sobre o padrão de fosforilação em tirosina de neutrófilos estimulados com Zy (100 partículas/célula). O estímulo causou um aumento nos níveis de fosforilação ("lanes" B e E); por outro lado, ambos os antioxidantes diminuíram os níveis de fosforilação nas células estimuladas ("lanes" C e F).

Figura 33: Autoradiograma mostrando "westernblot" de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina de neutrófilos humanos. Em cada "lane" foram aplicados 30 µg de proteína de lisado total de células. A e D: Células controle, sem estímulo. B e E: Células estimuladas com Zy (100 partículas/célula) por 15 minutos. C: Células pré-incubadas com AT (40 µM) por 30 minutos e estimuladas com Zy (100 partículas/célula) por 15 minutos. F: Células pré-incubadas com Trolox (40 µM) por 30 minutos e estimuladas com Zy (100 partículas/célula) por 15 minutos. A figura representa um experimento de 5 reprodutíveis e independentes.

Podemos observar, na figura 34, que a pré-incubação dos neutrófilos com estaurosporina (10 nM) ou com genisteína (100 µM) seguida do estímulo por Zy, resulta em diminuição nos níveis de fosforilação em tirosina das proteínas destas células ("lanes" C e D).

Figura 34: Autoradiograma mostrando “westernblot” de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina de neutrófilos humanos. Em cada “lane” foram aplicados 30 μ g de proteína de lisado total de células. **A:** Células controle, sem estímulo. **B:** Células estimuladas com Zy (100 partículas/célula) por 15 minutos. **C:** Células pré-incubadas com estaurosporina (10 nM) por 30 minutos e estimuladas com Zy (100 partículas/célula). **D:** Células pré-incubadas com genisteína (100 μ M) por 30 minutos e estimuladas com Zy (100 partículas/célula) por 15 minutos. A figura representa um experimento de 5 reproduíveis e independentes.

4.6 Estudo dos efeitos do α -tocoferol e do Trolox na atividade de tirosinas fosfatases de neutrófilos

Os resultados estão expressos em porcentagem de atividade de tirosina fosfatase total nos lisados de neutrófilos, em relação às células controle (100%).

A incorporação de α -tocoferol ou de Trolox, aos neutrófilos não-estimulados, não alterou a atividade das proteínas tirosinas fosfatases destas células (figura 35). Quando as células foram estimuladas com PMA (20 ng/ml) a atividade de tirosina fosfatase caiu para $75,4 \pm 3,5\%$ da atividade encontrada nas células não-estimuladas. Entretanto, a pré-incubação das células com AT, reverteu o efeito inibitório do PMA ($119,5 \pm 7,2\%$ de atividade) o qual foi estatisticamente significativo. O Trolox, por sua vez, não alterou significativamente, o efeito inibitório do PMA sobre a atividade das fosfatases. A estimulação das células com Zy produziu uma forte inibição, estatisticamente significativa, da atividade das tirosinas fosfatases ($16,0 \pm 3,9\%$ do controle) efeito que foi parcialmente revertido pelo α -tocoferol ($37,7 \pm 8,2\%$ de atividade) e é estatisticamente significativo. A pré-incubação com Trolox também alterou, de maneira significativa, a inibição Zy-dependente da atividade das tirosinas fosfatases ($31,1 \pm 4,2\%$ de atividade) (figura 35).

Figura 35: Atividade de tirosina fosfatases de neutrófilos sangüíneos (1×10^6 células/ml). As células foram incubadas ou não com AT ($40 \mu\text{M}$) ou com Trolox ($40 \mu\text{M}$) por 30 minutos, à 37°C . As células foram, em seguida, estimuladas com PMA (20 ng/ml) por 5 minutos ou com Zy ($100 \text{ partículas/ml}$) por 15 minutos. Células sem estímulo foram utilizadas como controle. As células foram então lisadas e a atividade de tirosina fosfatases dos lisados foi determinada de acordo com a metodologia descrita. Os resultados estão expressos como porcentagem de atividade, em relação às células controle. Os valores apresentados no gráfico mostram a média $\pm$ DP de 3 ou mais experimentos. * Valores significativamente diferentes ao das células controle ($p < 0,05$). #Valores significativamente diferentes ao das células estimuladas por PMA ($p < 0,05$). •Valores significativamente diferentes ao das células estimuladas por Zy ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1 Incorporação do α -tocoferol pelas membranas de neutrófilos humanos

O α -tocoferol, uma vitamina lipossolúvel, é um antioxidante que tem a propriedade de bloquear reações de lipoperoxidação em membranas celulares, tendo assim, um importante papel como agente anti-aterogênico (Burton & Ingold, 1989). Acredita-se também que ele tenha uma ação imunomoduladora, aumentando a imunidade celular e humoral (Tengerdy, 1989) embora o seu mecanismo de ação ainda não esteja bem elucidado. Além de sua ação como sequestrador de ERO e ERN, o α -tocoferol pode agir, também na modulação da atividade e na expressão de proteínas intracelulares, participantes da sinalização celular, alterando, assim, diversas respostas celulares a estímulos variados (Boscoboinik et al., 1991; Faruqi et al., 1994; Freedman et al., 1996; Cominacini et al., 1997). O α -tocoferol mostrou inibir a atividade da PKC de diversos tipos celulares como, células do músculo liso (Azzí et al., 1993) células endoteliais (Keaney et al., 1996), plaquetas (Freedman et al., 1996) macrófagos (Sakamoto et al., 1990) e monócitos (Cachia et al., 1998).

Para verificarmos o efeito do α -tocoferol nas vias de sinalização de ativação de neutrófilos humanos, realizamos a incorporação do AT *in vitro*, nas membranas celulares, através da incubação do antioxidante com os neutrófilos. A quantidade de α -tocoferol incorporado foi medida por técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os resultados obtidos mostram que a incorporação *in vitro* de α -tocoferol nas membranas de neutrófilos foi bem

sucedida (figura 14). A partir de valores basais entre 0,019 a 0,058 η moles de α -tocoferol/ 2×10^6 células, foi possível saturar as membranas dos neutrófilos com aproximadamente 2,5 η moles de α -tocoferol / 2×10^6 células, após a incubação dos mesmos, com concentrações de AT variando de 20 a 40 μ M (figura 14). Considerando este experimento, os efeitos do α -tocoferol foram estudados após incubação das células com 40 μ M de AT. É importante notar, também, que independentemente da concentração basal de α -tocoferol nas células, a saturação das membranas se dá aproximadamente com 2,5 η moles de α -tocoferol/ 2×10^6 células. Baseados nesses resultados, foi possível utilizar neutrófilos de doadores diferentes, independentemente da concentração inicial de α -tocoferol nos mesmos, uma vez que a incubação das células com o antioxidante, nas condições descritas, satura as membranas, equalizando, a quantidade de α -tocoferol aí presente.

5.2 Atividade fungicida de neutrófilos humanos

Boxer *et al.* (1979) verificaram que a administração oral de 400 UI de acetato de α -tocoferol, durante 3 meses, a pacientes deficientes de glutathione, normalizou a atividade bactericida (*S. aureus*) de seus neutrófilos, a qual se encontra diminuída em relação a dos indivíduos normais. Por outro lado, foi observado que a administração oral de 1600 UI de vitamina E, por 7 dias, a indivíduos normais resulta em atividade bactericida dos neutrófilos semelhante à das células dos indivíduos controle, quando as células são incubadas com o *S. aureus* por 30 minutos. Entretanto, aumentando o período de incubação, a

atividade bactericida dos neutrófilos obtidos dos indivíduos suplementados passa a ser menor do que a das células dos indivíduos controle (*Baehner et al., 1977*). Os autores sugeriram que a diminuição da capacidade de "killing" apresentada pelos neutrófilos, após a administração oral de vitamina E, é devida à menor disponibilidade de H_2O_2 no interior do vacúolo fagocítico, resultante da ação seqüestradora de ERO/ERN da vitamina E.

Neste trabalho, verificamos que a saturação das membranas de neutrófilos com α -tocoferol não altera a atividade fungicida destas células, após sua incubação durante 30 minutos com leveduras de *C. albicans* (tabela 2). Nossos resultados não podem ser comparados aos achados descritos no parágrafo anterior, uma vez que utilizamos um organismo alvo de fagocitose diferente, um fungo ao invés de uma bactéria. Cabe lembrar, também, que o tempo máximo de incubação aqui utilizado foi de 30 minutos, sendo que, a diferença encontrada por Boxer e colaboradores (1979) somente ocorre após este período.

5.3 Produção de ERO/ERN por neutrófilos humanos

A quimioluminescência (QL) amplificada por luminol tem sido utilizada para a detecção da resposta oxidativa dos neutrófilos (*DeChatelet et al., 1982*). A luz medida resulta da excitação do luminol, devido a sua reação com oxidantes. A literatura tem reafirmado que o principal oxidante, produzido pelos neutrófilos ativados, responsável pela reação com o luminol é o ácido hipocloroso, resultante da reação do H_2O_2 com Cl^- , catalisada pela mieloperoxidase (*Brestel, 1985*). Recentemente, foi demonstrado que o peroxinitrito ($ONOO^-$) um produto da

reação do $\text{NO}^\bullet$ com o $\text{O}_2^{\bullet-}$, também contribui para a produção de luz medida na presença de luminol, num sistema acelular. Neste sistema foi mostrado que nem o $\text{NO}^\bullet$ e nem o $\text{O}_2^{\bullet-}$, sozinhos, foram capazes de induzir uma QL significativa (*Radi et al., 1993*).

Estudos com neutrófilos humanos mostraram que a QL amplificada por luminol, quando essas células são estimuladas por PMA, é inibida por inibidores da síntese de $^\bullet\text{NO}$, como a N^G -monometil-L-arginina (L-NMMA) e N-iminoetil-L-ornitina (L-NIO) e também, pelo sequestrador de $\text{O}_2^{\bullet-}$, a superóxido dismutase. Estes resultados sugerem que ambas as enzimas, a NO sintase e a NADPH oxidase, estejam envolvidas na produção de luz e, que o ONOO^- e seus derivados, $^\bullet\text{NO}_2$, $^\bullet\text{OH}$ e NO_3^- sejam os principais agentes excitadores do luminol, uma vez que, o PMA não induz a degranulação do grânulos azurófilos onde está contida a mieloperoxidase, responsável pela produção de HClO (*Catz et al., 1995*).

