



<http://revistarebram.com/index.php/revistauniara>

EFEITO DO ROFLUMILASTE SOBRE A QUIMILUMINESCÊNCIA DO LUMINOL E A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Larissa Sena de Oliveira*; Miriane da Costa Gileno**.

* Egressa do Curso de Farmácia e Biomedicina - Universidade de Araraquara-UNIARA.

** Docente dos Cursos de Farmácia e Biomedicina do Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade de Araraquara-UNIARA.

*Autor para correspondência e-mail: mdcgileno@uniara.edu.br

PALAVRAS-CHAVE

Roflumilaste
Mieloperoxidase
Doença Obstrutiva
Pulmonar Crônica

KEYWORDS

Roflumilast
Myeloperoxidase
Chronic Obstructive
Pulmonary Disease

RESUMO: A Doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é caracterizada como uma inflamação crônica do parênquima pulmonar e das vias aéreas, responsável por desencadear uma resposta pró-inflamatória que estimula a liberação dos leucócitos e plaquetas. Uma das características importantes dessa síndrome é o aumento na contagem de polimorfonucleares (PMN), que muitas vezes são liberados na sua forma jovem apresentando alto nível de mieloperoxidase (MPO). A identificação destes é essencial para o entendimento das manifestações sistêmicas e das doenças associadas à DPOC. A fosfodiesterase-4 (PDE4) é uma enzima que catalisa o metabolismo dos nucleotídeos, especificamente o c-AMP e c-GMP expresso em inúmeras células e em doenças respiratórias. Alguns inibidores dessa enzima são utilizados no tratamento dessas doenças, destacando o Roflumilaste. O objetivo deste trabalho foi avaliar se o presente medicamento inibe a produção de espécies reativas de oxigênio pelos neutrófilos por método quimiluminescente com o Luminol, pois na inflamação, os agentes oxidantes da MPO são capazes de interferir nas funções das células e contribuir para agressões. Por isso a MPO tem sido utilizada como um biomarcador prognóstico, principalmente nas doenças inflamatórias agudas e crônicas e em doenças pulmonares. Os resultados demonstraram moderadas inibições do fármaco quanto à quimiluminescência dependente do luminol, demonstrando atividade antioxidante.

EFFECT OF ROFLUMILAST ON LUMINOL CHEMILUMINESCENCE AND THE PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES

ABSTRACT: Chronic obstructive pulmonary disease (DPOC) is characterized as a chronic inflammation of the pulmonary parenchyma and of the airways, responsible for triggering a pro-inflammatory response that stimulates the release of leukocytes and platelets. One of the important characteristics of this syndrome is the increase in the polymorphonuclear (PMN) count, which is often released in its young form presenting high level of myeloperoxidation (MPO). Identification of these is essential for understanding the systemic manifestations and of diseases associated with COPD. Phosphodiesterase-4 (PDE4) is an enzyme that catalyzes the metabolism of nucleotides, specifically c-AMP and c-GMP expressed in innumerable cells and in respiratory diseases. Some inhibitors of this enzyme are used in the treatment of these diseases, highlighting Roflumilaste. The objective of this work was to evaluate if the present drug inhibits the production of reactive oxygen species by neutrophils by chemiluminescent method with Luminol, because in the inflammation, the oxidizing agents of MPO are able to interfere in the functions of the cells and contribute to aggressions. Therefore MPO has been used as a prognostic biomarker, mainly in acute and chronic inflammatory diseases and pulmonary diseases. The results obtained were moderate inhibition of the drug for luminol dependent chemiluminescence, demonstrating antioxidant activity.

Recebido em: 11/11/2021

Aprovação final em: 19/03/2022

DOI: <https://doi.org/10.25061/2527-2675/ReBraM/2022.v25i2.1035>

INTRODUÇÃO

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica, desde indícios de sua descoberta, esteve relacionada a dois conjuntos de manifestações clínicas: o tipo bronquítico e o tipo enfisematoso. Estes grupos eram associados a personagens de Cervantes do livro “Dom Quixote de la Mancha”, publicado em 1605. Dom Quixote pertencia ao grupo enfisematoso: era esquelético e dispneico, enquanto Sancho Pança representava o brônquico, destacando a presença de tosse crônicas. Com o passar dos anos e com o avanço tecnológico, a DPOC, de uma pneumopatia crônica e obstrutiva, transfigurou-se para uma doença sistêmica, relacionada principalmente, com as células inflamatórias, e envolvendo diversas manifestações clínicas extrapulmonares: anemia, depressão, e várias outras, que permitiram que a imagem de Sancho Pança e Dom Quixote deixassem, de forma romântica, a imagem da DPOC na literatura médica (OLIVEIRA, 2013).

