



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO) POR
FLAVONÓIDES

Bolsista: Carolina de Oliveira Belichar, CNPq

MANAUS
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL
PIB-S/0035/2010
INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO) POR
FLAVONÓIDES

Bolsista: Carolina de Oliveira Belichar, CNPq

Orientador: Prof.º Dr. Émerson Silva Lima

MANAUS
2011

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, à Faculdade de Ciências Farmacêuticas e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Laboratório de Bioquímica da Faculdade Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	08
2. OBJETIVOS	15
2.1. Geral	15
2.2. Específicos	15
3. METODOLOGIA	16
3.1. Flavonóides	16
3.2. Ensaio da atividade inibitória dos flavonóides sobre a mieloperoxidase com o substrato guaicol	17
3.3. Ensaio da atividade inibitória dos flavonóides sobre a mieloperoxidase com o substrato 10-acetil-3,7-diidroxifenoxazina (Amplex Red®)	18
3.4. Ensaio de inibição da atividade clorinante da MPO por flavonóides	18
3.5. Efeito de flavonóides sobre a formação de peróxido de hidrogênio em células HL-60 diferenciada para neutrófilos	19
3.6. Efeito de flavonóides sobre a formação de ânion radical superóxido em células HL-60 diferenciada para neutrófilos	19
3.7. Análise dos resultados	20
4. RESULTADOS	
4.1 Ensaio da atividade inibitória dos flavonóides sobre a mieloperoxidase com o substrato guaicol	21
4.2 Ensaio da atividade inibitória dos flavonóides sobre a mieloperoxidase com o substrato 10-acetil-3,7-diidroxifenoxazina (Amplex Red®)	25
4.3 Ensaio de inibição da atividade clorinante da MPO por flavonóides	26
4.4 Efeito de flavonóides sobre a formação de peróxido de hidrogênio em células HL-60 diferenciada para neutrófilos	27
4.5 Efeito de flavonóides sobre a formação de ânion radical superóxido em células HL-60 diferenciada para neutrófilos	28
5. CONCLUSÃO	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
7. CRONOGRAMA	36

RESUMO

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima heme derivada de leucócitos geradora de espécies reativas de oxigênio, as quais são componentes que antecedem a lesão arterial, podendo ser aterogênicas. Estes oxidantes têm sido sugeridos como os principais mediadores de danos teciduais, pois seu excesso pode sobrecarregar as defesas antioxidantes e levar ao estresse oxidativo e, conseqüente lesão tecidual. Há relatos de alguns estudos *in vitro* corroborando a eficácia antioxidante dos flavonóides, estruturalmente diversos, em várias circunstâncias de estresse oxidativo. Desta forma, a utilização de flavonóides com intuito de inibir a MPO, justifica-se pelo aumento das relações entre estrutura-atividade. A atividade inibitória sobre a MPO de flavonóides disponíveis comercialmente (quercetina, genisteína, luteolina e daidzeína) e isolados de plantas (deguelina; 12a-hidroxi- α -toxicarol; obovatina; α -toxicarol; 6a,12a-desidro- α -toxicarol e tephrosina) foi mensurada por meio do método de oxidação do guaiacol, método de oxidação pelo Amplex Red® e atividade clorinante. Foi também avaliado o efeito sobre a formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ânion radical superóxido (O₂-•) em células HL-60 diferenciada para neutrófilos. Os flavonóides quercetina, daidzeína, genisteína e luteolina mostraram significativos efeitos inibitórios sobre a atividade da MPO com valores de CI50 (concentração da substância capaz de inibir 50%) 0,063±0,01; 1,66±0,22; 3,02±0,26 e 1,46±0,29 µg/mL, respectivamente, quando o guaiacol foi usado como substrato da MPO. Verificou-se uma inibição de 100% da quercetina, 86,9% da genisteína, 82,5% da luteolina, 73,2% da 6a,12a-desidro- α -toxicarol e 72,5% da obovatina, no sistema MPO/Amplex Red® quando testados na concentração de 10 µmol/L. Nos sistemas celulares, somente a quercetina apresentou atividade significativa de inibição da produção de H₂O₂ e O₂-• podendo estas atividades estar relacionadas com a inibição da MPO. Com base neste estudo, constatou-se que somente a quercetina obteve valores significativos de inibição da MPO utilizando sistemas celulares e não celulares.

ABSTRACT

Myeloperoxidase (MPO) is a leukocyte-derived heme enzyme that generates reactive oxygen species which are components prior to arterial injury and can be atherogenic. These oxidants have been implicated as the main mediators of tissue damage, because their excess can overwhelm the antioxidant defenses, lead to oxidative stress and consequent oxidative tissue injury. There are reports of some *in vitro* studies confirming the antioxidant efficacy of structurally different flavonoids in several conditions of oxidative stress. Therefore, the application of flavonoids to inhibit MPO is justified by the increase in structure-activity relationships. The inhibitory activity of flavonoids commercially available (quercetin, genistein, luteolin e daidzein) and isolated from plants (deguelin, 12a-hidroxi- α -toxicarol; obovatin; α -toxicarol; 6a,12a-desidro- α -toxicarol e tephrosina) was measured by the guaiacol oxidation method, Amplex Red® oxidation method and chlorination activity. It was also measured the effect on the formation of hydrogen peroxide and superoxide anion radical in differentiated HL-60 cells to neutrophils. Flavonoids as quercetin, daidzein, genistein and luteolin were tested and shown significant inhibitory effects on the MPO activity with IC_{50} values (substance concentration capable of inhibiting 50%) $0,063\pm 0,01$; $1,66\pm 0,22$; $3,02\pm 0,26$ e $1,46\pm 0,29$ $\mu\text{g/mL}$, respectively, when guaiacol was used as substrate of MPO. There was a 100% inhibition of quercetin, 86,9% of genistein, 82,5% of luteolin, 73,2% of 6a,12a-desidro- α -toxicarol and 72,5% of obovatin, by the MPO/Amplex Red® system. In cellular systems, only quercetin showed significant activity in inhibiting the production of H_2O_2 and $\text{O}_2^{\cdot-}$, therefore these activities may be related to the inhibition of MPO. Based on this study, it was found that only quercetin obtained significant values on inhibition of MPO using non-cellular and cellular systems.

1. INTRODUÇÃO

Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima abundantemente expressa em neutrófilos ativados, em menor medida, em monócitos e certos tipos de macrófagos teciduais (como em placas ateroscleróticas). Esta enzima faz parte da superfamília heme peroxidase-ciclooxigenase, seus níveis nos leucócitos polimorfonucleares neutrofílicos constituem, entre 2 e 5% do total de proteínas celulares e nos monócitos, aproximadamente 1% da proteína total (HANSSON et al., 2006; MALLE et al., 2007; NICHOLLS & HAZEN, 2005; SHIBA et al., 2008; ZHANG et al., 2007).

O peso molecular da MPO é de aproximadamente 140 kD, ela é composta por dois dímeros idênticos ligados por uma ponte de bissulfeto, sendo cada dímero composto de uma subunidade de cadeia leve e uma pesada, com grupamentos heme funcionalmente idênticos (ARNHOLD, 2004; HANSSON et al., 2006; LAU & BALDUS, 2006; SEGELMARK et al., 1996).

A síntese da mieloperoxidase ocorre durante a diferenciação mielóide na medula óssea e é concluída dentro dos granulócitos previamente à sua entrada na circulação. A enzima é armazenada nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos e monócitos; em macrófagos, que perderam a capacidade de sintetizar MPO, esta é absorvida por endocitose total do neutrófilo ou então da MPO liberada pelos neutrófilos no sítio inflamatório. Sua liberação somente ocorre na ativação e degranulação dos leucócitos, onde a mesma é lançada em vacúolos fagocitários, bem como no espaço extracelular, contribuindo para a defesa inata do organismo (LAU & BALDUS, 2006; MALLE et al., 2007; NICHOLLS & HAZEN, 2005; RODRIGUES et al., 2002; ZHANG et al., 2007).

Vários estudos têm sugerido que a mieloperoxidase está envolvida na catálise da modificação oxidativa em alguns tecidos, por catalisar a formação de espécies reativas

de oxigênio, sendo que a modificação na oxidação de biomoléculas, como proteínas, aminoácidos, lipídeos e DNA desempenha um papel importante na patogênese de várias doenças, incluindo a aterosclerose, câncer, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares e artrite (MALLE et al., 2007; NICHOLLS & HAZEN, 2005; SHIBA et al., 2008; VELLOSA et al., 2009).

Observações que a destruição de microorganismos ocorre no fagossomo de neutrófilos e que a MPO está entre as enzimas lançadas nestes vacúolos fagocíticos dos grânulos citoplasmáticos, sugeriram um importante papel da MPO na morte bacteriana. Entre os sistemas antimicrobianos presentes no fagossomo, uma grande parte consiste em MPO, peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , formado durante a explosão respiratória), e um haleto (X^-), principalmente o cloreto (Cl^-) (MALLE et al., 2007; NICHOLLS & HAZEN, 2005; SHIBA et al., 2008).

Sendo a MPO um componente da resposta imune inata, alguns estudos citam que os oxidantes derivados de MPO contribuem para o dano tecidual durante inflamação. Isto ocorre, pois na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a forma férrica da MPO (Fe (III)) é oxidada por um equivalente dois-életrons formando o composto intermediário redox I (MPO I), o qual tem por principal substrato fisiológico, o cloreto (Cl^-), que em seguida sofre uma oxidação de dois elétrons para formar o ácido hipocloroso (HOCl), um oxidante de forte cloração, capaz de oxidar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos no local da inflamação (HAZEN et al., 1997; NICHOLLS & HAZEN, 2005; SHIBA et al., 2008).