O PMA é um agente tumorigênico que induz o "burst" oxidativo dos neutrófilos, através da ativação direta da PKC. O pico de QL produzido pelas células estimuladas por este agente é intenso e rápido, como está demonstrado na figura 17. A PKC, além de ativar a NADPH oxidase, através da fosforilação de seus componentes citossólicos, p47^{PHOX} e p67^{PHOX} , resultando em produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (*El Benna et al., 1996; El Benna et al., 1997*) pode ativar, também, a NO sintase de neutrófilos, produzindo $\text{NO}^\bullet$ (*Carreras et al., 1997*). Adicionalmente, foi demonstrado que a ativação de tirosinas quinases, através da inibição de tirosinas fosfatases, diminui a produção de $\text{NO}^\bullet$ e que a utilização do inibidor de tirosina quinases, genisteína, aumenta essa produção, confirmando, assim, uma regulação negativa da produção de $\text{NO}^\bullet$ por tirosinas quinases (*Carreras et al., 1997*).

causa uma perturbação na estrutura da membrana resultando na quebra de fosfolipídios pela fosfolipase A₂, ativando o metabolismo do ácido araquidônico com formação de oxidantes (Maridoneau-Parini & Tauber, 1986; Cheung et al., 1983). Podemos notar que a curva de luminescência produzida pelo Zy tem um pico de menor intensidade do que a produzida na presença de PMA, entretanto, com maior duração (figura 17). A diferença entre as duas curvas, provavelmente, é devida às diferentes vias de produção de oxidantes, acionadas por estes dois agentes, além da via da PKC. A ativação da PKC, tanto da ação do PMA, quanto do Zy, induz a produção de metabólitos do NO[•]. Entretanto, quando o Zy é utilizado como estímulo, pode haver uma inibição na produção de NO[•] e seus metabólitos, pelos neutrófilos, devido à ativação de tirosinas quinases desencadeada por este estímulo (Carreras et al., 1997). A este efeito soma-se o fato do Zy estimular a produção de outros oxidantes, resultantes da aticidade da cascata do ácido araquidônico (Cheung et al., 1983).

5.3.1 Efeito do α -tocoferol na produção de ERO/ERN por neutrófilos

Os resultados da QL amplificada por luminol, mostraram que a saturação das membranas das células com vitamina E, causou uma inibição significativa do "burst" oxidativo de neutrófilos estimulados, com ambos os estímulos utilizados,

O Zy, por sua vez, age ligando-se a receptores de membrana, resultando na ativação de outras vias de produção de ERO, além daquela dependente da PKC. Ele estimula as vias dependentes de proteínas G, resultando na ativação de

PMA e Zy. Entretanto, esta inibição é mais acentuada com o PMA (acima de 80%) do que com o Zy (ao redor de 50%) (figuras 18 e 19). Estes resultados, maior inibição, pelo α -tocoferol, da produção de ERO pelas células estimuladas pelo ativador da PKC, PMA, sugerem que o α -tocoferol age preferencialmente nas vias de sinalização dependentes de PKC. A inibição da via de ativação da PKC pelo α -tocoferol pode ocorrer através da ação direta de seu produto oxidado, tocoferil quinona, sobre os resíduos de cisteína do domínio catalítico da enzima (Gopalakrishna & Jaken, 2000) ou então, através da ativação de serina/treonina fosfatases as quais, defosforilariam a PKC, desativando-a (Ricciarelli & Azzi, 1998).

5.3.2 Estudo comparativo dos efeitos do α -tocoferol, do Trolox, da estaurosporina e da genisteína sobre a produção de ERO/ERN por neutrófilos

O efeito do Trolox, análogo solúvel da vitamina E, foi estudado para verificar, se os efeitos do α -tocoferol, sobre as vias de sinalização de neutrófilos associadas à ativação da NADPH oxidase, poderia se dar através de um mecanismo antioxidante e/ou, por um mecanismo não-antioxidante. A concentração do Trolox (40 μ M) usada nos experimentos baseou-se em estudo anterior de Mabile *et al.* (1995) que utilizou as mesmas concentrações de α -tocoferol e Trolox.

As inibições da produção de ERO/ERN, induzidas pela presença de Trolox, em neutrófilos estimulados por ambos PMA e Zy, se encontram ao redor de 30% e 50%, respectivamente (figuras 20 e 21). O menor efeito inibitório, deste

antioxidante, nas células estimuladas por PMA, quando comparado ao do AT, poderia ser devido a seu efeito não-inibitório sobre a atividade da PKC (figura 28). Ao contrário do α -tocoferol, o Trolox, por ser solúvel, não fica incorporado às membranas celulares, não podendo agir, eficientemente, em proteínas de membrana como a PKC. A glutathiona reduzida, o principal antioxidante solúvel, presente no citosol das células, não apresenta atividade modulatória redox sobre a PKC, confirmando a hipótese de que esta modulação é realizada por antioxidantes lipossolúveis e peróxidos lipídicos, na membrana celular (Gopalakrishna & Jaken, 2000).

Mabile *et al.* (1995) mostraram que o α -tocoferol e o Trolox, utilizados nas mesmas concentrações, inibem, de maneira similar, os efeitos citotóxicos dependentes da ativação da PKC, causados pela LDL oxidada. No trabalho citado, a eficiência do Trolox, é semelhante ao do α -tocoferol, provavelmente, porque a incorporação dos antioxidantes pelas células endoteliais em cultura, durante 20 horas, é mais eficiente.

Para elucidar que vias de sinalização intracelular associadas ao "burst" oxidativo em neutrófilos, estariam sendo moduladas pelo α -tocoferol, comparamos o efeito da vitamina E com aqueles promovidos pelo inibidor de PKC, a estaurosporina e pelo inibidor de tirosina quinases, a genisteína.

Os efeitos da estaurosporina (10 nM) sobre a produção de ERO/ERN, em neutrófilos estimulados com PMA ou Zy, são semelhantes aos obtidos com o AT, ou seja, uma total inibição na presença de PMA (figura 20) e, uma inibição ao redor de 50%, nas células estimuladas com Zy (figura 21). Estes resultados sugerem que o mecanismo de inibição do "burst" oxidativo de neutrófilos,

promovido por estes agentes, envolve, provavelmente, a inibição da PKC. Robinson *et al.* (1990) também demonstraram que a estaurosporina inibe, eficientemente, a produção de ânion superóxido por neutrófilos estimulados com PMA e, com menor eficiência, esta produção por neutrófilos estimulados com fMLP, um agente quimiotático solúvel, que ativa o “burst” oxidativo, através de sua interação com receptores de membrana do neutrófilo, agindo, desta maneira, nas vias de sinalização dependentes e independentes de PKC.

A genisteína, um inibidor de tirosina quinases, utilizada na concentração de 100 μ M, inibe quase que completamente a QL, produzida pelos neutrófilos ativados por ambos os estímulos, PMA e Zy (figuras 20 e 21). Entretanto, nossos resultados com PMA, não coincidem com alguns dados encontrados na literatura. Aqueles mostraram, que a genisteína não apresenta efeito sobre a produção de $O_2^{\bullet-}$, medida pela técnica de redução do citocromo c (Mócsai *et al.*, 1997) ou, então, aumenta esta produção (Utsumi *et al.*, 1992). Os resultados descritos no presente trabalho são compatíveis, entretanto, com o estudo dos níveis de fosforilação em resíduos de tirosina de proteínas de neutrófilos estimulados por PMA, quando demonstramos que este agente causa um aumento nos níveis de fosforilação em tirosina (figuras 30, 31, 32). Este dado mostra que de alguma forma, o PMA ativa a via dependente de tirosina quinases. Assim, um inibidor de tirosina quinases, como a genisteína, poderia causar uma diminuição da produção de ERO/ERN por neutrófilos estimulados com PMA, através da inibição da fosforilação em tirosinas de proteínas, induzida pelo PMA e, associada à ativação da NADPH oxidase. Resultados de outros autores, que também demonstraram um aumento nos níveis de fosforilação de proteínas em neutrófilos estimulados por PMA (Pontremoli

et al., 1983; Berkow & Dodson, 1990; Dusi *et al.*, 1994) dão suporte a hipótese formulada acima.

Adicionalmente, por ser um flavonóide, a genisteína, além de ser um inibidor de tirosina quinases, é um potente antioxidante (Cai *et al.*, 1999) podendo, desta maneira, diminuir a produção de QL, através de sua ação seqüestradora de ERO/ERN. No que concerne à inibição, pela genisteína, do “burst” oxidativo de neutrófilos ativados com Zy, nossos resultados estão de acordo com os dados da literatura, que mostram um efeito inibitório da genisteína sobre a produção de oxidantes, em neutrófilos estimulados com agentes que exercem sua ação através de receptores de membrana (Mócsai *et al.*, 1997; Utsumi *et al.*, 1992).

5.3.3 Estudo dos efeitos da caliculina A sobre a produção de ERO/ERN e sobre os efeitos inibitórios do α -tocoferol em neutrófilos

Foi demonstrado que a inibição da PKC de células do músculo liso pelo α -tocoferol, não é devida à sua ação direta sobre a enzima, mas sim, através da ativação de serina/treonina fosfatases, resultando em defosforilação de sítios específicos da enzima e, na sua desativação (Azzi *et al.*, 1995; Ricciarelli *et al.*, 1998). Para confirmar esta hipótese, em nosso modelo experimental com neutrófilos humanos estimulados, utilizamos a caliculina A, um inibidor de serina/treonina fosfatases, principalmente, das PP1 e PP2A (Azzi *et al.*, 1995). O objetivo do uso deste inibidor foi o de verificar, se o mesmo seria capaz de reverter os efeitos inibitórios do AT, sobre as vias de ativação da NADPH oxidase, dependentes de PKC.

Nossos resultados mostram que nos neutrófilos estimulados com PMA, a caliculina A nas concentrações mais baixas (0,1, 5 e 10 nM) causa um incremento significativo da produção de ERO/ERN e que, em concentrações mais altas (100 nM) este antagonista de serina/treonina fosfatases, bloqueia quase que completamente a QL (figura 22). Resultados da literatura mostram que a modulação do “burst” oxidativo dos neutrófilos estimulados com PMA, pela caliculina A, depende de ambas concentrações, do estímulo e do antagonista. Em baixas concentrações do estímulo, a caliculina A estimula a produção de ânion superóxido pelas células e, em altas concentrações, promove uma inibição (Yamagushi *et al.*, 1995; Ding & Badwey, 1992; Djerdjouri, 1995).

A caliculina A, através da inibição de serina/treonina fosfatases, estaria impedindo que a PKC e outras proteínas que são ativadas por fosforilação em serina/treonina, sejam defosforiladas, mantendo, então, seu estado de ativação, o que resulta em aumento da atividade da NADPH oxidase. Por outro lado, na presença de altas concentrações de caliculina A (100 nM) poderia haver uma hiperfosforilação da PKC e, sua subsequente, desativação proteolítica, resultando em diminuição da atividade da NADPH oxidase.

A ativação da NADPH oxidase de neutrófilos, resultando na produção de ERO por estas células, depende do acoplamento dos componentes citosólicos aos componentes de membrana da enzima (Babior, 1978; Babior, 1999). A proteína p47^{phox} é um dos componentes citosólicos da NADPH oxidase que, para migrar para a membrana, precisa ser fosforilada pela PKC (Yamagushi *et al.*, 1995). Adicionalmente, a p47^{phox} possui outros sítios de fosforilação em resíduos de serina, que podem ser fosforilados por outras quinases, além da PKC (Yamagushi *et*

et al., 1996). Foi sugerido que a caliculina A, poderia ativar certas quinases, impedindo sua defosforilação e estas, por sua vez, iriam fosforilar sítios da p47^{phox} impedindo sua migração para a membrana, bloqueando a ativação da NADPH oxidase (*Yamagushi et al.*, 1996). Estes dados sugerem a existência de outro mecanismo, pelo qual, a caliculina A, em altas concentrações, estaria inibindo a QL produzida pelos neutrófilos estimulados por PMA (figura 22).