Foi descoberta na década de 60, e é definida como uma síndrome de inflamação crônica das vias aéreas e parênquima pulmonar, com participação de várias células e mediadores que desencadeiam uma resposta pró-inflamatória, que conseqüentemente conduzem a uma lesão (ALMEIDA, 2015; JARDIM *et al.*, 2009) e é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, estando na grande maioria dos casos relacionada ao tabagismo (ZONZIN *et al.*, 2017). Entre os principais fatores de risco desta doença, pode-se destacar o tabagismo, onde aproximadamente, 1 em cada 5 fumantes desenvolverá a doença, enquanto nos não fumantes 1 em cada 20. Sendo assim, o tabagismo está diretamente associado com a inflamação do pulmão, dificilmente reversível e a diminuição do transporte ciliar, sendo a tosse um fator de importância para a remoção de secreções traqueobrônquicas. (FURTADO, 2002). Outras possíveis etiologias são as modificações no ar conseqüentes da queima de biomassa e industrialização (RUFINO *et al.*, 2013). Os gases da fumaça do tabaco desencadeiam um processo inflamatório crônico que provocam alterações nas estruturas do pulmão, principalmente nas vias aéreas pequenas. As primeiras células de defesa a migrar para o local da inflamação são os neutrófilos, seguidos dos macrófagos e linfócitos. Fibroblastos e células epiteliais também se deslocam para a inflamação (DA COSTA *et al.*, 2009; JUNIOR *et al.*, 2014).

A resposta inflamatória é desenvolvida por um conjunto de elementos externos e por uma resposta individual. Ambos são capazes de determinar patologias, sintomatologias e pela evolução da doença. Os elementos externos estão ligados à inalação de partículas e gases tóxicos e inalação da fumaça do cigarro, que contribui para o aparecimento dos sintomas respiratórios e o acúmulo de partículas inaladas, enquanto os individuais estão relacionados com os fatores genéticos, principalmente a deficiência de α 1-antitripsina, que é a causa da doença obstrutiva pulmonar crônica presente no público jovem (BAGATIN *et al.*, 2006).

Os principais sintomas desta doença incluem: tosse, produção de catarro, e dispneia crônica e progressiva, que é o mais característico. Ansiedade e depressão são conseqüências de pacientes, principalmente os idosos, que consideram natural a redução na atividade física, que agravam o quadro da dispneia (ZONZIN *et al.*, 2017).

Na parede das vias aéreas de tabagistas as principais células de defesas encontradas são os linfócitos T e os macrófagos, e na luz alveolar um predomínio de acúmulo dos neutrófilos. Em conseqüência da concentração destes glóbulos brancos, tem-se o aparecimento de mediadores inflamatórios específicos que são a causa para da lesão estrutural da DPOC (DA COSTA *et al.*, 2009). As lesões estruturais da doença obstrutiva pulmonar crônica são resultado de um caldo inflamatório e oxidativo que envolve várias células, interleucinas e produtos oxidantes responsáveis por modificar as fibras elásticas e o músculo bronquiolar presentes na estrutura pulmonar (RUFINO *et al.*, 2013).

Além das mudanças nas fibras elásticas e no músculo bronquiolar, outras mudanças patológicas são características na DPOC, que são distribuídas nas vias aéreas proximais, periféricas, no parênquima pulmonar e na vasculatura pulmonar. A doença pulmonar obstrutiva crônica tem como principal característica uma resposta exagerada aos estímulos de mediadores inflamatórios. Os eosinófilos, por exemplo, são as

principais células que aparecem na asma, os linfócitos são células que também aparecem nesta sintomatologia, enquanto os neutrófilos são os principais envolvidos na patogênese da doença (OLIVEIRA, 2013).

Na DPOC, devido às inflamações recorrentes (característico da doença) há alterações dos componentes celulares do pulmão, que faz com que as células inflamatórias aumentem: principalmente macrófagos, neutrófilos e linfócito CD8+, seguidos de um aumento excessivo de produtos oxidativos, o que facilita a colonização por microrganismos. A interação entre esses fatores faz com que haja um recrutamento de mais células pró-inflamatórias causando uma destruição periférica dos ligantes dos alvéolos, que facilitam uma possível fusão (RUFINO *et al.*, 2006).