Esse composto I (MPO I), gerado a partir da reação da MPO com H_2O_2 , também reage com vários substratos orgânicos (principalmente fenóis, a tirosina é um dos mais importantes desses compostos no fagolisossoma, havendo formação do radical tirosil), enquanto o heme sofre duas reduções seqüenciais de um elétron, gerando o composto II

(MPO II) e a forma férrica da MPO, respectivamente (HAMPTON et al., 1998; SHIBA et al., 2008).

O sistema MPO-HOCl tem mostrado ser um catalisador na oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) *in vivo*, convertendo essa lipoproteína em uma forma aumentada de recaptção e degradação pelos macrófagos levando à deposição de colesterol e formação de células espumosas (a marca celular da estrias gordurosas); na ativação de carcinógenos; na redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO[•]), pois a MPO é capaz de usá-lo como substrato fisiológico, inibindo a indução da expressão gênica de iNOS (enzima óxido nítrico-sintase induzível) e prejudicando a vasodilatação; e, na oxidação de proteínas e alteração de sua função biológica (ASKARI et al., 2003; REYNOLDS et al., 2006; RUTGERS et al., 2003; ZHANG et al., 2007).

Desta forma, estes são os possíveis mecanismos pelos quais a mieloperoxidase é capaz de promover oxidação de lipoproteínas *in vivo*: macrófagos utilizam NADPH oxidase para produzir radical ânion superóxido (O₂^{•-}) que se converte e forma o peróxido de hidrogênio (H₂O₂); a MPO catalisa reações com H₂O₂ para gerar oxidantes citotóxicos mais potentes como HOCl e radical tirosil, sendo a única enzima humana capaz de gerar HOCl, o qual reage mais além para gerar poderosos agentes oxidantes como o oxigênio singlete (¹O₂) e o radical hidroxila (OH[•]). Por meio de ensaios de alta sensibilidade e especificidade, diversos produtos finais estáveis gerados por essas espécies têm sido detectados em placas ateroscleróticas (CARR et al., 2000; PODREZ et al., 2000; REGASINI et al., 2008; ZHANG et al., 2002).

A MPO tem a capacidade de alterar oxidativamente o aminoácido tirosina da apolipoproteína B-100 (apo B-100) a qual consiste na proteína estrutural da LDL e VLDL, utilizando H₂O₂ e íon Cl⁻ para formar a 3-clorotirosina. Pode também nitrar a tirosina oxidando nitrito (NO₂⁻), o produto final do metabolismo do óxido nítrico (NO[•]),

gerando a 3-nitrotirosina. Esta última, juntamente com a 3-clorotirosina tem importância clínica por promover dano oxidativo, o que contribui para a aterosclerose, além disso, são marcadores específicos da atividade da MPO (HAZEN et al., 1997; PODREZ et al., 1999).

Esta enzima oxida inúmeros substratos em espécies reativas de radicais livres usando peróxido de hidrogênio. Sua capacidade de oxidar o cloreto em ácido hipocloroso é único entre as enzimas de mamíferos e é considerado a atividade dominante da mieloperoxidase *in vivo*. Conseqüentemente, sua atividade clorinante se torna ideal para investigar a cinética da enzima, na produção de ácido hipocloroso por neutrófilos e para distinguir a mieloperoxidase de outras peroxidases. (DYPBUKT et al., 2005)

Mais recentemente, demonstrou-se que a HDL também é suscetível a modificações oxidativas mediadas por mieloperoxidase por nitração ou halogenação de resíduos de tirosina na apolipoproteína A I (apo A I). Estas prejudicam a habilidade da lipoproteína de promover o transporte reverso de colesterol dependente de ABCA-1, contribuindo também para a formação de lesões ateroscleróticas. (NICHOLLS & HAZEN, 2005; REYNOLDS et al., 2006)

Estudos de imuno-histoquímica e análises bioquímicas demonstraram a presença de MPO e seus metabólitos em lesões ateroscleróticas humanas e, estudos de espectrometria de massa mostraram que produtos de oxidação gerados por MPO estão elevados em ateroma humano e na lipoproteína de baixa densidade (LDL) recuperada a partir de tecido arterial doente (NICHOLLS & HAZEN, 2005; SHIBA et al., 2008; ZHANG et al., 2007).

Sendo assim, vários estudos têm sido feitos com base na inibição da mieloperoxidase. Um tipo de inibição abrange a produção de HOCL que envolve a

captura da MPO como composto II, porém este tipo de inibição é reversível, pois o anion radical superóxido e outros substratos reduzem o composto II ao seu estado fundamental (SHIBA et al., 2008).

Outro tipo de inibição envolve os flavonóides, que nos últimos anos têm-se esperado que exerçam efeitos benéficos à saúde humana e previnam ou atenuem várias doenças. Estudos epidemiológicos têm mostrado que o consumo de flavonóides tem papel importante na redução do risco para a incidência de doenças cardiovasculares e câncer (SHIBA et al., 2008).

O termo flavonóide é um nome coletivo dado aos pigmentos de plantas derivados da benzo-g-pirona. Consistem de um esqueleto de difenil propano (C₆C₃C₆) com dois anéis benzênicos (A e B) ligados a um anel pirano (C). Os flavonóides são uma classe de compostos naturais de considerável interesse científico e terapêutico. Eles constituem um grupo de substâncias naturais com estrutura fenólica variável que possuem potencial antioxidante, anticarcinogênico e efeitos protetores aos sistemas renal, cardiovascular e hepático. Estão amplamente distribuídos em folhas, sementes, cascas, flores, frutas, verduras, vinhos, chás e cacau e, representam componentes da parte energética da dieta humana (AHERNE e BRIEN, 2002; BEHLING et al., 2004; HEIM et al., 2002).

Flavonóides podem ocorrer como agliconas, glicosídeos ou como parte de outras estruturas que contenham flavonóides, como as flavolignanas, porém frequentemente ocorrem como glicosídeos e polímeros. Seus efeitos cardioprotetores decorrem da capacidade de inibir a peroxidação lipídica, formar quelatos de metais redox-ativos e de atenuar a outros processos envolvendo espécies reativas de oxigênio. Eles podem ser subdivididos em 13 classes, com mais de 5000 compostos descritos até 1990. As subclasses dos flavonóides são: calconas, dihidrocalconas, auronas, flavonas

(apegenina, luteolina, diosmetina), flavonóis (quercetina, miracetina, kaempferol), dihidroflavonol, flavanonas (naringina, hesperidina), flavanol, flavandioliol, antocianidina, isoflavonóides (genisteína, daidzeína), bioflavonóides e proantocianinas (BEHLING et al., 2004; BRAVO, 1998; HEIM et al., 2002).

As flavonas isoladas podem ser consideradas como candidatas em potencial para o desenvolvimento de agentes antiinflamatórios, uma vez que elas apresentam propriedades anti-radicalar e inibem a mieloperoxidase e, estudos mostraram que os flavonóis, mais especificamente a quercetina, um flavonóide importante na dieta humana, produz um metabólito (3,3',4',5,7-Pentahidroxi-flavona) que se acumula especificamente em macrófagos ativados na aorta aterosclerótica humana, além disso foram demonstradas *in vitro* o forte efeito inibitório da quercetina aglicona sobre as reações de oxidação catalisada por MPO (FERNANDES et al., 2008; SHIBA et al., 2008).

Estudos realizados com flavonóides relatam que algumas subclasses, como os flavonóis apresentam uma potente inibição frente à enzima pró-inflamatória e pró-oxidante mieloperoxidase e uma forte atividade captadora de radicais, características que podem ser particularmente importantes devido à fácil disponibilidade destas substâncias no reino vegetal. Também foi comprovado que são capazes de proteger os sistemas biológicos contra os fenômenos de estresse, tais como a peroxidação lipídica e também podem proteger as células contra o estresse oxidativo induzido por H₂O₂ e contra a desregulação do cálcio (REGASINI et al., 2008).

Portanto, os flavonóides, sendo uma ampla classe de baixo peso molecular que consiste em compostos fenólicos vegetais secundários, são favoráveis na inibição de eventos mediados por radicais livres devido à sua estrutura química, caracterizada pelo núcleo flavan. Além disso, o número, posições e tipos de substituições influenciam em

sua atividade captadora de radicais e na atividade quelante, funções de extrema importância relacionadas à inibição da MPO (BEHLING et al., 2004; FERNANDES et al., 2008; HEIM et al., 2002).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Estudar a atividade inibitória de compostos flavonoídicos sobre a mieloperoxidase.

2.2 Específicos:

- Determinar o efeito inibitório de flavonóides sobre a atividade da mieloperoxidase *in vitro*.
- Estudar os efeitos dos flavonóides, sobre a produção de mieloperoxidase em cultura da célula HL60.

3. METODOLOGIA

3.1 Flavonóides

Os flavonóides: deguelina; 12a-hidroxi- α -toxicarol; obovatina; α -toxicarol; 6a,12a-desidro- α -toxicarol e tephrosina, isolados de plantas, utilizados nesta pesquisa foram cedidos por parceiros do Laboratório de Atividade Biológica (BioPhar) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM.