5.1 Atividade da PKC de neutrófilos humanos

Ambos domínios, catalítico e regulatório, da PKC possuem resíduos de cisteína sensíveis à modulação redox. A atividade da PKC pode ser aumentada pela ação de oxidantes sobre os resíduos de cisteína do domínio regulatório, a qual resulta em mudança conformacional deste domínio, com liberação do pseudosubtrato inibitório e ativação da enzima de maneira independente de fatores lipídicos (*Gopalakrishna et al.*, 1995). Diferentemente dos resíduos de cisteína do domínio regulatório da PKC, os quais estão associados a moléculas de zinco formando anéis, os resíduos no domínio catalítico estão livres para reagir com agentes alquilantes e antioxidantes em sua forma oxidada. A ligação covalente destes com os resíduos de cisteína, causa uma inibição da atividade fosfotransferásica da enzima (*Gopalakrishna & Jaken*, 2000). Agentes que previnem processos tumorais, como compostos contendo selênio e ainda, polifenóis, como a curcumina, inibem, eficaz e irreversivelmente, a atividade da PKC, através de sua ação em seu domínio catalítico (*Chen et al.*, 1996; *Gopalakrishna, et al.*, 1997).

A modulação redox da PKC pode se dar, também, através da ativação de fosfatases por antioxidantes, que, por sua vez, irão defosforilar e inativar a enzima. Azzi et al. (1995) mostraram que a inibição da PKC de células do músculo liso pelo α -tocoferol, é, provavelmente, devida a ativação das serina/treonina fosfatases PP1 e PP2A.

5.4.1 Efeito do α -tocoferol sobre a atividade da PKC de neutrófilos

O efeito inibitório do α -tocoferol sobre a atividade da PKC de neutrófilos humanos, medido neste estudo, nos leva a sugerir que esta ação, seja indireta, a saber, através da ativação de fosfatases, que defosforilariam a PKC a uma forma inativa. Esta proposta está baseada nos resultados apresentados nas figuras 26 e 27, onde podemos notar que a inibição da atividade da PKC pelo α -tocoferol, só é observada, quando inibidores de fosfatases não são adicionados ao ensaio. A atividade da PKC de outros tipos celulares, como células do músculo liso (Azzi et al., 1993) células endoteliais (Keaney et al., 1996) plaquetas (Freedman et al., 1996) macrófagos (Sakamoto et al., 1990) e monócitos (Cachia et al., 1998) também é inibida pelo α -tocoferol. Entretanto, esses trabalhos não sugerem uma ação indireta do α -tocoferol sobre a atividade da PKC.

5.4.2 Estudo comparativo dos efeitos do α -tocoferol, do Trolox, da estaurosporina e da genisteína sobre a atividade da PKC

Os resultados apresentados na figura 28 mostram uma inibição significativa da atividade de PKC de neutrófilos, pelo α -tocoferol, mas não pelo Trolox. Azzi *et al.* (1993) mostraram que o α -tocoferol, mas não o β -tocoferol inibe a atividade da PKC, em células do músculo liso. Eles propuseram que o α -tocoferol age por um mecanismo não-antioxidante, uma vez que o β -tocoferol, um antioxidante com potência semelhante à da sua isoforma alfa, não inibe a atividade da enzima. Foi demonstrado, também, que o antioxidante hidroxitolueno butilado não é capaz de inibir a atividade da PKC, em plaquetas (Freedman *et al.*, 1996).

Outra explicação para a ausência de efeito do Trolox sobre a atividade da PKC, seria que este sendo hidrossolúvel, não teria uma ação efetiva em ambientes hidrofóbicos, como as membranas biológicas, onde se localiza a forma ativa da PKC.

A estaurosporina inibe irreversivelmente a PKC, através de sua ligação ao domínio catalítico da enzima (Tamaoki, 1991). Nossos resultados mostram que a estaurosporina inibe, eficientemente, a atividade da PKC (ao redor de 80%) e a genisteína, um inibidor de tirosina quinases (Akiyama & Ogawara, 1991) não altera a atividade da enzima (figura 28).

Este grupo de experimentos mostra, que o α -tocoferol tem uma ação distinta à do Trolox e semelhante à da estaurosporina, inibindo diretamente a atividade da PKC.

5.4.3 Estudo dos efeitos da caliculina A sobre a atividade da PKC de neutrófilos e sobre os efeitos inibitórios do α -tocoferol

A caliculina A, substância extraída da esponja marinha *Discodermia calyx* (Kato et al., 1986) possui propriedades tumorigênicas devido a sua ação inibitória sobre serina/treonina fosfatases, principalmente as PP1 e PP2A (Ishihara et al., 1989). Utilizamos, assim, este composto para verificar o possível efeito do AT sobre a atividade de serina/treonina fosfatases, modulando, assim, a atividade da PKC.

Nossos resultados mostram que nas concentrações mais baixas, a caliculina A é capaz de reverter, parcialmente, a inibição da atividade da PKC pelo α -tocoferol. Entretanto, em concentrações mais altas (100 nM) a caliculina A não alterou o efeito da vitamina E. Quando as células foram incubadas apenas com caliculina A esta, por si mesma, em todas as concentrações utilizadas, provoca uma inibição da PKC, semelhante à ocasionada pela vitamina E (figura 29). Estes resultados poderiam ser explicados, em termos de uma regulação negativa da atividade da PKC por proteólise, quando a enzima está hiperfosforilada (Tasinato et al. 1997). Desta forma, a caliculina A, através da inibição de serina/treonina fosfatases, estaria, indiretamente, promovendo uma hiperfosforilação da PKC, resultando na inativação da enzima.

Na presença de α -tocoferol e de baixas concentrações de caliculina A, o efeito inibitório do α -tocoferol sobre a PKC é revertido, parcialmente. Nesta condições, pode-se sugerir que o α -tocoferol não age somente sobre a PKC. Ele exerceria, também, um efeito ativador de serina/treonina fosfatases. Dá suporte a

esta proposta, a inibição destas enzimas por baixas concentrações de caliculina A, resultando na recuperação significativa da atividade da PKC, das células incorporadas com α -tocoferol. Entretanto, em concentrações mais altas de caliculina A, o efeito da vitamina E não foi revertido, uma vez que a inativação da enzima se deve a sua hiperfosforilação.

5.5 Fosforilação em resíduos de tirosina de proteínas de neutrófilos humanos

Um dos primeiros eventos observados após a ativação de neutrófilos é a rápida indução de fosforilação de proteínas, a qual desempenha um papel essencial na regulação das funções dessas células. A ativação de diversas quinases incluindo, tirosinas quinases, proteína quinase C, proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP quinases), proteínas quinases dependentes de cálcio/calmodulina, proteínas ribossomal S6 quinases e proteína quinase histona H4, foi observada após a estimulação dos neutrófilos (*Zu et al., 1996*).

Muitos agentes solúveis como, a N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) (*Dusi & Rossi, 1994*), o fator de necrose tumoral, o fator estimulador de colônia granulócito-monócito, o PMA e o fator ativador de plaquetas (*Nahas et al., 1996*) induzem a fosforilação de resíduos de tirosina. Têm sido demonstrado que estímulos, que agem via receptor, podem ativar o "burst" oxidativo de neutrófilos através de vias que dependem da ação de tirosina quinases (TK) (*Kusunoki et al., 1992*). Ao contrário, ativadores da PKC, como o PMA, independem da ação de TK

para a produção de ERO/ERN pelos neutrófilos (*Utsumi et al., 1992; Tanimura et al., 1992*).

Nossos resultados mostram que ambos os estímulos utilizados, Zy e PMA, causam um incremento na fosforilação em tirosina de proteínas com peso molecular aparente de 88, 66, 58, 52, 44, 42 e 38 kDa, em relação às células não estimuladas. Este aumento é mais evidente nos neutrófilos estimulados com Zy (figura 30).

Sabe-se que lipopolissacarídeos (LPS) peptídeos formilados (fMLP) e PMA induzem a fosforilação de uma proteína de 38 kDa, a qual imunoprecipita com o anticorpo anti-MAP quinase (*Nahas et al., 1996; El Benna et al., 1996*). Outras proteínas da família das MAP quinases também são fosforiladas em neutrófilos humanos estimulados. Fialkow *et al.* (1994) mostraram que agentes oxidantes estimulam a fosforilação em tirosina de um "doublet" de proteínas de 42 e 44 kDa, as quais correspondem às ERK1/ERK2, MAP quinases. A ativação de neutrófilos com concavalina A, PMA ou fMLP, também resulta na fosforilação em tirosina de duas isoformas das MAP quinases, com pesos moleculares aparentes de 43 e 45 kDa (*Dusi et al., 1994*).

A proteína fosforilada em tirosina, com aproximadamente 58 kDa, encontrada em nossos experimentos, poderia ser a Hck resultados (fig.). Mohn *et al.* (1995) mostraram que 4 bandas, de pesos moleculares aparentes de 59, 60, 61 e 63 kDa, são formas autofosforiladas da Hck. A tirosina quinase, Lyn, cujo peso molecular é de 53-56 kDa, também é fosforilada em tirosina em neutrófilos estimulados por diversos agonistas (*Gaudry et al., 1995; Ptasznik et al., 1995*). Além disso, a proteína adaptadora, Shc, que também é fosforilada em tirosina e apresenta 3 isoformas com pesos moleculares aparentes de 46, 52 e 66 kDa,

seria outra possibilidade (Fialkow *et al.*, 1994). Por outro lado, a forma heterodimérica da PI-3 quinase, composta por uma subunidade regulatória de 85 kDa e uma subunidade catalítica de 110 kDa (Al-Shami *et al.*, 1997) também seria candidata. A proteína fosforilada em tirosina, com peso molecular aproximado de 88 kDa, identificada no presente estudo, poderia corresponder à subunidade regulatória desta proteína.

5.5.1 Estudo dos efeitos do α -tocoferol sobre os níveis de fosforilação em tirosina de proteínas de neutrófilos

Os efeitos do AT na fosforilação em tirosina de proteínas, nos neutrófilos estimulados por Zy ou PMA, encontrados neste estudo, são antagônicos. Enquanto, o AT causa uma diminuição nos níveis de fosforilação das proteínas dos neutrófilos estimulados com Zy, nas células estimuladas com PMA, ele induz um aumento na fosforilação em tirosina (figura 30). Mourad & Stern (1994) mostraram que a ativação da PKC, pelo PMA, inibe a autofosforilação em tirosina de receptores de membrana estimulados por EGF, em células HER 14. Estes receptores possuem um sítio de fosforilação em serina/treonina que, uma vez, ocupado, inibe a autofosforilação em tirosina dos mesmos. Esta inibição resulta no bloqueio de toda a cascata de fosforilação de tirosinas quinases intracelular. Outras tirosinas quinases citossólicas também são inibidas quando da sua fosforilação em resíduos de serina/treonina. Assim, a inibição da PKC pelo AT, impediria que a enzima fosforilasse os sítios inibitórios das quinases, possibilitando, a ativação da cascata de fosforilação em tirosina.

Por outro lado, os efeitos inibitórios do AT sobre a fosforilação em tirosina de proteínas dos neutrófilos estimulados com Zy, dever-se-ia à reversão pelo AT, da inibição de tirosinas fosfataese causada pelo Zy (figura 35), resultando aumento da fosforilação (figura 35).

5.5.2 Estudo comparativo dos efeitos do α -tocoferol, do Trolox, da estaurosporina e da genisteína nos níveis de fosforilação em tirosina de proteínas de neutrófilos

Os efeitos da estaurosporina sobre os níveis de fosforilação em tirosina de proteínas de neutrófilos, são semelhantes ao do AT, ou seja, este antagonista promove aumento de fosforilação em células estimuladas por PMA (figura 32) e, uma diminuição, nas células estimuladas por Zy (figura 34). Por sua vez, a genisteína diminui os níveis de fosforilação em tirosina de proteínas nas células estimuladas, tanto por PMA, quanto por Zy (figuras 32, 34). Este aumento observado nos níveis de fosforilação de proteínas em neutrófilos estimulados por PMA, induzido pelo AT e pela estaurosporina, pode sugerir uma ação inibitória da vitamina E sobre a PKC.