Devido às alterações fisiopatológicas da DPOC, forma-se uma sequência de eventos na cascata inflamatória: o aumento do número de neutrófilos, macrófagos e linfócitos com predominância do CD8, há uma grande concentração de substâncias pró-inflamatórias tais como: leucotrieno B4, interleucina (IL) 8, fator de necrose tumoral (TNF), entre outros e o estresse oxidativo causado pela inalação de oxidantes sofre aceleração. Conseqüentemente isso pode desencadear uma resposta inflamatória sistêmica, devido a estimulação do sistema hematopoiético, especificamente da medula óssea, com liberação de leucócitos e plaquetas. Há evidências também no aumento da contagem de leucócitos, principalmente os neutrófilos, alguns destes neutrófilos são liberados na sua forma jovem, que apresentam alto nível de mieloperoxidase, favorecendo ao desequilíbrio protease anti-protease. A identificação destes mediadores e participantes da cascata inflamatória na circulação sistêmica é essencial para o entendimento das manifestações sistêmicas e das doenças associadas à DPOC (RIBEIRO, 2008).

Nos portadores da doença pulmonar obstrutiva crônica, os neutrófilos apresentam respostas quimiotáticas aumentadas, e isso colabora para a que estes possam digerir o tecido conjuntivo, causando as lesões. Isso porque essas células acabam por expressar uma maior quantidade de moléculas de adesão (ALMEIDA, 2015).

A destruição pulmonar está diretamente ligada ao desequilíbrio entre as proteases e antiproteases, e devido a este fato o neutrófilo tem grande importância na patogênese desta destruição devido a liberação de suas enzimas neutrofilicas que resulta no aumento das proteases no pulmão (DA COSTA *et al.*, 2009). O tabagismo tem como consequência o aumento do número de macrófagos de 5 a 10 vezes no pulmão, e este aumento contribui para as lesões das vias aéreas, devido às enzimas agressivas deste leucócito (ALMEIDA, 2015).

Os gases tóxicos consequentes do tabagismo causam agressões no pulmão e ele reage através de uma resposta inflamatória, onde é capaz de recrutar células de defesa, substâncias oxidativas, antioxidativas e mediadores imunitários liberados, estes responsáveis por interferir na função e na estrutura do parênquima pulmonar e das vias respiratórias. (RUFINO *et al.*, 2007). A agressão pulmonar e a inflamação presentes na doença são, principalmente, pela exposição a partículas e gases inalados, porém pode ocorrer também pela deficiência da $\alpha 1$ antitripsina, que é uma proteína responsável por proteger a elastina pulmonar, que suporta as paredes dos alvéolos e também por neutralizar a elastase (proteína produzida pelos neutrófilos quando eles são atraídos para uma inflamação). A pessoa que apresenta deficiência desta proteína, não controla a elastase dos neutrófilos, onde conseqüentemente se rompe a elastina pulmonar (DARIO, 2016).

Essa enzima é liberada quando os leucócitos polimorfonucleares são ativados e sofrem degranulação em microcirculações coronarianas. Em pacientes que apresentam dores no tórax e insuficiência cardíaca, a mieloperoxidase se encontra em níveis altos e é um importante marcador no diagnóstico (ESPORCATTE *et al.*, 2007).

A MPO está presente no conteúdo proteico dos neutrófilos, macrófagos, e monócitos, especificamente em maior quantidade nos neutrófilos. Ela forma um oxidante que tem o poder de eliminar os microrganismos, o HOCl, que pode causar efeitos nocivos para a célula (QUADROS *et al.*, 2013).

Na inflamação, os agentes oxidantes da MPO são capazes de interferir nas funções das células e

contribuir para agressões, como a lesão tecidual. Por isso a MPO tem sido utilizada como um biomarcador prognóstico, principalmente nas doenças inflamatórias agudas e crônicas e em doenças pulmonares (NUSSBAUM *et al.*, 2013). Os neutrófilos são as células que mais são afetadas na ativação pela MPO, que modulam a sinalização intracelular. Em uma inflamação os neutrófilos têm sua sobrevivência prolongada, já que é o leucócito que tem um menor tempo de vida. Quando sofrem apoptose, eles são removidos pelos macrófagos, que facilita no combate da inflamação (KEBIR *et al.*, 2018).

A mieloperoxidase é sintetizada na medula óssea durante a diferenciação das células mielóides, e é encontrada principalmente nos neutrófilos, sendo um dos principais constituintes de seus grânulos. Ela é liberada após ativação desta célula de defesa, para ajudar no combate de agentes microbianos. Porém ela pode reagir com o peróxido de hidrogênio, formar radicais livres e substâncias oxidantes que promovem danos oxidativos no organismo (ROMAN *et al.*, 2008; PIRES, *et al.*, 2012).