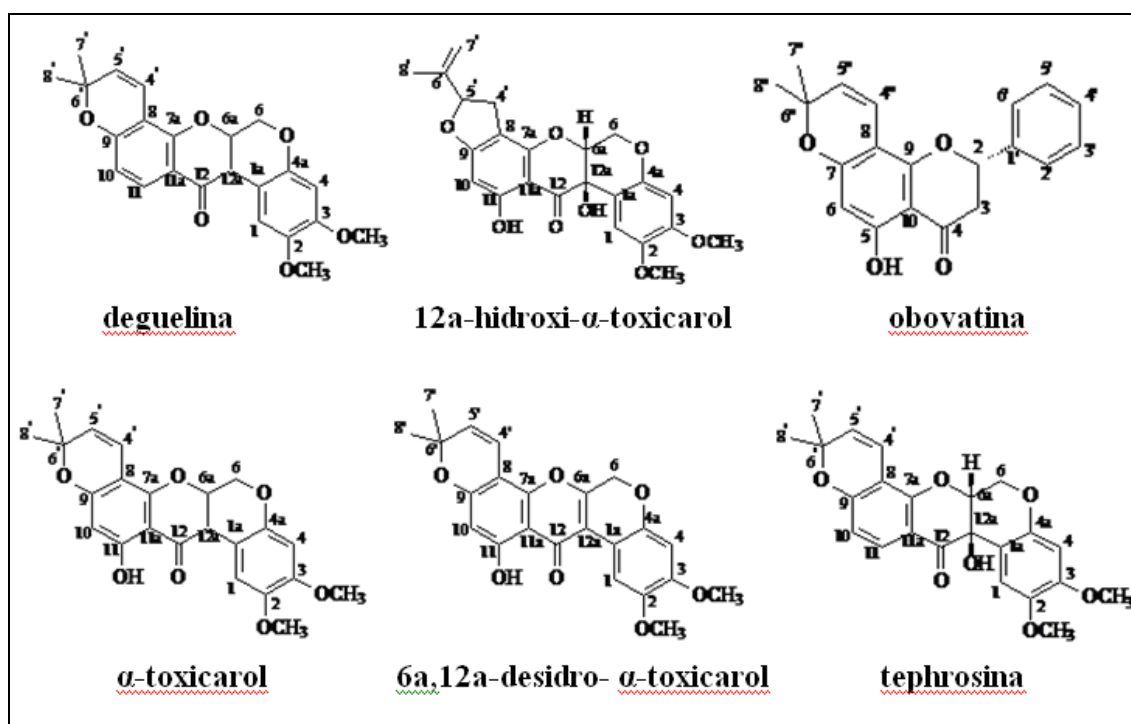


Figura 1: Fórmula molecular dos flavonóides isolados de plantas

Também foram testados compostos flavonoídicos adquiridos comercialmente com grau de pureza o mais elevado possível. Como exemplos de compostos que foram testados: quercetina, daidzeína, genisteína e luteolina.

Antes de serem testados, eram preparadas soluções estoque de cada composto flavonoídico, onde pesou-se 1 mg da substância em um eppendorf de 2 mL e adicionava-se 1000 μ L de Dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo assim uma solução de

1mg/mL. Em seguida eram feitas as diluições desejadas, em triplicata para cada amostra.

3.2 Ensaio da atividade inibitória dos flavonóides sobre a mieloperoxidase com o substrato guaicol

A atividade inibitória dos flavonóides sobre a MPO, foi avaliada segundo o método de oxidação do guaiacol descrito por Khalil et al., 2008, com modificações. Onde, primeiramente preparavam-se os reagentes (tampão fosfato pH 7,4; solução da enzima MPO; guaiacol e peróxido de hidrogênio) os quais eram feitos sempre no mesmo dia em que fossem realizados os testes. O ensaio da atividade inibitória dos flavonóides sobre a mieloperoxidase *in vitro* procedeu-se em microplaca de fundo redondo de 96 poços, no qual em cada poço teste adicionou-se 10 µL de inibidor (flavonóide, 50 µg/mL); 40 µL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,4); 50 µL da solução da enzima MPO diluída 1:10, seguidamente incubou-se a placa durante 5 minutos à 37°C e logo após adicionou-se 100 µL de guaicol (1 mM) e 30 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 5 mM). Em seguida foi feita a leitura em 470 nm da microplaca no leitor de ELISA em tempo 0, incubou-se por mais 10 minutos, a 37 °C e realizou-se a segunda leitura, para então proceder ao seguinte cálculo: % inibição = 100 - (A2 amostra – A1 amostra / A2 controle – A1 controle)*100. Os testes foram realizados em triplicatas com amostras de controle negativo (10 µL de DMSO) medidas para cada ensaio. As substâncias (flavonóides) foram dissolvidas em DMSO nas concentrações 25; 2,5 e 0,25 µg/mL. E foi calculada a CI₅₀ a partir da plotagem de um gráfico correlacionando velocidade inicial *versus* absorbância, obtendo-se, assim, as curvas concentração-resposta, utilizando o programa Origin 6.0.

3.3 Ensaio da atividade inibitória dos flavonóides sobre a mieloperoxidase com o substrato 10-acetil-3,7-diidroxifenoxazina (Amplex Red®)

Na presença da enzima peroxidase, o reagente Amplex Red® reage com peróxido de hidrogênio e produz um composto fluorescente (resorufina). O ensaio da atividade inibitória dos flavonóides sobre a mieloperoxidase foi realizado utilizando como substrato o Amplex Red®. Em microplaca de fundo chato de 96 poços adicionou-se 10 µL da droga (10µM), 5 µL da enzima mieloperoxidase (5nM/haem) para um volume final de 200 µL de tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,4. Após 5 minutos de incubação a 37°C foi adicionado 5 µL de Amplex Red® (50 µM). A reação foi iniciada pela adição de 10 µL de peróxido de hidrogênio (20µM). No leitor de ELISA a reação foi monitorada cineticamente a cada 30 segundos durante 15 minutos a 550 nm.

3.4 Ensaio de inibição da atividade clorinante da MPO por flavonóides

O ensaio foi realizado conforme Dydbukt *et al.*, 2005, com modificações. Em uma placa de fundo chato de 96 poços a reação foi iniciada pela adição de 10 µL da enzima MPO (10 nM/heme), 10 µL do flavonóide (5 µM), 70 µL do tampão contendo fosfato (50 mM), taurina (15 mM) e NaCl (100 mM). Incubou-se por 5 minutos a 37°C. Em seguida, adicionou-se 10 µL de H₂O₂ (50 µM). Desta reação foram retiradas alíquotas de 20 µL nos tempos 0, 5, 15, 30 e 45 minutos. A reação foi parada pela adição de 20 µL de catalase (20 µg/mL). Adicionou-se 160 µL de TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzóico), esta solução foi preparada a partir da redução de 1 mM de DTNB [ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)] em 2 mL de tampão fosfato pH 12 por 5 minutos. Ajustando o pH para 7,4 novamente. Aguardou-se 5 minutos para ocorrer a reação ao abrigo da luz. Realizou-se a leitura em 405 nm no leitor de Elisa e a absorbância observada foi dividida pelo valor 28200 M⁻¹ s⁻¹.

3.5 Efeito de flavonóides sobre a formação de peróxido de hidrogênio em células HL-60 diferenciada para neutrófilos

A linhagem de HL-60 foi diferenciada para neutrófilo pela incubação com 1,3% de DMSO por 5 dias. O ensaio de determinação da formação de peróxido de hidrogênio foi realizado em microplaca de 96 poços de fundo chato utilizando 1×10^6 células/mL; 10 μ L da droga (10 μ M); 5 μ L da enzima horseradish peroxidase - HRP (10 μ M); 5 μ L de 10-acetil-3,7-diidroxifenoxazina - Amplex Red® (50 μ M); no volume final para 200 μ L de tampão fosfato-salino glicose (PBSg) pH 7,4 contendo cálcio e magnésio. Após uma pré-incubação por 10 minutos, a reação foi iniciada pela adição de um estímulo de 10 μ L de forbol-miristato-acetato - PMA (400 nM). Em seguida, realizou-se leitura da microplaca no leitor de ELISA e a alteração da absorbância a 550 nm foi monitorada durante 30 minutos. Neste ensaio foi utilizado como controle positivo a catalase (100 U/mL).

3.6 Efeito de flavonóides sobre a formação de ânion radical superóxido em células HL-60 diferenciada para neutrófilos

A formação de ânion radical superóxido foi testada por meio da redução do citocromo C a 37 °C. Em microplaca de 96 poços de fundo chato, o ensaio consistiu de 1×10^6 células/ml, 10 μ L de citocromo C (50 μ M), 10 μ L de droga (10 μ M) no volume final para 200 μ L de PBSg pH 7,4 contendo cálcio e magnésio. Após uma pré-incubação por 10 minutos, a reação foi iniciada pela adição de um estímulo de 10 μ L de PMA (400nM). No leitor de ELISA a alteração da absorbância a 550 nm foi monitorada durante 30 minutos.

3.7 Análise dos resultados

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e apresentados na forma gráfica por utilização do programa Excel (Microsoft®; Seattle, Washington, EUA) e Origin 6.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaio da atividade inibitória dos flavonóides sobre a mieloperoxidase com o substrato guaicol

No ensaio da atividade inibitória dos flavonóides sobre a mieloperoxidase avaliado segundo o método de oxidação do guaiacol, descrito acima no item 3.2, foram testados quercetina, genisteína, daidzeína; luteolina; deguelina; 12a-hidroxi- α -toxicarol; obovatina; α -toxicarol; 6a,12a-desidro- α -toxicarol e tephrosina, a tabela 1 apresenta os respectivos resultados, todos na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$.