Os efeitos do Trolox, sobre a fosforilação em tirosina de proteínas de neutrófilos estimulados por Zy, são semelhantes aos descritos para o AT, ou seja, uma diminuição desta fosforilação (figura 33). Entretanto, nas células estimuladas por PMA, o Trolox não exerce nenhum efeito (figura 31). Este último resultado, em conjunto como os dados sobre os efeitos do At e do Trolox na atividade da PKC

(figura 28) indicam que, diferentemente do AT, o Trolox não apresenta uma ação sobre a atividade da PKC.

5.6 Efeitos do α -tocoferol e do Trolox sobre a atividade de PTPs de neutrófilos

Os níveis de proteínas fosforiladas em tirosina são reguladas pelas atividades competitivas de proteínas tirosina quinases e proteínas tirosina fosfatases. baseados neste fato, nós investigamos os efeitos do α -tocoferol e do seu análogo solúvel, Trolox, sobre a atividade de PTPs de neutrófilos estimulados com PMA e Zy. Ambos os estímulos inibem a atividade de PTPs, quando comparadas com células não-estimuladas; entretanto, a pré-incubação com α -tocoferol reverte a inibição da atividade das PTPs nas células estimuladas. O efeito não significativo do Trolox sobre a inibição das tirosinas fosfatases das células estimuladas, pode ser devido a sua hidrosolubilidade, impedindo que ele aja sobre tirosinas fosfatases de membrana (figura 35).

As principais PTPs presentes nas células hematopoiéticas, incluindo neutrófilos, são a CD45 e a SHP-1 (*Trowbridge et al., 1991; Okumura & Thomas, 1995*). A CD45 é uma PTP transmembranar, que após sua estimulação, desloca-se dos grânulos específicos para a membrana plasmática (*Cui et al., 1994*). A SHP-1 (também conhecida como PTP1C, PTP-N6 e SHPTP-1) uma PTP solúvel, está associada, preferencialmente, ao citoesqueleto, após estimulação. Tem sido demonstrado que a CD45, mas não a SHP-1 é inativada por oxidantes, cujo efeito é revertido por antioxidantes como DTT, N-acetilcisteína ou GSH (*Brumell et al.,*

1997). Esta regulação redox da atividade da CD45 pode estar envolvida com a oxidação de grupos sulfidrilas críticos, presentes no domínio catalítico da enzima, resultando numa diminuição de sua atividade. Também foi demonstrado, que o PMA inibe a atividade de PTPs de neutrófilos (*Kansha et al., 1993*) a qual não está relacionada com a CD45; esta afirmação está baseada no fato dos autores não terem obtido nenhum efeito resultante da ativação da PKC, sobre a CD45.

Nossos resultados estão de acordo com outros trabalhos, que também avaliam a atividade total das PTPs, em neutrófilos estimulados com PMA ou FMLP; os autores relataram uma diminuição da atividade enzimática total nestas células, após estímulo (*Cui et al., 1994; Kansha et al., 1993*). Baseados nesses achados, podemos sugerir que as duas principais PTPs presentes nos neutrófilos são diferentemente reguladas e que, o α -tocoferol poderia agir sobre elas através de mecanismos distintos: inibindo a atividade de PKC, aumentando assim, a atividade da SHP-1 e/ou protegendo os grupos sulfidrilas da CD45, através de sua ação antioxidante. Desta forma, a regulação da atividade de fosfatases, sob condições oxidantes e antioxidantes, pode representar um mecanismo importante, que participa da transdução de sinal em neutrófilos.

Os resultados da atividade de PTPs mostram algumas semelhanças entre os efeitos do α -tocoferol e do Trolox. Entretanto, os diferentes resultados obtidos nos experimentos usando as duas substâncias e avaliando a produção de ERO/ERN, a fosforilação em tirosina das células estimuladas por PMA e a atividade de PKC, sugerem que o α -tocoferol, por estar localizado em sistemas de membrana, exerce sua atividade, principalmente sobre proteínas ligadas a este

sistema, como a PKC e a CD45. O Trolox, por sua vez, agiria apenas como antioxidante solúvel, sendo sua ação restrita aos ambientes hidrofílicos da célula.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

O conjunto de resultados obtidos e discutidos nesta tese permitem as seguintes conclusões:

- 1- O α -tocoferol modula ambas as vias de sinalização, dependentes e independentes de PKC, envolvidas na ativação da NADPH oxidase, em neutrófilos humanos.
- 2- Esta modulação é exercida pelo α -tocoferol, através da ativação de serina/treonina e tirosina fosfatases (figura 36).

Figura 36: Possível mecanismo de ação do α -tocoferol sobre as vias de sinalização envolvidas na ativação da NADPH oxidase.

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

7. REFERÊNCIAS

- ABATE, C. ; PATEL, L. ; RAUSCHER, F.J. ; CURRAN T. Redox regulation of fos and jun DNA. Binding activity in vitro. **Science**. v. 249, p. 1157-64, 1990.
- AKIYAMA, T.; OGAWARA, H. Use and specificity of genistein as inhibitor of protein tyrosine kinases. **Meth. Enzymol.** v. 201, p. 362-70, 1991.
- ALLEN, R.C. Phagocytic leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence; a kinetic approach to analysis. In: De LUCA, M. A.; McELROY, W. D. eds. **Methods in Enzymology**. San Diego, Academic Press. v.133, 1986, p.449-93.
- ALLEN, R. C.; STJERNHOLM, R.I.; STEELE, R.H. Evidence for the generation of an eletronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 47, p. 679-84, 1972.
- AL-SHAMI, A.; BOURGOIN, S.G.; NACCAGHE, P.H. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-activated signaling pathways in human neutrophils. I. Tyrosine phosphorylation-dependent stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase and inhibition by phorbol esters. **Blood**. v. 89, p. 1035-44, 1997.
- ANDERSON, N. G.; MALLER, J. L.; TONKS, N. K.; STURGILL, T. W. Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. **Nature**. v. 343, 651-3, 1990.
- ARITA, M. ; SATO, Y. ; MIYATA, A. ; TANABE, T. ; TAKAHASHI, E. ; KAYDEN, H. J. ; ARAI, H. ; INOUE, K. Human α -tocopherol transfer protein : cDNA cloning, expression and chromosomal localization. **Biochem**. v. 306, p. 437-43, 1995.
- AZZI, A.; BOSCOBOINIK, D.; CHATELAIN, E.; ÖZER, N.K.; STÄUBLE, B. d- α -Tocopherol control of cell proliferation. **Molec. Aspects Med.** v. 14, p. 265-71, 1993.
- AZZI, A. ; BOSCOBOINIK, D. ; MARILLEY, D. ; ÖZER, N. K. ; STÄUBLE, B. Vitamin E : a sensor and an information transducer of the cell oxidation state. **Am. J. Clin. Nut.** v. 62S, p. 1337S-46S, 1995.
- BABIOR, B. M.; KIPNES, R. S.; CURNUTTE, J. T. Biological defense mechanisms : the production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. **J. Clin. Invest.** v. 52, p. 741- 4, 1973.

- BABIOR, B. M. Protein phosphorylation and the respiratory burst. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 264, p. 361-367, 1988.
- BABIOR, B.M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, p. 1464-1476, 1999.
- BABIOR, B.M. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. **N. Engl. J. Med.** v. 298, p. 659-668, 1978.
- BAGGIOLINI, M.; THELEN, M. The phagocytes and the respiratory burst . In: SIES, H. ed. **Oxidative stress: oxidants and antioxidants**. London. Academic Press, p. 399-419, 1991.
- BAEHNER, R. L. ; BOXER, L. A. ; ALLEN, J. M. ; DAVIS, J. Autooxidation as a basis for altered function by polymorphonuclear leukocytes. **Blood**. v. 50, p. 327-35, 1977.
- BARROLA, I.; VOSSEBELD, P.J.M.; HOMBURG, C.H.E.; THELEN, M.; ROSS, D.; VERHOEVEN, A.J. Influence of tyrosine phosphorylation on protein interaction with Fc γ RIIa. **Biochim. Biophys. Acta**. V. 1357, p. 348-58, 1997.
- BECKMAN, J. S.; BECKMAN, T. W.; CHEN, J.; MARSHALL, P. A.; FREEMAN, B. A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 87, 1620-4, 1990.
- BERKOW, R.L.; DODSON, R.W.; KRAFT, A. S. Human neutrophils contain distinct cytosolic and particulate tyrosine kinase activities: possible role in neutrophil activation. **Biochim. Biophys. Acta**. p. 292-301, 1989.
- BERKOW, R.L.; DODSON, R. W.; Tyrosine-specific protein phosphorylation during activation of human neutrophils. **Blood**. v. 75, p. 2445-52, 1990.
- BLANK, J. L.; GERWISN, P.; ELLIOTT, E. M.; SATHER, S.; JOHNSON, G. L. Molecular cloning of mitogen-activated protein/ERK kinases(MEKK) 2 e 3. **J. Biol. Chem.** v. 271, p. 5361-8, 1996.
- BORNER, C.; FILIPUZZI, I.; WARTMANN, M.; EPPENBERGER, U.; FABBRO, D. Biosynthesis and postranslational modifications of protein kinase C in human breast cancer cells. **J. Biol. Chem.** v. 264, p. 13902-9, 1989.
- BOSCOBOINICK, D. ; SZEWCZYK, A. ; AZZI, A. α -Tocopherol (vitamin E) regulates vascular smooth muscle cell proliferation and protein kinase C activity. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 286, p. 264-9, 1991.

- BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem. J.** v. 134, p. 707-16, 1973.
- BOXER, L. A.; AXTELL, R.; SUCHARD, S. The role of the neutrophil in inflammatory diseases of the lung. **Blood Cells.** v. 16, p. 25-42, 1990.
- BOXER, L.A.; OLIVER, J.M.; SPIELBERG, S.P.; ALLEN, J.M.; SCHULMAN, J.D. Protection of granulocytes by vitamin E in glutathione synthetase deficiency. **N. Engl. J. Med.** v. 301, p. 9901-5, 1979.
- BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by centrifugation; and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. Scan. **J. Clin. Lab. Invest.** v.21, p. 77-89, 1968.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248-54, 1976.
- BRADY-KALNAY, S. M. ; TONKS, N. K. Protein tyrosine phosphatases as adhesion receptors. **Curr. Opinion Cell Biol.** v. 7, p. 650-7, 1995.
- BRAWN, M. K. ; CHIOU, W. J. ; LEACH, K. L. Oxidant-induced activation of protein kinase C in UC11MG cells. **Free Rad. Res.** v. 22. p. 23-37, 1995.
- BRESTEL, E. P. Co-oxidation of luminol by hypochlorite and hydrogen peroxide. Implications for neutrophil chemiluminescence. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 1226, p. 482-8, 1985.
- BRUMELL, J. ; CHAN, C. K. ; BUTLER, J. ; BORREGAARD, N. ; SIMINOVITCH, K. A. ; GRINSTEIN, S. ; DOWNEY, G. P. Regulation of src homology 2-containing tyrosine phosphatase 1 during activation of human neutrophils. **J. Biol. Chem.** v. 272, p. 875-82, 1997.
- BUDAY, L. Membrane-targeting of signalling molecules by SH2/SH3 domain-containing adaptor proteins. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1422, p. 187-204, 1999.
- BUHL, A.M.; AVDI, N.; WORTHEN, G.S.; JOHNSON, G.L. Mapping of the C5a receptor signal transduction network in human neutrophils. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 91, p. 9190-4, 1994.