O luminol é um dos principais substratos utilizados nas reações de quimiluminescência porque pode ser oxidado por peróxido de hidrogênio, na presença de um catalisador, que irá originar a um peróxido reativo, resultando na emissão de luz, que é detectada através de luminômetros (SANTOS *et al.*, 1994).

De acordo com Jardim (2009), o tratamento da DPOC tem como objetivo amenizar os sintomas, com melhora da qualidade de vida, não deixando a doença progredir, com o intuito de evitar exacerbações e internações aumentando assim a sobrevivência. O tratamento inclui broncodilatadores, antibióticos, corticosteroides, entre outros (JADIM *et al.*, 2009).

Lançado no Brasil, e um dos principais medicamentos de escolha para tratamento da DPOC em pacientes com a doença avançada, é o roflumilaste. Ele age como anti-inflamatório inibindo a enzima fosfatidililesterase -4 (PDE4), que eleva os níveis intracelulares da AMPc, que conseqüente inibe alguns dos mediadores inflamatórios (TNF α , IL-2, LTB $_4$, entre outros), que são de extrema importância na patogênese da DPOC. A inibição dessas citocinas causa um relaxamento da musculatura lisa e uma broncodilatação, trazendo benefícios para o tratamento da doença. A inibição da PDE4 também é capaz de inibir a desgranulação dos neutrófilos (DA COSTA *et al.*, 2013; HATZELMANN *et al.*, 2010).

O objetivo deste trabalho foi avaliar se o Roflumilaste inibe a produção de espécies reativas de oxigênio por método quimiluminescente com o Luminol.

MATERIAL E MÉTODOS

EQUIPAMENTOS

As reações quimiluminescentes foram monitoradas em Luminômetro: Synergy 2 – BioTek, realizadas na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara.

ROFLUMILASTE (DAXAS[®])

Diluiu-se uma cápsula de Roflumilaste contendo 500 μ cg em água e a partir de uma solução mãe 1,2 μ M, trabalhou-se com concentrações finais 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 n M.

AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE EROs COM MIELOPEROXIDASE COMERCIAL. ENSAIO DE QUIMILUMINESCÊNCIA DEPENDENTE DO LUMINOL (QLDLUM)

A oxidação do luminol pode ocorrer tanto pelo sistema MPO/H $_2$ O $_2$ (ação peroxidásica) como devido a reação luminol/HOCl com a formação de uma diazoquinona que posteriormente reage com H $_2$ O $_2$ formando aminofalato eletronicamente excitado, que ao voltar para o estado fundamental emite luz (ALLEN 2000), portanto a quimiluminescência dependente do luminol (QLDLum) é utilizada para detecção de todas as ERO formadas no “burst” oxidativo.

Para a realização dos testes as soluções empregadas na placa de leitura foram: tampão PBS-D, luminol (4×10^{-4} M), MPO comercial (Sigma), diluída como especificações do fabricante (10 μ L), a solução de

Roflumilaste em diferentes concentrações e H_2O_2 ($4 \times 10^{-3}M$). O tempo de reação foi de 10 minutos e o volume final de reação 250 μL .