Substância	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Inibição (%)
Quercetina	50	111,20 \pm 16,80
Genisteína	50	86,99 \pm 5,29
Daidzeína	50	58,12 \pm 19,12
Luteolina	50	82,48 \pm 3,70
α -toxicarol	50	43,42 \pm 22,30
Deguelina	50	60,87 \pm 1,42
6a,12a-desidro- α -toxicarol	50	73,25 \pm 1,26
Obovatina	50	72,51 \pm 4,07
12a-hidroxi- α -toxicarol	50	45,50 \pm 4,74
Tephrosina	50	22,62 \pm 9,96

Tabela 1: Inibição de flavonóides sobre a mieloperoxidase no sistema mieloperoxidase/guailcol/H₂O₂.

No ensaio da atividade inibitória dos flavonóides sobre a mieloperoxidase utilizando como substrato o guaiacol executado com os compostos quercetina, genisteína, luteolina e daidzeína, foi possível obter a concentração de cada substância capaz de inibir 50% da MPO no teste (CI_{50}), como apresentado nos gráficos 1, 2, 3 e 4 abaixo.

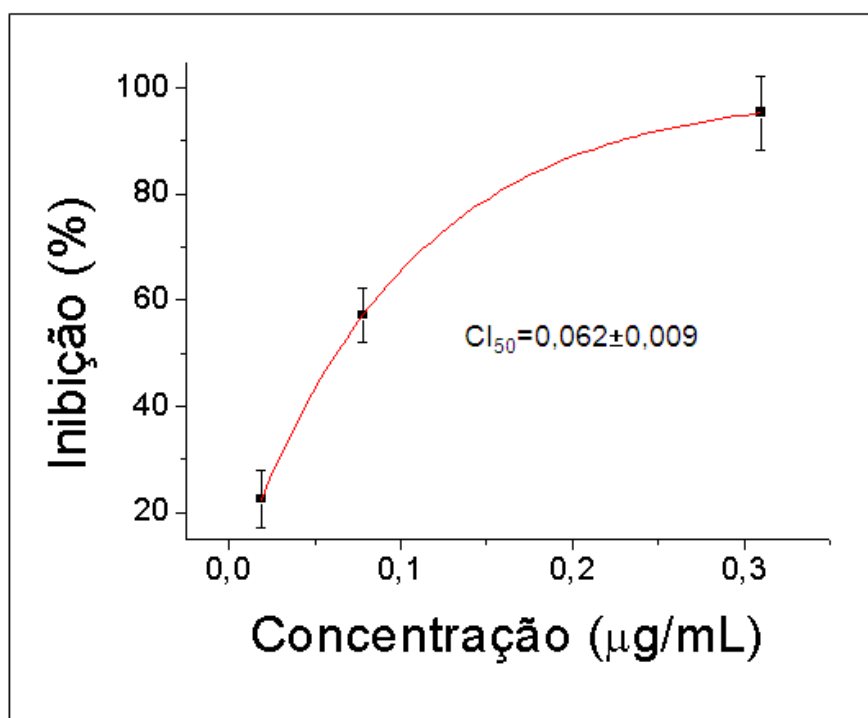


Gráfico 1: Inibição da quercetina no sistema mieloperoxidase/guaiacol/ H_2O_2 e detecção da absorbância em 470 nm após 10 minutos de incubação a 37 °C .

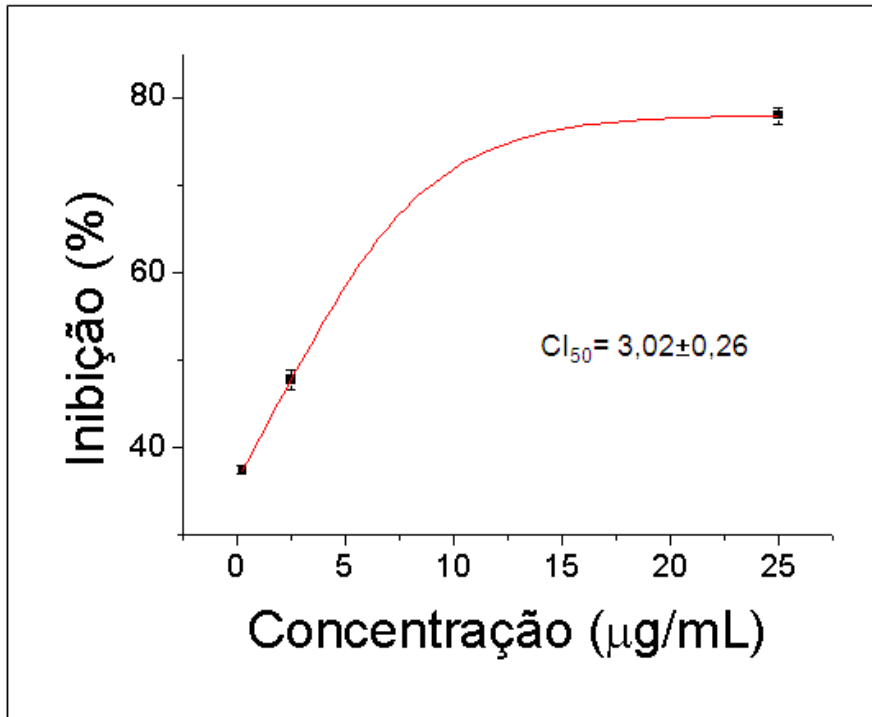


Gráfico 2: Inibição da genisteína no sistema mieloperoxidase/guailcol/H₂O₂ e detecção da absorbância em 470 nm após 10 minutos de incubação a 37 °C .

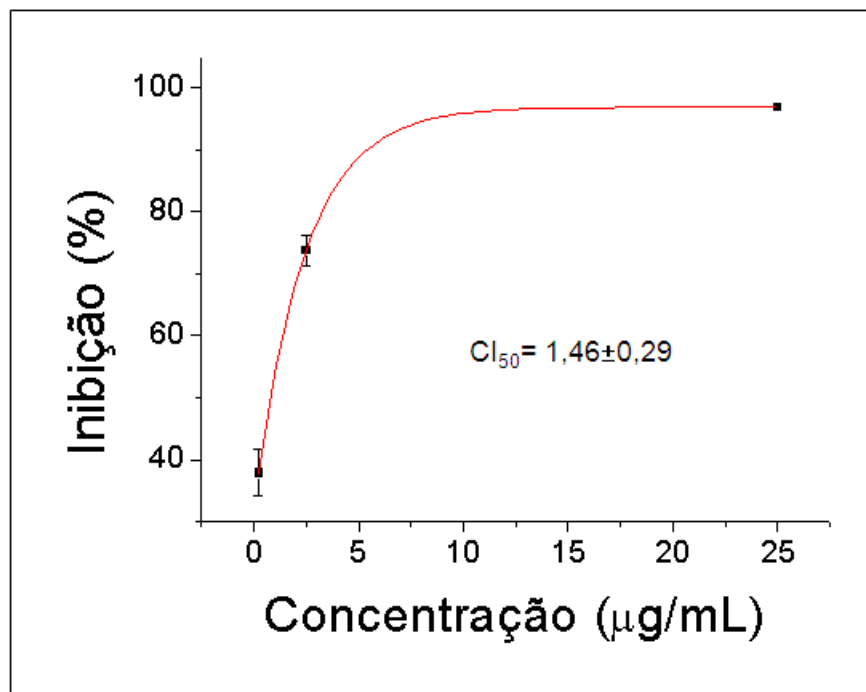


Gráfico 3: Inibição da luteolina no sistema mieloperoxidase/guailcol/H₂O₂ e detecção da absorbância em 470 nm após 10 minutos de incubação a 37 °C .

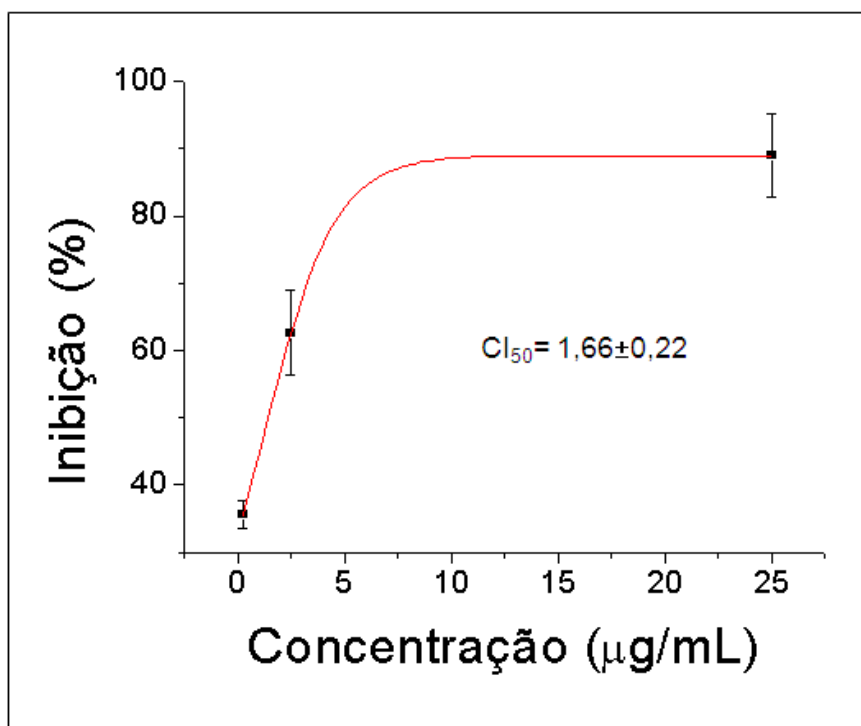


Gráfico 4: Inibição da daidzeína no sistema mieloperoxidase/guaiacol/H₂O₂ e detecção da absorbância em 470 nm após 10 minutos de incubação a 37 °C.