- BURDON, R. H.; RICE-EVANS, C. Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation. **Free Radic. Res. Comm.** v. 6, p. 345-58, 1989.
- BURTON, G. W. Vitamin E ; antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. **Ann. Rev. Nutr.** v. 10, p. 357-82, 1990.
- BURTON ,G. W.; INGOLD, K. U. Vitamin E as an vitro and in vivo antioxidant. **Ann. NY Acad. Sci.** v. 570, p. 7-22, 1989.
- CACHIA, O. ; EL BENNA, J. ; PEDRUZZI, E. ; DESCOMPS, B. ; GOUGEROT-POCIDALO, M. ; LÉGER, C. α -Tocopherol inhibits the respiratory burst in human monocytes. **J. Biol. Chem.** v. 273, p. 32801-5, 1998.
- CAI, Z.; LI, X.; KATSUMURA, Y. Interaction of hydrated electron with dietary flavonoids and phenolic acids: rate constants and transient spectra estudied by pulse radiolysis. **Free Rad. Biol. Med.** v. 27, p.822-5, 1999.
- CALZADA, C. ; BRUCKDORFER, K. R.; RICE-EVANS, C. The influence of antioxidant nutrients on platelet function in healthy volunteers. **Atherosclerosis.** v. 128, p. 97-105, 1997.
- CARRERAS, M. C.; RIOBÓ, N. A.; PARGAMENT, G. A.; BOVERIS, A.; PODEROSO, J. J. Effects of respiratory burst inhibitors on nitric oxide production by human neutrophils. **Free Rad. Res.** v. 26, p. 325-34, 1997.
- CAZAUBON, S.; WEBSTER, C.; CAMOIN, L.; STROBERG, A. D.; PARKER, P. J. Effector dependent conformational-changes in protein kinase C γ epitope mapping with inhibitory monoclonal antibodies. **Eur. J. Biochem.** v. 194, p. 799-804, 1990.
- CHAI, Y. C. ; HOWE, P. H. ; DICORLETO, P. E. ; CHISOLM, G. M. Oxidized low density lipoprotein and lysophosphatidylcholine stimulate cell entry in vascular smooth muscle cells. Evidence for release of fibroblast growth factor-2. **J. Biol. Chem.** v. 271, p. 17791-7, 1996.
- CHAN, S.S.; MONTEIRO, H.P.; DEUCHER, G.P.; ABUD, R.L.; ABUCHALLA, D.; JUNQUEIRA, V.B.C. Functional activity of blood polymorphonuclear leukocytes as an oxidative stress biomarker in human subjects. **Free Rad. Biol. Med.** v. 24, p. 1411-18, 1998.
- CHEN, Z.; GUNDIMEDA, U.; GOPALAKRISHNA, R. Curcumin irreversibly inactivates protein kinase C activity and phorbol ester binding: its possible role

- in cancer chemoprevention. **Proc. Am. Assoc. Cancer Res.** v. 37, p. A1922, 1996.
- CHEUNG, K.; ARCHIBALD, A.C.; ROBINSON, M.F. The origin of chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by opsonized zymosan. **J. Immunol.** v. 130, p. 2324-9, 1983.
- CLARK, R. A. The human neutrophil respiratory burst oxidase. **J. Infect. Dis.** v. 161, p. 1140-7, 1990.
- COBB, M. B.; GOLDSMITH, E. J. How MAP kinases are regulated. **J. Biol. Chem.** v. 270, p. 14843-6, 1995.
- COCHET, C.; GILL, G.N.; MEISENHELDER, J.; COOPER, J.A.; HUNTER, T. C-kinase phosphorylates the epidermal growth factor receptor and reduces its epidermal growth factor-stimulated tyrosine protein kinase activity. **J. Biol. Chem.** v.259, p. 2553-8, 1984.
- COGNY, A. ; PAUL, J. L. ; SONI, T. ; ATGER, V. ; MOZTTI, N. Vitamine E : métabolisme et role dans l'athérosclérose. **Ann. Biol. Clin.** v. 52, p. 515-22, 1994.
- COHEN, P.; COHEN, P. T. W. Protein phosphatases come of age. **J. Biol. Chem.** v. 264, 21435-8, 1989.
- COMINACINI, L. ; GARBIN, U. ; PASINI, A. F. ; DAVOLI, A. ; CAMPAGNOLA, M. ; CONTESSI, G. B. ; PASTORINO, A. M. ; CASCIO, V. L. Antioxidants inhibit the expression of intercellular cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 induced by oxidized LDL on human umbilical vein endothelial cells. **Free Rad. Biol. Med.** v. 22, p. 117-27, 1997.
- COX, J. A.; JENG, A. Y.; SHARKEY, N. A.; BLUMBERG, P. M.; TAUBER, A. I. Activation of the human neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-oxidase by protein kinase C. **J. Clin. Invest.** v. 76, p. 1932-8, 1985.
- CROSS, A. R.; JONES, O. T. G. Enzymic mechanisms of superoxide production. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1057, p. 281-98, 1991.
- CUI, Y. ; HARVEY, K. ; AKARD, L. ; JANSEN, J. ; HUGHES, C. ; SIDDIQUI, R. A. ; ENGLISH, D. Regulation of neutrophil responses by phosphotyrosine phosphatase. **J. Immunol.** v. 152, p. 5420-8, 1994.

- CZECH, M. P.; LAWRENCE, J. C.; LYNN, W. S. Evidence for electron transfer reactions involved in the Cu^{2+} -dependent thiol activation of fat cell glucose utilization. **J. Biol. Chem.** v. 249, p. 1001-6, 1974.
- DECHALET, L.R.; LONG, G.D.; SHIRLEY, P.S.; BASS, D.A.; THOMAS, M.J.; HENDERSON, F.W.; COHEN, M.S. Mechanism of luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils. **J. Immunology.** v. 129, p. 1589-93, 1982.
- DELEO, F. R.; QUINN, M. T. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. **J. Leucoc. Biol.** v. 60, p. 677-91, 1996.
- DEVARAJ, S. ; ADAMS-HUET, B. ; FULLER, C. J. ; JIALAL, I. Dose-response comparison of RRR- α -tocopherol and all-racemic α -tocopherol on LDL oxidation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v. 17, p. 2273-9, 1997.
- DJERDJOURI, B.; COMBADIÈRE, C.; PEDRUZZI, E.; HAKIM, J.; PÉRIANIN, A. Contrasting effects of caliculin A and okadaic on the respiratory burst of human neutrophils. **Eur. J. Pharmacol.** v. 288, p. 193-200, 1995.
- DING, J.; BADWEY, J. Effects of antagonists of protein phosphatases on superoxide release by neutrophils. **J. Biol. Chem.** v. 267, p. 6442-8, 1992.
- DOWNEY, G. P.; BUTLER, J. R.; BRUMELL, J.; BORREGAARD, N.; KJELDSSEN, L.; SUE-A-QUANT, A. K.; GRINSTEIN, S. Chemotactic peptide-induced activation of MEK-2, the predominant isoform in human neutrophils. **J. Biol. Chem.** v. 270, p. 21005-11, 1996.
- DUSI, S. ; DONINI, M. ; ROSSI, F. Tyrosine phosphorylation and activation of NADPH oxidase in human neutrophils: a possible role of MAP kinases and for a 75 kDa protein. **Biochem. J.** v. 304- 10, 1994.
- DUTIL, E. R.; KERANEN, L. M.; DePAOLI-ROACH, A. A.; NEWTON, A. C. In vivo regulation of protein kinase C by trans-phosphorylation followed by autophosphorylation. **J. Biol. Chem.** v. 269, p. 29359-62, 1994.
- EDWARDS, S.W. **Biochemistry and physiology of the neutrophil.** Cambridge University Press, 1994, p. 188-194.
- EASMON, C. S.; COLE, P. J.; WILLIAMS, A. J.; HASTINGS, M. The measurement of opsonic and phagocytic function by luminol-dependent chemiluminescence. **Immunology.** v. 41, p. 67-74, 1980.

- EL BENNA, J.; PARK, J. W.; RUEDI, J. M.; BABIOR, B. M. Cell-free activation of the respiratory burst oxidase by protein kinase C. **Blood Cells Mol. Dis.** v. 21, p. 201-6, 1995.
- EL BENNA, J.; HAN, J.; PARK, J.; SCHMID, E.; ULEVITCH, R.J.; BABIOR, B.M. Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47^{phox} by p38 and ERK but not by JNK. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 334, p. 395-400, 1996.
- EL BENNA, J.E.; DANG, P.M.; GAUDRY, M.; FAY, M.; MOREL, F.; HAKIM, J.; GOUGEROT-POCIDALO, M. Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p67^{phox} during human neutrophil activation. **J. Biol. Chem.** v. 272, p. 17204-8, 1997.
- FARUQI, R. ; DE-LA-MOTTE, C. ; DICORLETO, P. E. α -Tocopherol inhibits agonist-induced monocytic cell adhesion to cultured human endothelial cells. **J. Clin. Invest.** v. 94, p. 592-600, 1994.
- FENG, G. ; PAWSON, T. Phosphotyrosine phosphatases with SH2 domains : regulators of signal transduction. **TIG.** v. 10, p. 54-8, 1994.
- FIALKOW, L.; CHAN, C. K.; ROTIN, D.; GRINSTEIN, S.; DOWNEY, G. P. Activation of the mitogen-activated protein kinase signalling pathway in neutrophils. **J. Biol. Chem.** v. 269, p. 31234-42, 1994.
- FLINT, A. J.; PALADINI, R. D.; KOSHLAND, D. E. Autophosphorylation of protein kinase C at three separated regions of its primary sequence. **Science.** v. 24, p. 408-11, 1990.
- FREEDMAN, J.E. ; FARHAT, J.H. ; LOSCALZO, J. ; KEANEY, J. F. α -Tocopherol inhibits aggregation of human platelets by a protein kinase C-dependent mechanism. **Circulation.** v. 94, p. 2434-40, 1996.
- FRITZCHE, R.; DEVECK, A. L. Chemiluminescence microscopy reveals functional heterogenicity in single neutrophils undergoing oxygen burst. **Eur. J. Immunol.** v. 18, p. 817-20, 1988.
- GAUDRY, M. ; BARABÉ, C. G. ; POUBELLE, P. E. ; NACCACHE, P. H. Activation of Lyn is a common element of the stimulation of human neutrophil by soluble and particulate agonists. **Blood.** v. 86, p. 3567-73, 1995.