ANÁLISE ESTATÍSTICA

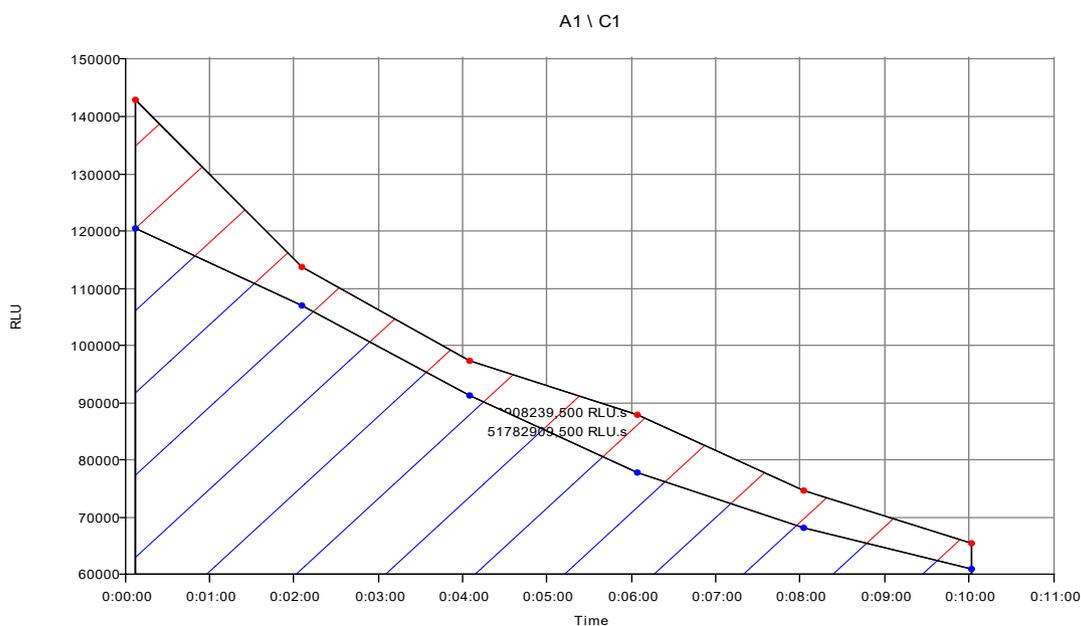
Os resultados foram expressos como média e desvio padrão e comparados por análise de variância (Anova) seguido de teste-t de Student onde foi estabelecido o nível de significância de $p < 0,05$. Todos os experimentos foram realizados no mínimo em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ENSAIO DE QLDLUM COM MPO COMERCIAL. EFEITO SUPRESSOR DO ROFLUMILASTE

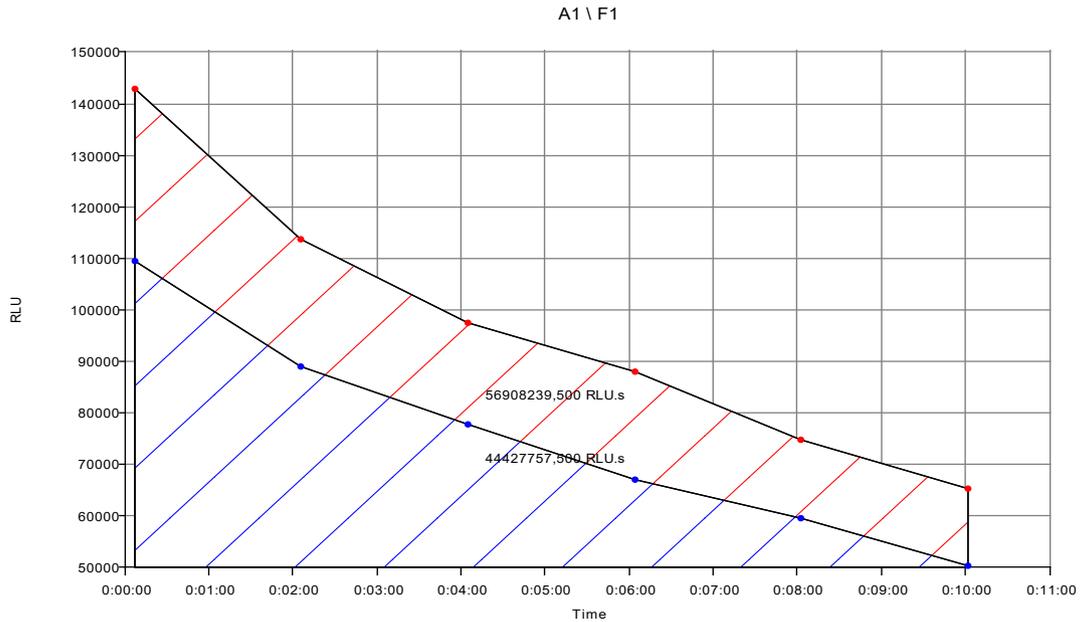
O efeito supressor do fármaco Roflumilaste sobre a quimiluminescência do luminol com MPO obtida de neutrófilos humanos e conseqüentemente, sobre a produção das ERO, está demonstrado nas Figuras 1 a 6 e Tabela 1. Em todas as concentrações foi observada uma inibição moderada quanto à quimiluminescência dependente do luminol, mas não se observou diferenças significativas entre os grupos (Figura 7). Como demonstrado pelo cálculo de regressão linear, essa inibição foi independente da concentração do medicamento.

Figura 1- Cinéticas representativas da emissão de luz do sistema MPO/ H_2O_2 /Luminol (curva vermelha) presença de Roflumilaste 0,1 nM (curva azul).