Analisando-se os resultados obtidos a partir do método de oxidação do guaiacol percebe-se que os valores de CI₅₀ são baixos indicando que a atividade inibitória apresentada pelas substâncias foi satisfatória. Estes resultados indicam uma clara correlação positiva entre a atividade inibitória da MPO e as propriedades antioxidantes dos flavonóides. Contudo, sabe-se que a constante de reação do guaiacol com a MPO é baixa, o que significa que há fraca afinidade deste substrato pela enzima o que torna mais fácil uma possível inibição. Em função disso, faz-se necessário utilizar outros substratos com maior afinidade pela enzima como o Amplex red, que por ter maior afinidade pela MPO poderia identificar melhor potenciais inibidores.

4.2 Ensaio da atividade inibitória dos flavonóides sobre a mieloperoxidase com o substrato 10-acetil-3,7-diidroxifenoxazina (Amplex Red®)

O Amplex Red® um composto não absorvível, é convertido pela ação de HRP e H_2O_2 a um produto de alta absorção e fluorescência, a resorufin. O ensaio é altamente sensível, permitindo medições de concentração bem baixas de H_2O_2 (KRZYSZTOF, 2005).

Neste ensaio, dentre os flavonóides analisados, verificou-se que a quercetina apresentou maior capacidade de inibição (95,65%), seguido dos demais flavonóides: α -toxicarol (34,78%), 6a,12a-desidro- α -toxicarol (30,43%), 12a-hidroxi- α -toxicarol (21,74%), daidzeína (21,74%), genisteína (17,39), luteolina (13,04%), obovatina (13,04%) e deguelina (4,34%). (Gráfico 5). Com base nestes resultados, testou-se a quercetina em outras concentrações (1 e 5 μ M) e verificou-se uma inibição de 13,04% e 56,5%, respectivamente (Gráfico 6).

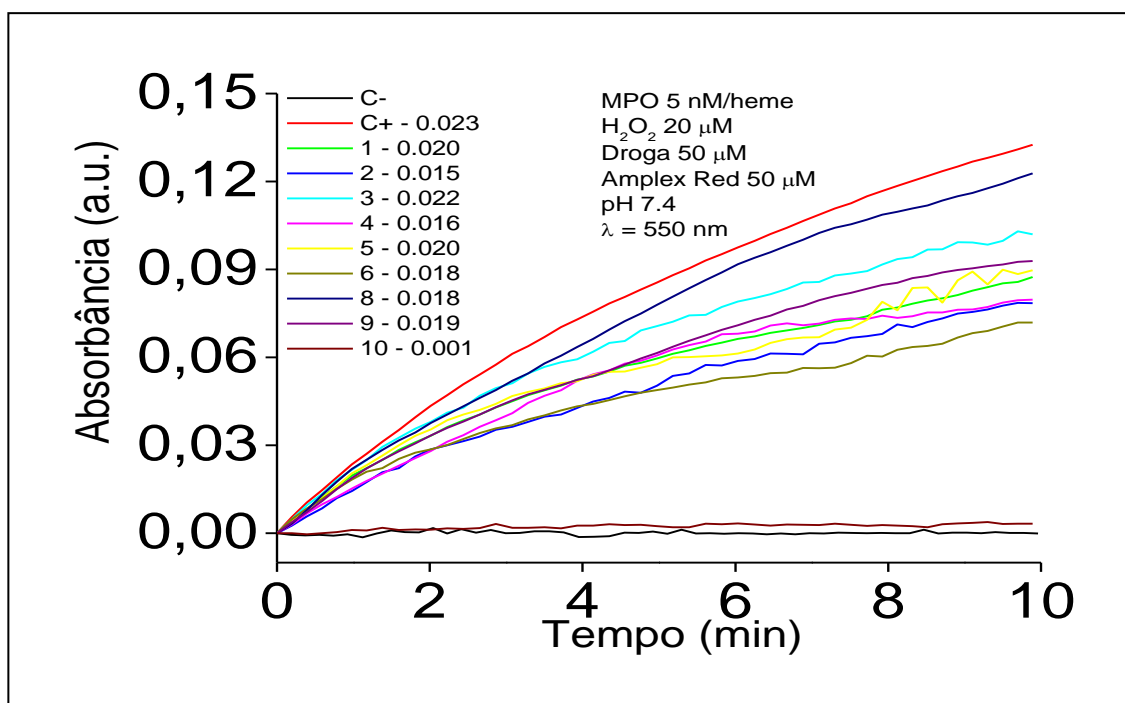


Gráfico 5: Inibição dos flavonóides no sistema mieloperoxidase/Amplex Red®/ H_2O_2 e detecção da absorbância em 550 nm após 10 minutos de incubação a 37 °C. (1 - luteolina; 2 - α -toxicarol; 3 - deguelina; 4 - 6a,12a-desidro- α -toxicarol; 5 - obovatina; 6 - 12a-hidroxi- α -toxicarol; 7 - tephrosina; 8 - daidzeína; 9 - genisteína; 10 - quercetina)

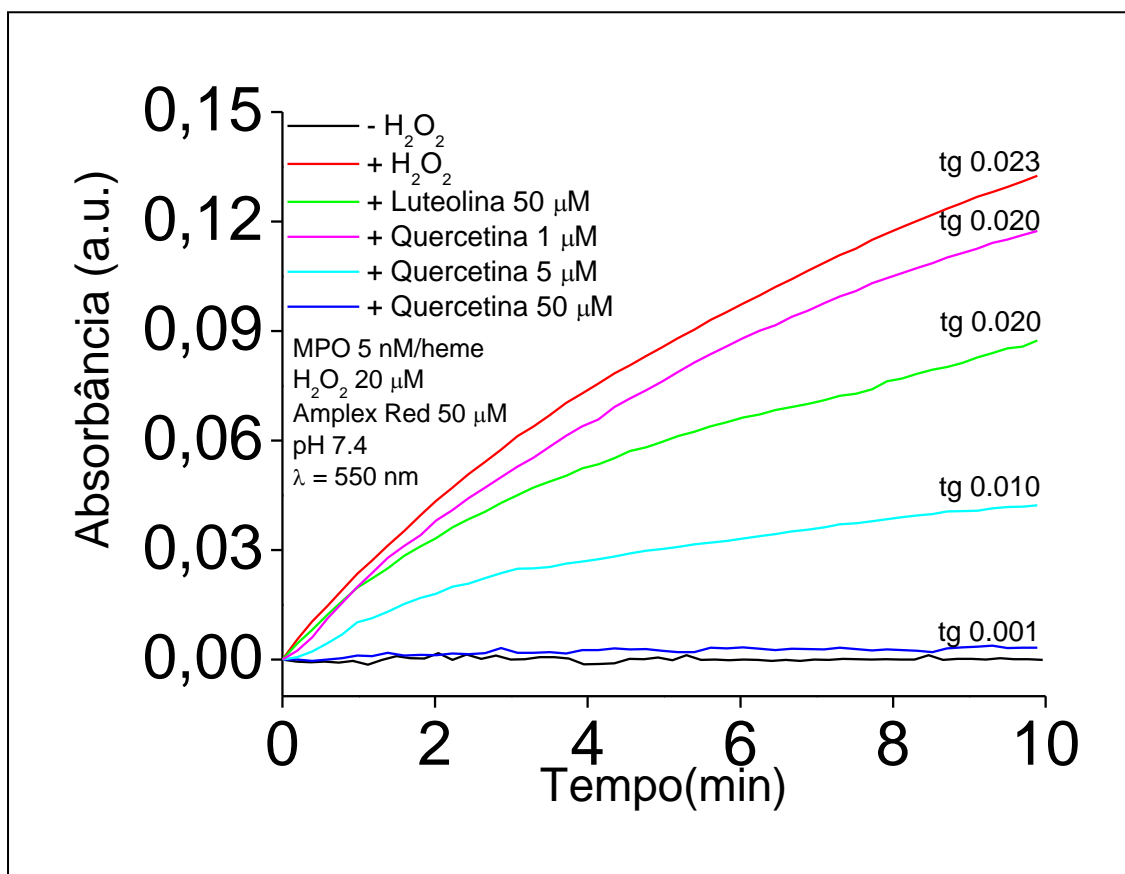


Gráfico 6: Efeito inibitório da quercetina e luteolina no sistema mieloperoxidase/Amplex Red®/H₂O₂.

Os ensaios utilizando guaiacol ou amplexred são importantes na caracterização da possível atividade de inibição da MPO, contudo os mesmo se baseiam na interação da enzima com o peróxido de hidrogênio, o que poderia ser um viés dos ensaios, uma vez que os flavonóides poderiam interferir diretamente com o peróxido na reação. Uma das atividades mais específicas da MPO é a atividade clorinante, portanto no ensaio taurina/cloramina pode-se afirmar com maior segurança o efeito inibidor sobre a enzima MPO (DYPBUKT et al., 2005; MEOTTI, et al., 2007).

4.3 Ensaio de inibição da atividade clorinante da MPO por flavonóides

Várias propostas tem sido sugeridas demonstrando que os flavonóides apresentam capacidade de inibir a produção de ácido hipocloroso (HOCl). Como consequência, estes compostos limitariam os danos teciduais causados por este potente agente oxidante (MEOTTI, et al., 2007). Este ensaio, baseia-se na oxidação da taurina pelo HOCl, formando taurina cloramina. Foi observado que dentre os flavonóides analisados, apenas a quercetina (5 μ M) apresentou uma inibição de cerca de 30% na formação de taurina cloramina após 45 min, conforme demonstrado no gráfico 7. E como, estudos anteriores demonstraram que a produção de taurina cloramina é proporcional à concentração de mieloperoxidase (DYPBUKT et al., 2005). Confirma-se então, a quercetina como um flavonóide com atividade inibitória sobre a produção de mieloperoxidase, resultado já reprotado em outros trabalhos (MEOTTI, et al., 2007).