- GALLAGHER, K. E.; BETTERIDGE, L. G.; PATEL, M. K.; SCHACTER, M. Effects of oxidants on vascular smooth muscle proliferation. **Biochem. Soc. Trans.** v. 21, p. 985-93, 1993.
- GOMEZ, N.; COHEN, P. Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases. **Nature.** v. 353, p. 170-3, 1991.
- GOMES-CAMBRONERO, J.; HUANG, C.K.; BONAK, V. A.; WANG, E.; CASNEILLE, J. E.; SHIRAISHI, T.; SHA'FI, R. I. Tyrosine phosphorylation in human neutrophils. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** p. 1478-85, 1989.
- GOPALAKRISHNA, R. ; ANDERSON, W. B. Susceptibility of protein kinase C to oxidative inactivation: loss of both phosphotransferase activity and phorbol diester binding. **FEBS Lett.** v. 225, p. 233-7, 1987.
- GOPALAKRISHNA, R. ; ANDERSON, W. B. Ca²⁺- and phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 86, p. 6758-62, 1989.
- GOPALAKRISHNA, R. ; CHEN, Z. H. ; GUNDIMEDA, U. Nitric oxide and nitric oxide-generating agents induce a reversible inactivation of protein kinase C activity and phorbol ester binding. **J. Biol. Chem.** v. 268, p. 27180-5, 1993.
- GOPALAKRISHNA, R.; CHEN, Z. H.; GUNDIMEDA, U. Modification of cysteine-rich regions in protein kinase C induced by oxidant tumor promoters and the enzyme specific inhibitors. **Meth. Enzymol.** v. 252, p. 134-48, 1995.
- GOPALAKRISHNA, R.; GUNDIMEDA, U.; CHEN, Z. Cancer preventive selenocompounds induce a specific redox modification of cysteine-rich regions in calcium-dependent isoenzymes of protein kinase C. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 348, p. 25-36, 1997.
- GOPALAKRISHNA, R.; JAKEN, S. Protein kinase C signaling and oxidative stress. **Free Rad. Biol. Med.** v. 28, p. 1349-61, 2000.
- GRISHAM, M. B.; JEFFERSON, M. M.; MELTON, D. F.; THOMAS, E. L. Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils. Ammonia-dependent bactericidal, cytotoxic and cytolytic activities of the chloramines. **J. Biol. Chem.** v. 259, p. 10404-10, 1984.
- HALSTENSSEN, A.; HANENBERG, B.; GLETTE, J.; SANDBERG, S.; SOLBERG, C. O. Factors important for the measurement of chemiluminescence

- production by polymorphonuclear leukocytes. **J. Immunol. Meth.** v. 88, p. 121-8, 1986.
- HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. **Blood.** v. 92, 3007- 17, 1998.
- HAN, J.; LEE, J. D.; JIANG, Y.; LI, Z.; FENG, L.; ULEVITCH, R. J. Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6). **J. Biol. Chem.** v. 271, p. 2886-91, 1996.
- HANADA M; KOBAYASHI T; OHNISHI M; IKEDA S; WANG H; KATSURA K; YANAGAWA Y; HIRAGA A; KANAMARU R; TAMURA S. Selective suppression of stress-activated protein kinase pathway by protein phosphatase 2C in mammalian cells. **FEBS Lett.** v. 437, p. 172-6, 1998.
- HATAM, L. J.; KAYDEN, H. J. A high-performance liquid chromatographic method for the determination of tocopherol in plasma and cellular elements of the blood. **J. Lipid Res.** v. 20, p. 639-45, 1979.
- HUANG, N. ; LINEBERG, B. ; STEINER, M. α -Tocopherol, a potent modulator of endothelial cell function. **Tromb. Res.** v. 50, p. 547-57, 1988.
- HUE, R. E.; PADMAJA, S. The reaction of NO with superoxide. **Free Rad. Res. Commun.** v. 18, p. 195-9, 1993.
- HUG, H.; SARRE, T. F. Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction. **Biochem. J.** v. 291, p. 329-43, 1993.
- HUNTER, T.; LING, N.; COOPER, J. Protein kinase C phosphorylation of the EGF receptor at a threonine residue close to the cytoplasmic face of the plasma membrane. **Nature**, v. 311, p. 480-3, 1984.
- HYSLOP, P. A.; HINSHAW, D. B.; SCRANFSTATTER, I. U.; COCHRANE, C. G.; KUNZ, S.; VOSBECK, K. Hydrogen peroxide as a potent bacteriostatic antibiotic: implications for host defense. **Free Rad. Biol. Med.** v. 19, p. 31-43, 1993.
- IGNARRO, L. J.; LIPPTON, H.; EDWARD, J. C.; BARICOS, W. H.; HYMAN, A. L.; KADOWITZ, P. J.; GRUETTER, C. A. Mechanism of vascular smooth muscle relation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 218, p. 739-49, 1981.

- ISHIHARA, H.; MARTIN, B. L.; BRAUTIGAN, D. L.; KARAKI, H.; OZAKI, H.; KATO, Y.; FUSEYANI, N.; WATABE, S.; HASHIMOTO, K.; UEMURA, D.; HARTSHORNE, D.J. Calyculin A and Okadaic acid: inhibitors of protein phosphatases activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 159, p. 871-7, 1989.
- JANDAK, J. ; STEINER, M. ; RICHARDSON, P. D. α -Tocopherol, an effective inhibitor of platelet adhesion. **Blood.** v. 73, p. 141-9, 1989.
- KAGAN, V. E. ; SERBINOVA, E. ; FORTE, T. ; SCITA, G. ; PACKER, L. Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins. **J. Lipid Res.** v. 33, p. 385-97, 1992.
- KAMATA, M.; HIRATA, H. Redox regulation of cellular signalling. **Cell signal.** v. 11, p. 1-14, 1999.
- KANNO, T. ; UTSUMI, T. ; KOBUCHI, H. ; TAKEHARA, Y. ; AKIYAMA, J. ; YOSHIOKA, T. ; HORTON, A. A. ; UTSUMI, K. Inhibition of stimulus-specific neutrophils superoxide generation by alpha-tocopherol. **Free Rad. Res.** v. 22, p. 431-40, 1995.
- KANSHA, M.; TAKESHINGE, K.; MINAKAMI, S. Decrease in the phosphotyrosine phosphatase activity in the plasma membrane of human neutrophils on stimulation by phorbol 12-myristate 13-acetate. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1179, p.189-93, 1993.
- KATO, Y.; FUSEYANI, N.; MATSUNAGA, S.; HASHIMOTO, K. Calyculin A, a novel antitumor metabolite from the marine sponge discodermia calyx. **J. Am. Chem. Soc.** v. 108, p. 2780-1, 1986.
- KEANEY, J. F. ; GUO, Y. ; CUNNINGHAM, D. ; SHWAERY, G. T. ; XU, A. ; VITA, J. A. Vascular incorporation of α -tocopherol prevents endothelial dysfunction due to oxidized LDL by inhibiting protein kinase C stimulation. **J. Clin. Invest.** v. 98, p. 386-94, 1996.
- KENT, J. D.; SERGEANT, S.; BURNS, D. J.; McPHAIL, L. C. Identification and regulation of protein kinase C- δ in human neutrophils. **J. Immunol.** v. 157, p. 4641-7, 1996.
- KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Superoxide-dependent hydroxylation by myeloperoxidase. **J. Biol. Chem.** v. 269, p. 17146-53, 1994.

- KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Myeloperoxidase: a key regulator of neutrophil oxidant production. **Redox Rep.** v. 3, p. 3-8, 1997.
- KITSIS, E.; WEISSMANN, G. The role of the neutrophil in rheumatoid arthritis. **Clin. Orthoped. Related Res.** P. 63-72, 1991.
- KLEBANOFF, S.J. Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. **J. Bacteriol.** v. 95, p. 2131-5, 1968.
- KLEBANOFF, S.J. Role of the superoxide anion in the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system. **J. Biol. Chem.** v. 249, p. 3724-7, 1974.
- KLEBANOFF, S.J. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. **Ann. Intern. Med.** v. 93, p. 480-7, 1980.
- KONISHI, H.; TANAKA, M. TAKEMURA, Y.; MATSUZAKI, H.; ONO, Y.; KIKKAWA, U.; NISHIZUKA, Y. Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 94, p. 11233-7, 1997.
- KOSTNER, G. M.; OETTL, K.; JAUHAINEN, M.; EHNHOLM, C.; ESTEBAUER, H.; DIEPLINGER, H. Human plasma phospholipid transfer protein accelerates exchange/transfer of α -tocopherol between lipoproteins and cells. **Biochem. J.** v. 305, p. 659-67, 1995.
- KUNISAKI, M.; UMEDA, F.; INOUCHI, T.; NAWATA, H. Vitamin E binds to specific binding sites enhances prostacyclin production by cultured aortic endothelial cells. **Thromb. Haemost.** v. 68, p. 744-51, 1992.
- KUNISAKI, M.; BURSEL, S.; UMEDA, F.; NAWATA, H.; KING, G. L. Normalization of diacylglycerol-protein kinase C activation by vitamin E in aorta of diabetic rats and cultured rat smooth muscle cells exposed to elevated glucose levels. **Diabets.** v. 43, p. 1372-7, 1994.
- KUROKAWA, I.; IOSHIYUKIM T.; NAGAI, T.; KAMIMURA, M. The effect of vitamin E on the adenosine diphosphate induced platelet aggregation. **J. Vitaminol.** v. 17, p. 181-5, 1971.
- KUSUNOKI, T.; HIGASHI, H.; HOSOI, S.; HATA, D.; SUGIE, K. Tyrosine phosphorylation and its possible role in superoxide production by human neutrophils stimulated with FMLP and IgG. **Biochem. Biophys. Res. Com.** v. 183, p. 789-96, 1992.

- LABADIA, M.E.; ZU, Y.; HUANG, C. A synthetic peptide containing a predominant protein kinase C site within p47^{phox} inhibits the NADPH oxidase in intact neutrophils. **J. Leukoc. Biol.** v. 59, p. 116-24, 1996.
- LAFONT, A. M.; CHAI, Y. C. ; CORNHILL, J. F. ; WHITLOW, P. L. ; HOWE, P. H. ; CHISOLM, G. M. Effect of alpha-tocopherol on restenosis after angioplasty in a model of experimental atherosclerosis. **J. Clin. Invest.** v. 95, p. 1018-25, 1995.
- LANG, J. K.; GOHIL, K.; PACKER, L. Simultaneous determination of tocopherols, ubiquinols, and ubiquinones in blood, plasma, tissue homogenates, and subcellular fractions. **Anal. Biochem.** v.157, p. 106-16, 1986.
- LANGE-CARTER, C. A.; PLEIMAN, C. M.; GARDNER, A. M.; BLUMER, K. J.; JOHNSON, G.L. A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. **Science.** v. 260, p. 315-9, 1993.
- LAVOIE, J. N.; L'ALLEMAIN, G.; BRUNET, A.; MÜLLER, R.; POUYSSEGUR, J. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/44^{MAPK} and negatively by the p38/HOG^{MAPK} pathway. **J. Biol. Chem.** v. 271, p. 20608-16, 1996.
- LÉGER, C. L. Vitamin E, tocopherols, composés apparentés et structure membranaire. In : **Vitamin E, tocopherols et composés apparentés**. C. L. Léger, ed. Polytechnica, Paris, 1992.
- LIN, A.; MINDEN, A.; MARTINETTO, H.; CLARET, F. X.; LANGE-CARTER, C.; MERCURIO, F.; JOHNSON, G.; KARIN, M. Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. **Science.** v. 268, p. 286-96, 1995.
- MABILE, L.; FITOUSSI, G.; PERIQUET, B.; SCHIMITT, A.; SALVAYRE, R.; NÈGRE-SALVARE, A.. α -Tocopherol and Trolox block the early intracellular events (TBARS and calcium rises) elicited by oxidized low density lipoproteins in cultured endothelial cells. **Free Rad. Biol. Med.** v. 19, p. 177-87, 1995.
- MAJUMDAR, S.; ROSSI, M. W.; FUJIKI, T.; PHILIPS, W. A.; DISA, S.; QUEEN, C. F.; JOHNSTON, R. B.; ROSEN, O. M.; CORKEY, B. E.; KORCHAK, H. M. Protein kinase C isotypes and signaling in neutrophils. **J. Biol. Chem.** v. 266, p. 9285-94, 1991.