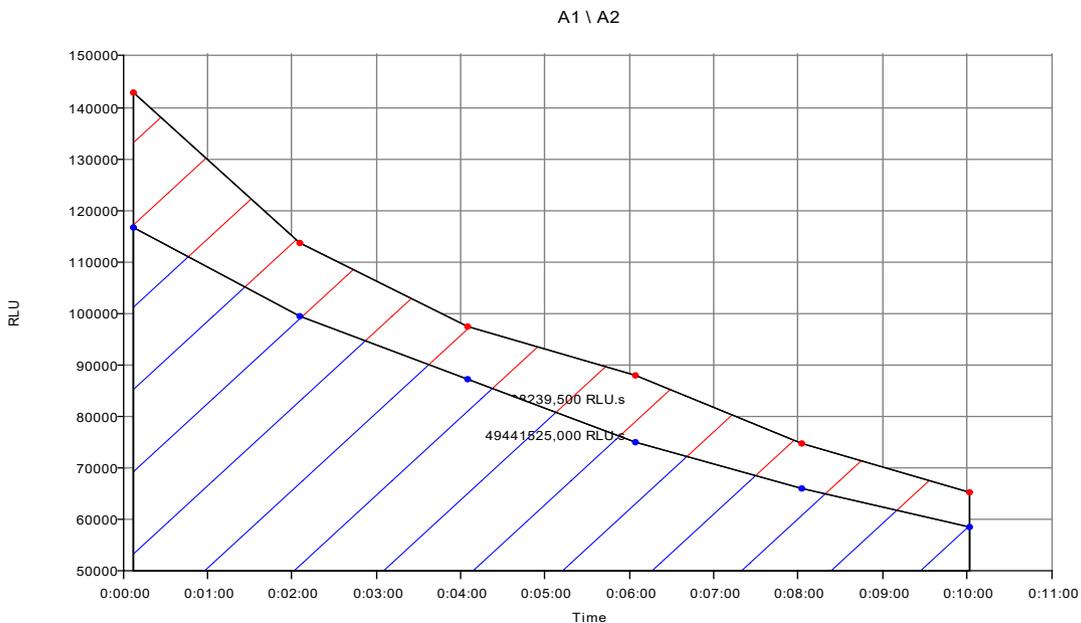
Fonte: Dados de pesquisa, 2018.

Figura 2 - Cinéticas representativas da emissão de luz do sistema MPO/H₂O₂/Luminol (curva vermelha) e na presença de Roflumilaste 0,2 nM (curva azul).



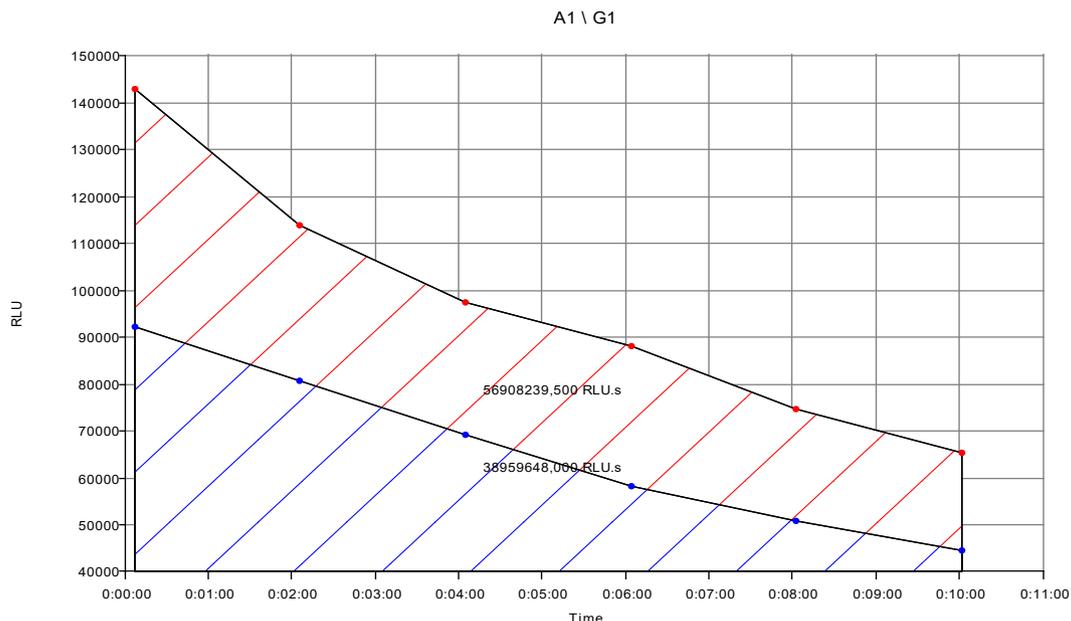
Fonte: Dados de pesquisa, 2018.