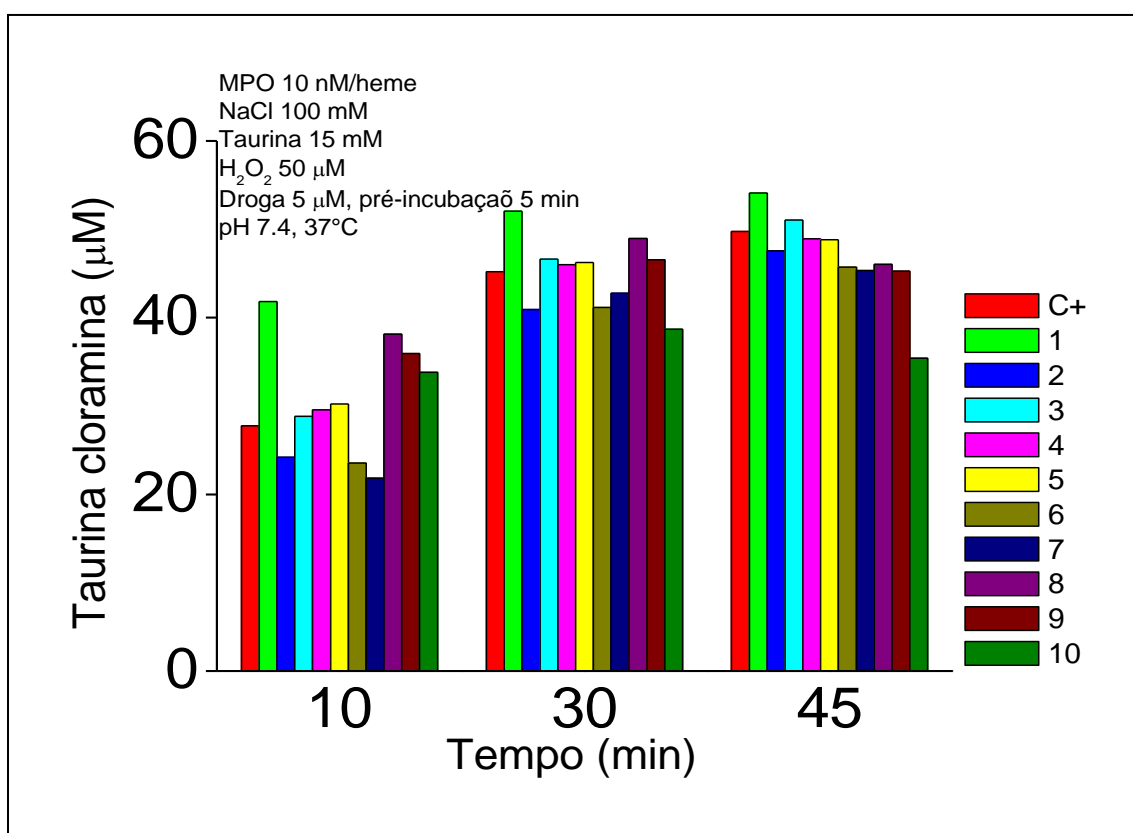


Gráfico 7: Efeito dos flavonóides sobre a formação de taurina cloramina (1 - luteolina; 2 - α -toxicarol; 3 - deguelina; 4 - 6a,12a-desidro- α -toxicarol; 5 - obovatina; 6 - 12a-hidroxi- α -toxicarol; 7 - tephrosina; 8 - daidzeína; 9 - genisteína; 10 - quercetina)

4.4 Efeito de flavonóides sobre a formação de peróxido de hidrogênio em células HL-60 diferenciada para neutrófilos

Pelo fato da MPO utilizar o peróxido de hidrogênio para oxidar inúmeros substratos em espécies reativas de oxigênio (DYPBUKT et al., 2005). A inibição da formação de H_2O_2 se torna um dos processos mais importantes na descoberta de novas drogas antiinflamatórias, pelo fato de que o H_2O_2 é um dos oxidantes mais estáveis e portanto de mais fácil medição. Neste ensaio verificou-se que a quercetina apresentou inibição de 80,39%, seguida da 6a,12a-desidro- α -toxicarol 10,16%.

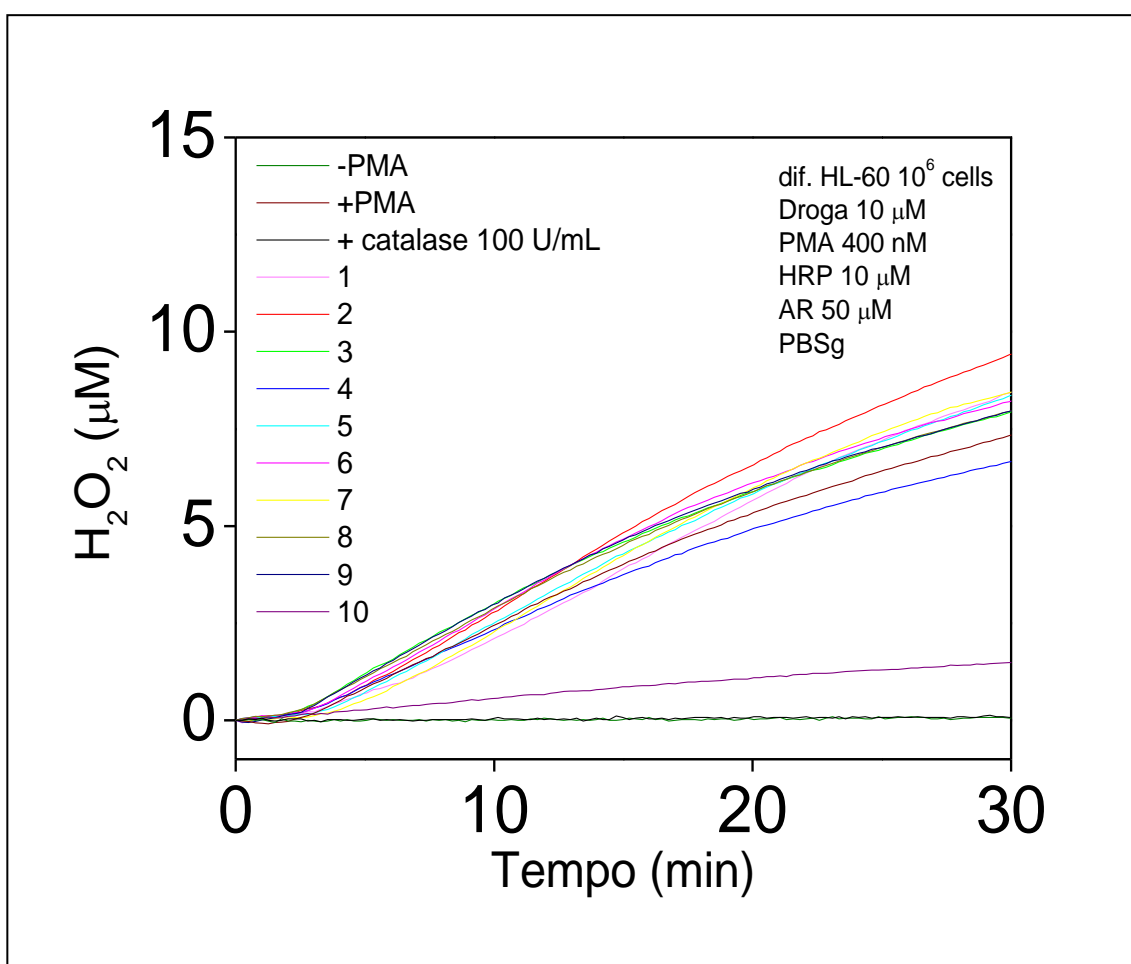


Gráfico 8: Efeito de flavonóides sobre a formação de peróxido de hidrogênio em células HL-60 diferenciadas para neutrófilos e ativadas com PMA. (1 - luteolina; 2 - α -toxicarol; 3 - deguelina; 4 - 6a,12a-desidro- α -toxicarol; 5 - obovatina; 6 - 12a-hidroxi- α -toxicarol; 7 - tephrosina; 8 - daidzeína; 9 - genisteína; 10 – quercetina)