- MARIDONEAU-PARINI, I.; TAUBER, A. I. Activation of NADPH-oxidase by arachidonic acid involves phospholipase A₂ intact human neutrophil but not in the cell-free system. **Biochem. Biophys. Res.** v. 138, p. 1099-105, 1986.
- MARTIN, A. ; WU, D. ; BAUR, W. ; MEYDANI, S. N. ; BLUMBERG, J. B. ; MEYDANI, M. Effect of vitamin E on human aortic endothelial cell responses to oxidative injury. **Free Rad. Biol. Med.** v. 21, p. 505-11, 1996.
- MARTIN, A. ; FOXALL, T. ; BLUMBERG, J. B. ; MEYDANI, M. Vitamin E inhibits low density lipoprotein-induced adhesion of monocytes to human aortic endothelial cells in vitro. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v. 17, p. 429-36, 1997.
- MAY, J. M.; DE HAEN, C. The insulin-like effect of hydrogen peroxide on pathways of lipid synthesis in rat adipocytes. **J. Biol. Chem.** v. 254, p. 9017-21, 1979.
- McPHAIL, L.C.; ELLENBURG, M.D.; LEONE, P. A.; AGWU, D.E.; McCALL, C.E; QUALLIOTINE-MANN, D.; STRUM, S.L. Molecular mechanism of activation of leukocyte superoxide production. In: JESAITS, A.J.; DRATZ, E.A eds. **The molecular basis of oxidative damage by leukocytes**. New York, CRC Press, 1991, p.11-24.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annu. Rev. Biochem.** v. 52, p. 711-60, 1983.
- MILLWARD, T. A.; ZOLNIEROWICZ, S.; HEMMINGS, B. A. Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. **TIBS.** v. 24, p. 186-91, 1999.
- MITSUI, A.; HIRAKAWA, T.; YODOI, J. Reactive oxygen-reducing and protein-refolding activities of adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin. **Biochem. Biophys. Res.** v. 186, p. 1220-6, 1992.
- MÓCSAI, A.; BÁNFI, B.; KAPUS, A.; FRAKAS, G.; GEISZT, M.; BUDAY, L.; FARAGÓ, A.; LIGETI, E. Differential effects of tyrosine kinase inhibitors and an inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade on degranulation and superoxide production of human neutrophil granulocytes. **Biochem. Pharmacol.** v. 54, p. 781-9, 1997.
- MOHN, H. ; Le CABEC, V. ; FISCHER, S. ; MARIDONEAU-PARINI, I. The src-family protein tyrosine kinase p59 hck is located on the secretory granules in

- human neutrophils and translocates towards the phagosome during cell activation. **Biochem. J.** v. 309, p. 657-62, 1995.
- MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N. Engl. J. Med.** v. 329, p. 2002-12, 1993.
- MONTEIRO, H. P. ; IVASCHENKO, Y. ; FISCHER, R. ; STERN, A. Inhibition of protein tyrosine phosphatase activity by epidermal growth factor in fibroblasts. **FEBS Lett.** v. 295, p. 146-8, 1991.
- MOURAD, E.; STERN, A. Inhibition of epidermal growth factor-dependent protein tyrosine phosphorylation by phorbol myristate acetate is mediated by protein tyrosine phosphatase activity. **FEBS Lett.** v. 339, p. 7-10, 1994.
- NAHAS, N.; MOLSKI, T. F. P.; FERNANDEZ, G. A.; SHA'AFI, R. I. Tyrosine phosphorylation and activation of a new mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascade in human neutrophils stimulated with various agonists. **Biochem. J.** v. 318, p. 247-53, 1996.
- NAKAMURA, K.; HORI, T.; SATO, N.; SUGIE, K.; KAWAKAMI, T.; YODOI, J. Redox regulation of a src family protein tyrosine kinase p56lck in T cells. **Oncogene.** v. 8, p. 3133-9, 1993.
- NALECZ, K. A. ; NALECZ, M. J. ; AZZI, A. Isolation of tocopherol-binding proteins from the cytosol of smooth muscle A7r5 cell. **Eur. J. Biochem.** v. 209, p. 37-42, 1992.
- NEMANI, R. ; LEE, E. Y. C. Reactivity of sulfhydryl groups of the catalytic subunits of rabbit skeletal muscle protein phosphatases 1 and 2A. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 300, p. 24-9, 1993.
- NEWTON, A. Protein kinase C: structure, function, and regulation. **J. Biol. Chem.** v. 270, p. 28495-8, 1995.
- NISHIZUKA, Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. **Nature** v. 334, p. 661-5, 1988.
- OKANO, T. ; TAMAI, H. ; MINO, M. Superoxide generation in leukocytes and vitamin E. **Int. J. Vit. Nutr. Res.** v. 61, p. 20-6, 1991.
- OZER, N. K. ; PALOZZA, P. ; BOSCOBOINIK, D. ; AZZI, A. d- α -Tocopherol inhibits low density lipoprotein induced proliferation and protein kinase C activity in vascular smooth muscle cells. **FEBS** v. 322, p. 307-10, 1993.

- OKUMURA, M. ; THOMAS, M. L. Regulation of immune function by protein tyrosine phosphatases. **Curr. Opinion Immunol.** v. 7, p. 312-9, 1995.
- PARK, J. W.; HOYAL, C. R.; EL BENNA, J.; BABIOR, B. M. Kinase-dependent activation of the leukocyte NADPH oxidase in a cell-free system. **J. Biol. Chem.** v. 272, p. 11035-43, 1997.
- PTASZNIK, A.; TRAYNOR-KAPLAN, A.; BOKOCH, G.M. G Protein-coupled chemoattractant receptors regulate Lyn tyrosine kinase Shc adapter protein signaling complexes. **J. Biol. Chem.** v. 270, p. 19969-73, 1995.
- PONTREMOLI, S.; MELLONI, E.; SALAMINO, F.; SPARATONE, B.; MECHETTI, M.; SACCO, O.; HORECKER, B.L. Phosphorylation of proteins in human neutrophils activated with phorbol myristate acetate or with chemotactic factor. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 250, p.23-7, 1983.
- PONTREMOLI, S.; MELLONI, E.; SPARATONE, b.; MICHETTI, M; SALAMINO, F.; HORECKER, B.L. Isozymes of protein kinase C in human neutrophils and their modification by two endogenous proteinases. **J. Biol. Chem.** v. 265, p. 706-12, 1990.
- POUSADA, J.; YEW, N.; AHN, N. G.; VAN DER WOUDE, G. F.; COOPER, J.A. Mos stimulates MAP kinase in *Xenopus* oocytes and activates a MAP kinase in vitro. **Mol. Cell. Biol.** v. 13, p. 2546-53, 1993.
- RADI, R.; COSGROVE, T. P.; BECKMAN, J. S.; FREEMAN, B. A. Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence. **Biochem. J.** v. 290, p. 51-7, 1993.
- RAMOS, C. L.; POU, S.; BRITIGAN, B .E.; COHEN, M. S.; ROSEN, G. M. Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes. **J. Biol. Chem.** v. 267, p. 8307-12, 1992.
- RAO, G.; ALLAND, L.; GUIDA, P.; SCHREIBER-AGUS N.; CHEN, K.; CHIN, L.; ROCHELLE, J.M; SELDIN, M.F; SKOULTCHI, A.I; DEPINHO, R.A. Mouse Sin3A interacts with and can functionally substitute for the amino-terminal repression of the Myc antagonist Mxi1. **Oncogene.** v. 13, p. 713-9, 1996.
- RAO, G. N. ; LASSÈGUE, B. ; GRIENDLING, K. K. ; ALEXANDER, R. W. Hydrogen peroxide stimulates transcription of c-jun in vascular smooth muscle cells : role of arachidonic acid. **Oncogenese.** v. 8, p. 2759-64, 1993.

- RICCIARELLI, R.; AZZI, A. Regulation of recombinant PKC α activity by protein phosphatase 1 and protein phosphatase 2 A. **Arch. Bioch. Biophys.** v. 35, p. 197-200, 1998.
- ROBINSON, J. M.; HEYWORTH, P. G.; BADWEY, J. A. Utility of staurosporine in uncovering differences in the signal transduction pathways for superoxide production in neutrophils. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1055, p. 55-62, 1990.
- ROBINSON, M. J.; COBB, M. H. Mitogen-activated protein kinase pathways. **Curr. Opin. Cell Biol.** v. 9, p. 180-6, 1997.
- ROLLET, E.; CAON, A.; ROBERGE, C. J.; LIAO, N. W.; MALAWISTA, S. E.; McCOLL, S.R.; NACCACHE, P. H. Tyrosine phosphorylation in activated human neutrophils: comparison of the effects of different classes of agonists and identification of the signalling pathways involved. **J. Immunol.** v. 153, p. 3533-63, 1994.
- ROSEN, H.; KLEBANOFF, S. J. Bactericidal activity of a superoxide anion-generating system. A model for the polymorphonuclear leukocyte. **J. Exp. Med.** v. 149, p. 27-39, 1979.
- ROSEN, G. M.; POU, S.; RAMOS, C. L.; COHEN, M.S.; BRITIGAN, B. E. Free radicals and phagocytic cells. **FASEB J.** v. 9, p. 200-9, 1995.
- ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudos de diversos fatores. **Mem. Inst. Butantan.** v. 20, p. 315-28, 1947.
- SAKAMOTO, W. ; FUJIE, K. ; HANDA, H. ; OGIHARA, T. ; MINO, M. In vivo inhibition of superoxide production and protein kinase C activity in macrophages from vitamin E-treated rats. **Int. J. Vit. Nutr. Res.** v. 60, p. 338-42, 1990.
- SAKATA, N.; PATEL, H. R.; TERADA, N.; ARUFFO, A.; JOHNSON, G. L.; GELFAND, E. W. Selective activation of c-Jun kinase mitogen-activated protein kinase by CD 40 on human B cells. **J. Biol. Chem.** v. 270, p. 30823-8, 1995.
- SECRIST, J. P.; BURNS, L. A.; KARNITZ, L.; KORETZKY, G. A.; ABRAHAN, R. T. Stimulatory effects of the protein tyrosine phosphatase inhibitor, pervanadate, on T-cell activation events. **J. Biol. Chem.** v. 268, p. 5886-93, 1993.