Figura 3 - Cinéticas representativas da emissão de luz do sistema MPO/H₂O₂/Luminol (curva vermelha) e na presença de Roflumilaste 0,3 nM (curva azul).



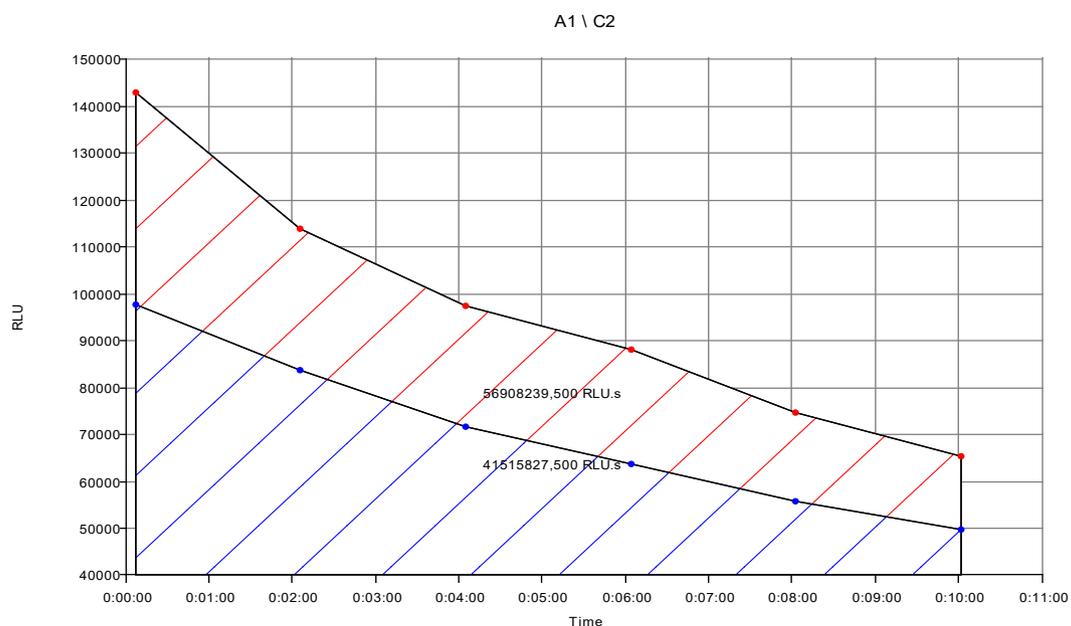
Fonte: Dados de pesquisa, 2018.

Figura 4 - Cinéticas representativas da emissão de luz do sistema MPO/H₂O₂/Luminol (curva vermelha) e na presença de Roflumilaste 0,4 nM (curva azul).



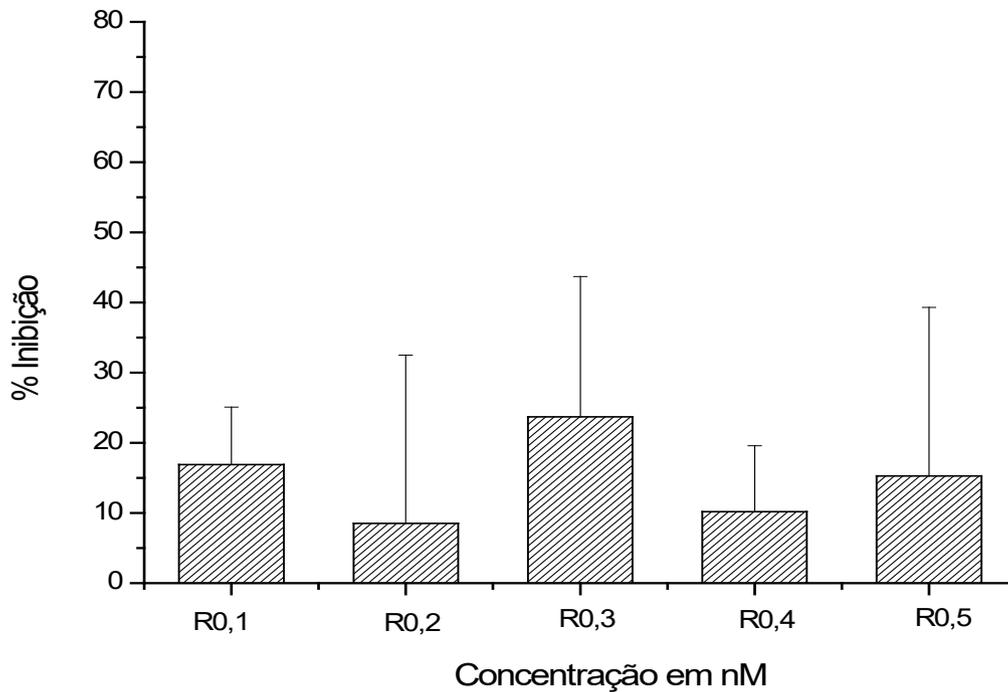
Fonte: Dados de pesquisa, 2018.