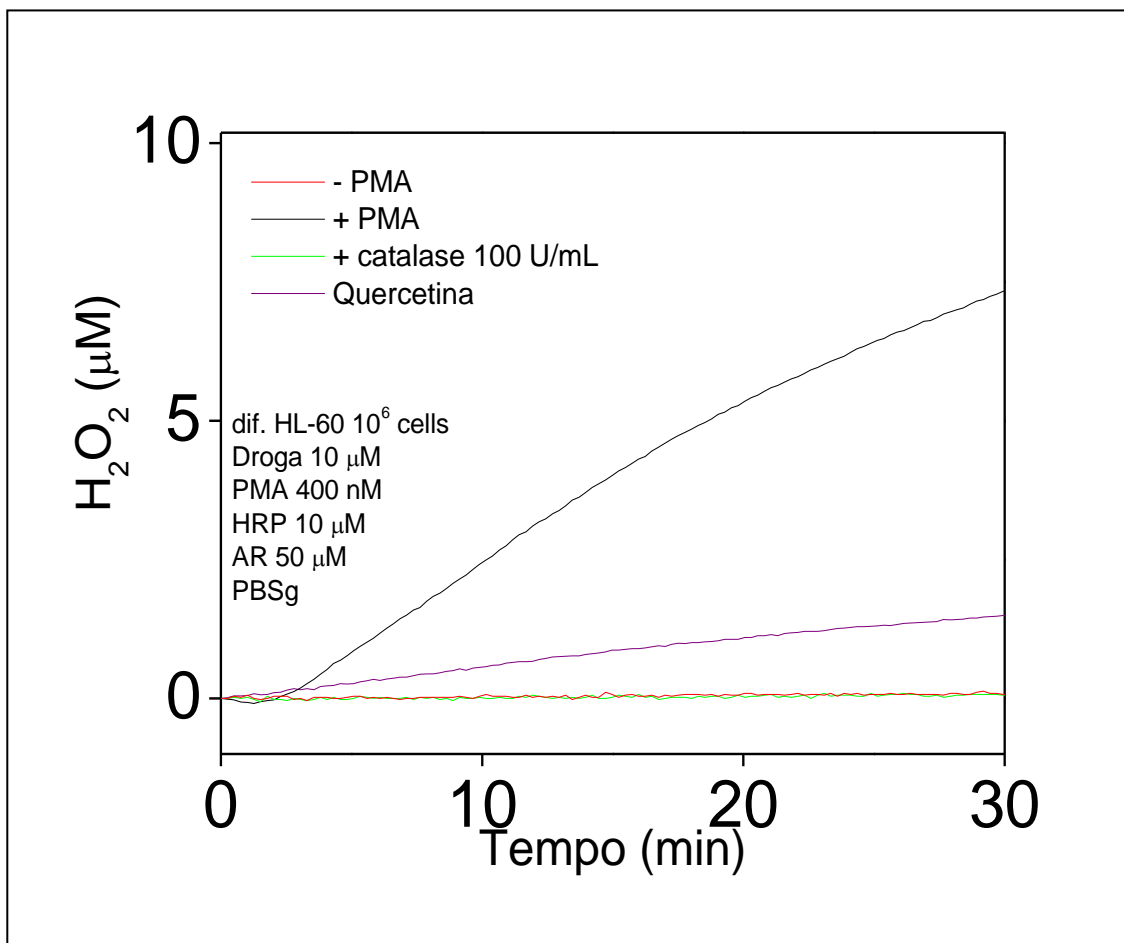


Gráfico 9: Efeito da quercetina sobre a formação de peróxido de hidrogênio em células HL-60 diferenciadas para neutrófilos e ativadas com PMA.

4.5 Efeito de flavonóides sobre a formação de ânion radical superóxido em células HL-60 diferenciada para neutrófilos

Estudos relatam que quando os neutrófilos são estimulados com PMA sofrem uma explosão respiratória em que o oxigênio é reduzido a superóxido. Aproximadamente 30% do superóxido é convertido em ácido hipocloroso pela mieloperoxidase (KLEBANOFF, 1999; KETTLE et al.,1991). Neste ensaio para avaliar a redução do citocromo C verificou-se as seguintes inibições: quercetina 96,12%, obovatina 10,33%; 6a,12a-desidro- α -toxicarol 6,76%, luteolina 6,12%, 12a-desidro- α -toxicarol 5,87%, deguelina 4,51% e genisteína 0,80%.

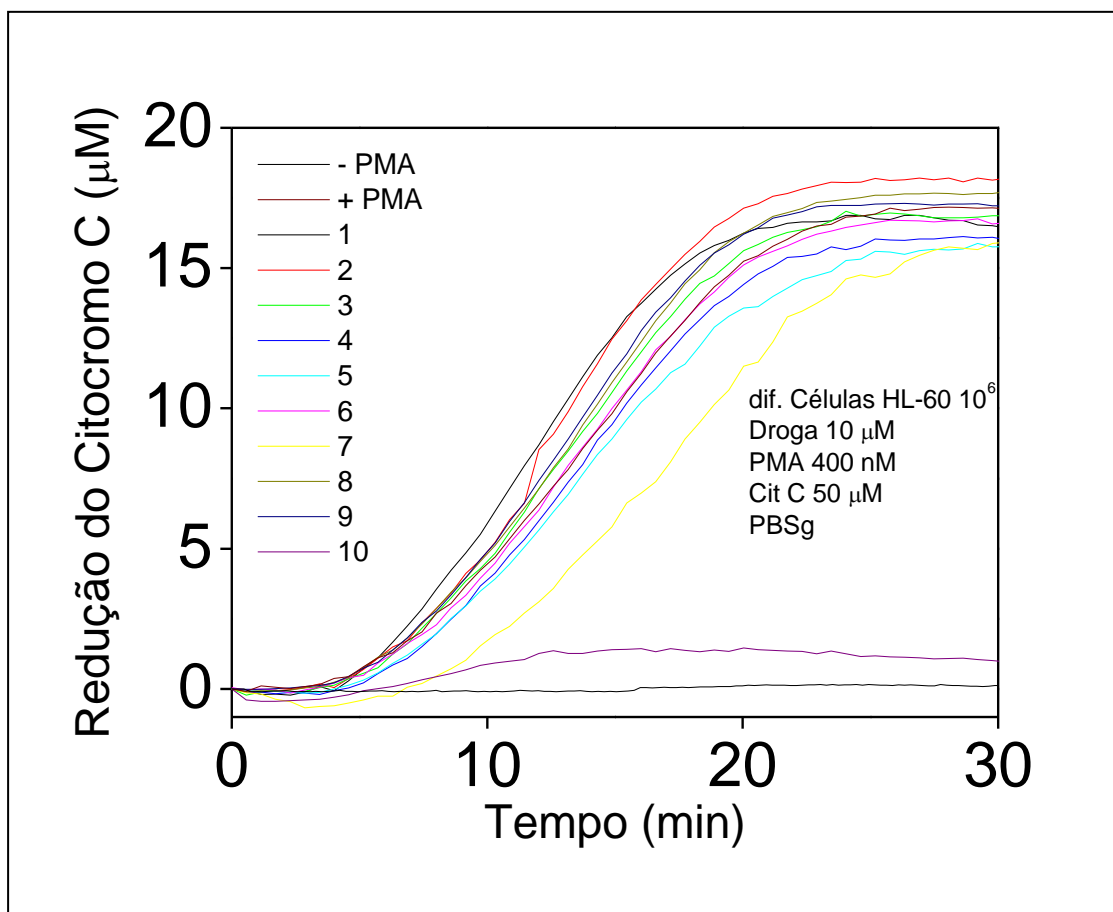


Gráfico 10: Efeito de flavonóides sobre a formação de ânion radical superóxido em células HL-60 diferenciadas para neutrófilos e ativadas com PMA. (1 - luteolina; 2 - α -toxicarol; 3 - deguelina; 4 - 6a,12a-desidro- α -toxicarol; 5 - obovatina; 6 - 12a-hidroxi- α -toxicarol; 7 - tephrosina; 8 - daidzeína; 9 - genisteína; 10 - quercetina)

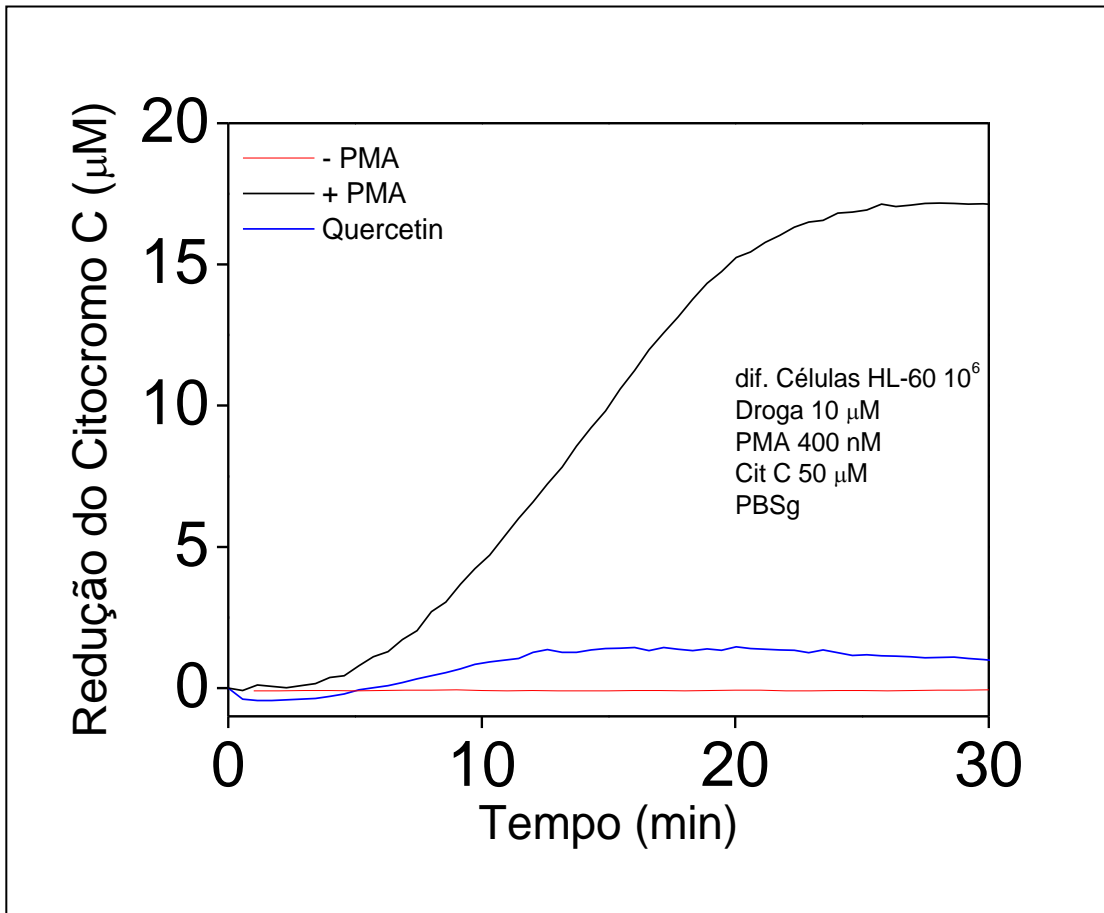


Gráfico 11: Efeito da quercetina sobre a formação de ânion radical superóxido em células HL-60 diferenciadas para neutrófilos e ativadas com PMA.