- SIRIKÇI, O. ; OZER, N.K. ; AZZI, A. Dietary cholesterol-induced changes of protein kinase C and the effect of vitamin E in rabbit aortic smooth cells. **Atherosclerosis**. v. 126, p. 253-63, 1996.
- SRIVASTAVA, S. ; PHADKE, R. S. ; GOVIL G. Effect of incorporation of drugs, vitamins and peptides on the structure and dynamics of lipids assemblies. **Mol. Cell. Biochem.** v. 91, p. 99-109, 1989.
- STEINBERG, M. J.; KHAN, A. U.; KARNOVSKY, M. J. Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. **J. Biol. Chem.** v. 267, p. 13425-32, 1992.
- STEINER, M. ; ANASTASI, J. Vitamin E : an inhibitor of the platelet release reaction. **J. Clin. Invest.** v. 57, p. 732-7, 1976.
- STEINER, M. ; LI, Z. ; CIARAMELLA, J. M. ; ANAGNOSTOU, A. ; SIGOUNAS, G. dl- α -Tocopherol, a potent inhibitor of phorbol ester induced shape change of erythro- and megakaryoblastic leukemia cells. **J. Cell Phys.** v. 172, p. 351-60, 1997.
- STEVENS, P. Lucigenin and luminol-dependent chemiluminescence to selectively differentiate the oxidative pathways of phagocytic cells. In: VAN DIKE, K.;CASTRANOVA, V. eds. **Cellular Chemiluminescence**. Florida, CRC Press, 1987, p. 105-12.
- STEVENSON, M. A. ; POLLOCK, S. S. ; COLEMAN, N. ; CALDERWOOD, S. K. X-irradiation, phorbol esters, and H₂O₂ stimulate mitogen-activated protein kinase activity in NIH-3T3 cells through formation of reactive oxygen intermediates. **Cancer Res.** v. 54, p. 12-5, 1994.
- STONE, R.; DIXON, J.E. Protein tyrosine phosphatases. **J. Biol. Chem.** v. 269, p. 31323-6, 1994.
- STREULI, M. Protein tyrosine phosphatases in signaling. **Curr. Opinion Cell Biol.** v. 8, p. 182-8, 1996.
- SULLIVAN, S. G. ; CHIU, D. T. Y. ; ERRASFA, M. ; WANG, J. M. ; QI, J. S. ; STERN, A. Effects of H₂O₂ on protein tyrosine phosphatase activity in HER14 cells. **Free Rad. Biol. Med.** v. 16, p. 399-403, 1994.
- TAKUR, M. L. ; SRIVASTAVA, U. S. Vitamin E metabolism and its application. **Nutr. Res.** v. 16, p. 1767-1809, 1996.

- TAMAOKI, T. Use and specificity of staurosporine, UCN-01 and calphostin C as protein kinase inhibitor. **Meth. Enzymol.** v. 201, p. 362-70, 1991.
- TANIMURA, M.; KOBUSHI, H.; UTSUMI, T.; YOSHIOKA, T.; KATAOKA, S.; FUJITA, Y.; UTSUMI, K. Neutrophil promoting by granulocyte colony stimulating factor and its modulation by protein kinase inhibitors. **Biochem. Pharm.** v. 44, p. 1045-52, 1992.
- TASINATO, A.; BOSCOBOINIK, D.; BARTOLI, G. M.; MARONI, P.; AZZI, A. d- α -Tocopherol inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation occurs at physiological concentrations, correlates with protein kinases C inhibition, and is independent of its antioxidant properties. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 92, 121990-4, 1995.
- TASINATO, A.; BOSCOBOINIK, D.; AZZI, A. The effect of α -tocopherol on the syntesis, phosphorylation and activity of protein kinase C in smooth muscle cells after phorbol 12-myristate 13-acetate down-regulation. **Eur. J. Biochem.** v. 246, p. 745-9, 1997.
- TAYLOR, S. S.; RADZIO-ANDZELM, E. Three protein kinase structures define a common motif. **Structure.** v. 2, p. 345-52, 1994.
- TENGERY, R. P. Vitamin E, immune response, and disease resistance. **Ann. NY Acad. Sci.** v. 570, p. 335-44, 1989.
- THOMAS, E. L.; FISHMAN, M. Oxidation of chloride and thiocyanate by isolated leukocytes. **J. Biol. Chem.** v. 261, p ; 9694-701, 1986.
- THOMAS, E. L.; LEARN, D. B. Myeloperoxidase-catalysed oxidation of chloride and others halides: the role of chloramines, in Enverse J., Everse K. E., Grisham M. B. eds. **Peroxidases in chemistry and biology**., boca Raton, FL., CRC, 1991, p. 83.
- THOMAS, S.M.; DeMARCO, M.; D'ARCANGELO, G.; HALEGOUA, S.; BRUGGE, S. Ras is essential for nerve growth factor-and phorbol ester-induced tyrosine phosphorylation of MAP kinases. **Cell** v. 68, p. 1031-40, 1992.
- TRABER, M. G. ; OLIVECRONA, T. ; KAYDEN, H. J. Bovine milk lipoprotein lipase transfers tocopherol to human fibroblasts during triglycerides hydrolysis in vitro. **J. Clin. Invest.** v. 75, p. 1729-34, 1985.
- TRABER, M. G. Determinants of plasma vitamin E concentrations. **Free Rad. Biol. Med.** v. 16, p. 229-39, 1994.

- TRABER, M. G. ; SOKOL, R. J. ; BURTON, G.Z. ; INGOLD, K. U. ; PAPAS, A. M. ; HUFFAKER, J. E. ; KAYDEN, H.J. Impaired ability of patients with familial isolated vitamin E deficiency to incorporate α -tocopherol into lipoproteins secreted by the liver. **J. Clin. Invest.** v. 85, p. 397-407, 1990.
- TRAN, K. ; CHAN, A. C. R, R, R- α -tocopherol potentiates prostacyclin release in human endothelial cell. Evidence for structural specificity of the tocopherol molecule. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1043, p. 189-97, 1990.
- TROWBRIDGE, I. S. ; OSTERGAARD, H. L. ; JOHNSON, P. CD45 : a leukocyte-specific member of the protein tyrosine phosphatase family. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1095, p. 46-9, 1991.
- TRUSH, M. A.; WILSON, M. E.; VAN DIKE, K. The generation of chemiluminescence (CL) by phagocytic cells. **Methods in Enzymology**, v. 57, p. 462-92, 1978.
- UTSUMI, T.; KLOSTERGAARD, J.; AKIMARU, K.; KEISUKE, E.; SATO, E.F.; UTSUMI, K. Modulation of TNF- α -priming and stimulation-dependent superoxide generation in human neutrophils by protein kinase inhibitors. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 294, p. 271-8, 1992.
- WASKIEWICZ, A. J.; COOPER, A. J. Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. **Curr. Opinion Cell Biol.** v. 7, p. 798-805, 1995.
- WERA, S.; HEMMINGS, B. A. Serine/threonine protein phosphatases. **Biochem. J.** v. 311, p. 17-29, 1995.
- WHEELER, M. A.; SMITH, S. D.; GARCIA-CARDENA, G.; NATHAN, C. F.; WEISS, R. M.; SESSA, W. C. Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. **J. Clin. Invest.** v. 99, p. 110-16, 1997.
- WHISLER, R. L. ; GOYETTE, M. A. ; GRANTS, I. S. ; NEWHOUSE, Y. G. Sublethal levels of oxidant stress stimulate multiple serine/threonine kinases and suppress protein phosphatases in Jurkat T cell. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 319, p. 23-35, 1995.
- WINTERBOURN, C. C.; PICHORNER, H.; KETTLE, A. J. Myeloperoxidase-dependent generation of a tyrosine peroxide by neutrophils. **Arch. biochem. Biophys.** v. 338, p. 15-21, 1997.

- WOLCOTT, R. G.; FRANKS, B. S.; HANNUM, D. M.; HURST, J. K. Bactericidal potency of hydroxyl radical in physiological environments. **J. Biol. Chem.** v. 269, p. 9721-7, 1994.
- WOLF, M.; CUATRECASAS, P.; SAHYOUN, N. Interaction of protein kinases C with membranes is regulated by Ca^{2+} , phorbol esters, and ATP. **J. Biol. Chem.** v. 260, p. 15718-23, 1985.
- WOLFSON, M.; McPHAIL, L. C.; NASRALLAH, V. N.; SNYDERMAN, R. Phorbol myristate acetate mediates redistribution of protein kinase in human neutrophils: potential role in the activation of the respiratory burst enzyme. **J. Immunol.** v. 135, p. 2057-2062, 1985.
- WORTHEN, G.S.; AVDIO, N.; BUHL, A.M.; SUZUKI, N.; JOHNSON, G.L. FMLP activates Ras and Raf in human neutrophils. Potential role in activation of MAP kinase. **J. Clin. Invest.** v. 94, p. 815-23, 1994.
- WU, X.; NOH, S. J.; ZHOU, G.; DIXON, J. E.; GUAN, K.L. Selective activation of MEK1 but not MEK2 by A-Raf from epidermal growth factor-stimulated Hela cells. **J. Biol. Chem.** v. 271, p.3265-71, 1996.
- VAN DER ULiet, A.; EISERICH, J. P.; HALLIWELL, B.; CROSS, C. E. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite: a potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. **J. Biol. Chem.** v. 272, p. 7617-23, 1997.
- YASHAR, B. M.; KELLEY, C.; YEE, K. ERREDE, B.; ZON, L. I. Novel members of the mitogen-activated protein kinase activator family in *Xenopus laevis*. **Mol. Cell Biol.** v. 13, p. 5738-48, 1993.
- YAMAGUCHI, M.; SAEKI, S. YAMANE, H.; OKAMURA, N.; ISHIBASHI, S. Hyperphosphorylated p47-phox lost the ability to activate NADPH oxidase in guinea pig neutrophils. **Biochem. Biophys. Res. Com.** v. 216, p. 203-8, 1995.
- YAMAGUCHI, M.; SAEKI, S.; YAMANE, H.; OKAMURA, N.; ISHIBASHI, S. Involvement of several protein kinases in the phosphorylation of p47-phox. **Bioche. Biophys. Res. Com.** v. 220, p. 891-5, 1996.
- YANO, T. ; ICHIKAWA, T. A mechanism of vitamin E-enhanced active formation in concavalin A-stimulated alveolar macrophage. **Biochem. Mol. Biol.** v. 31, p. 291-6, 1993.

- YOSHIDA, N. ; TOSHIKAZU, Y. ; MANABE, H. ; TERASAWA, Y. ; KONDO, M. ; NOGUSHI, N. ; NIKI, E. Vitamin E protects against polymorphonuclear leukocyte-dependent adhesion to endothelial cells. **J. Leukoc. Biol.** v. 65, p. 757-63, 1999.
- XIA, Z.; DICKENS, M.; RAINGEAUD, J.; DAVIS, R. J.; GREENBERG, M. E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. **Science.** v. 270, p. 1326-31, 1995.
- ZAR, J. H. **Biostatistical analysis..** Prentice Hall, 3 ed. New Jersey, 1996, 662 pp.
- ZELIGS, B. J. Bactericidal and fungicidal assay. In: HERSCOWITZ, H. B.; HOLDEN, H. T.; BELLANTI, J. A.; GHAFAR, A. eds. **Manual of Macrophage Methodology: Collection, Characterization and Function.** New York, Marcel Ceker, 1981, p. 123-9.
- ZIMMERMAN, B. J.; GRANGER, D. N. Mechanisms of reperfusion injury. **Am. J. Med. Sci.** v. 307, p. 284-292, 1994.
- ZU, Y.; AI, Y.; GILCHRIST, A.; LABADIA, M.E.; SHA'AFI, R.I.;HUANG, C. Activation of MAP kinase-activated protein kinase 2 in human neutrophils after phorbol ester or fMLP peptide stimulation. **Blood** v.87, p. 5287-96, 1996.