5. CONCLUSÃO

Com base neste estudo, constatou-se que somente a quercetina apresentou atividade significativa de inibição da produção de H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ podendo estas atividades estar relacionadas com a inibição da MPO. Visto que, pelos outros métodos a quercetina apresentou atividade com valores acima de 90% de inibição sobre a MPO, observando uma correlação positiva entre a atividade da MPO e as propriedades inibitórias dos flavonóides. Os resultados apontam este flavonóide como um importante inibidor de MPO podendo fornecer protótipos para a descoberta de drogas anti-inflamatórias, e concepção de novas estratégias terapêuticas.

6. REFERÊNCIAS

AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content and metabolism. *Nutrition*, v. 18, p. 75-81, 2002.

ARNHOLD J. Free radicals – friends or foes? Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry (Moscow)*, v. 69, p. 4-9, 2004.

ASKARI, A.T.; BRENNAN, M.L.; ZHOU, X.; DRINKO, J.; MOREHEAD, A., THOMAS, J. D.; TOPOL, E. J.; HAZEN, S. L.; PENN, M. S. Myeloperoxidase and plasminogen activator inhibitor 1 play a central role in ventricular remodeling after myocardial infarction. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 197, p. 615-24, 2003.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alimentos e Nutrição - Brazilian Journal of Food and Nutrition*, Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. *Nutrition Reviews*, v.56, n.11, p.317-333, 1998.

CARR, A. C.; MYZAK, M. C.; STOCKER, R.; McCALL, M. R.; FREI, B. Myeloperoxidase binds to low-density lipoprotein: potential implications for atherosclerosis. *FEBS Letters*. v. 487, p. 176-180, 2000.

DYPBUKT, J. M.; BISHOP, C.; BROOKS, W. M.; THONG, B.; ERIKSSON, H.; KETTLE, A. J. A sensitive and selective assay for chloramines production by myeloperoxidase. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 39, p. 1468–1477, 2005.

FERNANDES, D. C.; REGASINI, L. O.; VELLOSA, J. C. R.; PAULETTI, P. M.; GAMBOA, I. C.; BOLZANI, V. S.; OLIVEIRA, O. M. M.; SILVA, D. H. S. Myeloperoxidase Inhibitory and Radical Scavenging Activities of Flavones from *Pterogyne nitens*. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 56, n. 5, p. 723—726, 2008.

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

HANSSON, M.; OLSSON, I.; NAUSEEF, WM. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys*, v. 445, p. 214-24, 2006.

HAZEN, S. L.; CROWLEY, J. R.; MUELLER, D. M.; HEINECKE, J. W. Mass spectrometric quantification of 3-chlorotyrosine in human tissues with attomole sensitivity: a sensitive and specific marker for myeloperoxidase-catalyzed chlorination at sites of inflammation. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 23, n. 6, p. 909–916, 1997.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 13, p. 572–584, 2002.

KHALIL, N. M.; PEPATO, M. T.; BRUNETTI, I. L. Free Radical Scavenging Profile and Myeloperoxidase Inhibition of Extracts from Antidiabetic Plants: *Bauhinia forficata* and *Cissus sicyoidesii*. *Biological Research*, v. 41, p. 165-171, 2008.

KLEBANOFF, S. J. Oxygen Metabolites from Phagocytes. In: Klebanoff, S. J., ed., *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 721– 768. 1999.

KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Mechanism of inhibition of myeloperoxidase by anti-inflammatory drugs. *Biochem. Pharmacol*, v. 41, p. 1485– 1492. 1991.

KOELSCH, M.; MALLAK, R.; GRAHAM, G. G.; KAJER, T.; MILLIGAN, M. K.; NGUYEN, L. Q.; NEWSHAM, D. W.; KEH, J. S.; KETTLE, A. J.; SCOTT, K. F.; ZIEGLER, J. B.; PATTISON, D. I.; FU, S.; HAWKINS, C. L.; REES, M. D.; DAVIES, M. J. Acetaminophen (paracetamol) inhibits myeloperoxidase-catalyzed oxidant production and biological damage at therapeutically achievable concentrations. *Biochemical Pharmacology*, v. 79, p. 1156–1164, 2010.

KOSTYUK, V. A.; KRAEMER, T.; SIES, H.; SCHEWE, T. Myeloperoxidase/nitrite-mediated lipid peroxidation of low-density lipoprotein as modulated by flavonoids. *FEBS LETTERS*, v. 537, p. 146-150, 2003.

LAU, D.; BALDUS, S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 111, p. 16–26, 2006.

MALLE, E.; FURTMULLER, PG.; SATTLER, W.; OBINGER, C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? *British Journal of Pharmacology* , v. 152, p. 838–854, 2007

NICHOLLS, S. J.; HAZEN, S. L. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. *Journal of the American Heart Association*, v. 25, p. 1102-1111, 2005.

PODREZ, E. A.; SCHMITT, D.; HOFF, H. F.; HAZEN, S. L. Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. *Journal of Clinical Investigation*, v. 103, n. 11, p. 1547-1560, 1999.

PODREZ, E. A.; ABU-SOU, H. M.; HAZEM, S. L. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerose. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 28, p. 1717-1725, 2000.

REGASINI, L. O.; FERNANDES, D. C.; GAMBOA, I. C.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. D. S. Constituintes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (caesalpinioideae). *Química Nova*, v. 31, n. 4, p. 802-806, 2008.

REGASINI, L. O.; VELLOSA, J. C. R.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M.; OLIVEIRA, O. M. M.; KHALIL, N. M.; BRUNETTI, I. L.; YOUNG, M. C. M.; BARREIRO, E. J.;

BOLZANI, V. D. S. Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. *Phytochemistry*, v. 69, p. 1739–1744, 2008.

REYNOLDS, W. F.; KUMAR, A. P.; PIEDRAFITA, F. J. The human myeloperoxidase gene is regulated by LXR and PPAR α ligands. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 349, p. 846–854, 2006.

RODRIGUES, M. R.; RODRIGUEZ, D.; RUSSO, M.; CAMPA, A. macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 292, p. 869-873, 2002.

ROSA, E. A.; SILVA, B. C.; SILVA, F. M.; TANAKA, C. M. A.; PERALTA, R. M.; OLIVEIRA, C. M. A; KATO, L.; FERREIRA, H. D.; SILVA, C. C. Flavonóides e atividade antioxidante em *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia - Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 20, n. 4, p. 484-488, 2010.

RUTGERS, A.; HEERINGA, P.; GIESEN, J. E. H. M.; THEUNISSEN, R. T.; JACOBS, H.; TERVAERT, J. W. C. Neutrophil myeloperoxidase activity and the influence of two single-nucleotide promoter polymorphisms. *British Journal of Haematology*, v. 123, p. 536–538, 2003.

SEGELMARK, M.; PERSSON, B.; HELLMARK, T.; WIESLANDER, J. Binding and inhibition of myeloperoxidase (MPO): a major function of ceruloplasmin? *Clinical and Experimental Immunology*, v. 108, p. 167-174, 1997.

SHIBA, Y.; KINOSHITA, T.; CHUMAN, H.; TAKETANI, Y.; TAKEDA, E.; KATO, Y.; NAITO, M.; KAWABATA, K.; ISHISAKA, A.; TERAOKA, J.; KAWAI, Y. Flavonoids as Substrates and Inhibitors of Myeloperoxidase: Molecular Actions of Aglycone and Metabolites. *Chem. Res. Toxicol*, v. 21, p. 1600–1609, 2008.

VELLOSO, J. C. R.; KHALIL, N. M.; GUTIERRES, V. O.; SANTOS, V. A. F. F. M.; FURLAN, M.; BRUNETTI, I. L.; OLIVEIRA, O. M. M. F. *Salacia campestris* root bark extract: peroxidase inhibition, antioxidant and antiradical profile. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 45, n. 1, 2009.

ZHANG, R.; BRENNAN, M. L.; FU, X.; RONNIER, J.; AVILES, R.; PEARCE, G. L., PENN, M. S.; TOPOL, E. J.; SPRECHER, D. L.; HAZEN, S. L. Association Between Myeloperoxidase Levels and Risk of Coronary Artery Disease. *JAMA*, v. 286, n. 17, p. 2136-2142, 2001.

ZHANG, R.; BRENNAN, M. L.; SHEN, Z.; MACPHERSON, J. C.; SCHMITT, D.; MOLENDI, C. E.; HAZEN, S. L. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 46116-46122, 2002.

6. Cronograma

Descrição	Ago 2010	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2011	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
Avaliação da ação inibitória de flavonóides sintéticos sobre a mieloperoxidase in vitro	X	X	X	X	X							
Avaliação da ação inibitória de flavonóides sintéticos sobre a mieloperoxidase em cultura de células							X	X	X	X		
Apresentação oral parcial				X								
Elaboração do relatório parcial						X						
Elaboração do Resumo e Relatório Final											X	
Preparação da Apresentação Final para o Congresso											X	X

X = Atividades já realizadas

X = Atividades não realizadas.