Figura 5 - Cinéticas representativas da emissão de luz do sistema MPO/H₂O₂/Luminol (curva vermelha) e na presença de Roflumilaste 0,5 nM (curva azul).



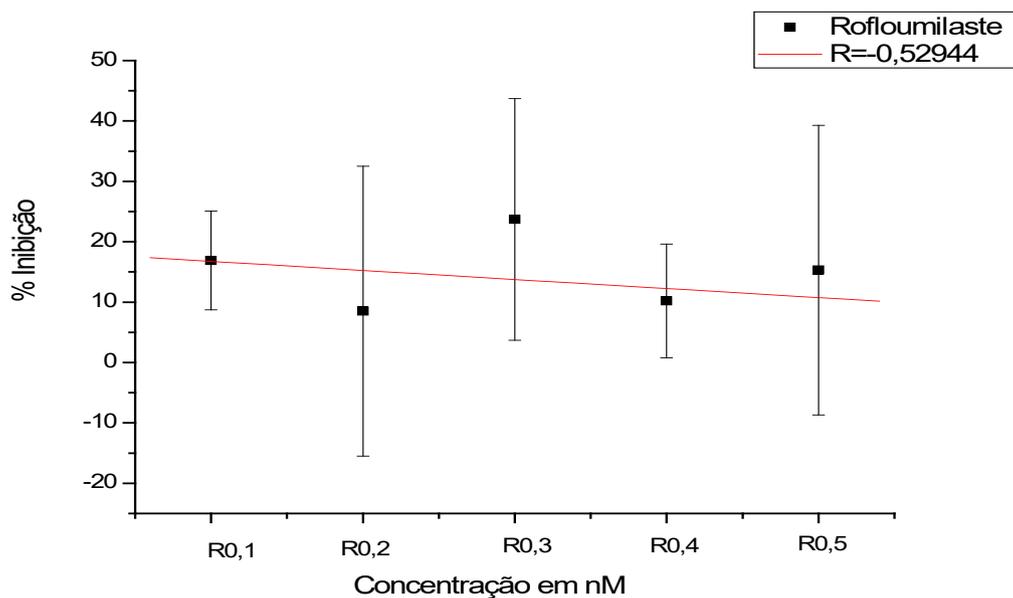
Fonte: Dados de pesquisa, 2018.

Figura 6 - Efeito da solução contendo o princípio ativo Roflumilaste em diferentes concentrações sobre a inibição da produção de ERO na quimiluminescência do luminol com MPO comercial obtida de neutrófilos humanos.



Fonte: Dados de pesquisa, 2018.

Figura 7- Relação entre a concentração do princípio ativo Roflumilaste e a quimiluminescência do luminol com MPO comercial obtida de neutrófilos humanos.



Fonte: Dados de pesquisa, 2018.

Tabela 1 - Percentagem da Inibição da quimiluminescência (QLum) induzida por Roflumilaste.

	Concentração (nM)				
	0,1 (nM)	0,2 (nM)	0,3 (nM)	0,4 (nM)	0,5 (nM)
Roflumilaste	16,9 ± 8,19	8,5 ± 24	23,7 ± 20	20,2±9,4	15,5±24

*Valor apresentado como média ± desvio padrão.

Fonte: Dados de pesquisa, 2018.

A DPOC é uma doença sistêmica relacionada com células inflamatórias e manifestações clínicas extrapulmonares. A principal célula inflamatória envolvida é o neutrófilo, que devido ao aumento da liberação de proteases nas vias aéreas, as anti-proteases não dão conta de proteger as fibras elásticas do pulmão, e ocasionam o enfisema pulmonar, que é uma das manifestações clínicas da DPOC (MEIRELLES, 2009).

Um dos melhores medicamentos para o tratamento da DPOC em pacientes com a sintomatologia avançada é o Roflumilaste, nome comercial: Daxas. O principal efeito do medicamento é a inibição da PDE4, que eleva os níveis intracelulares da AMPc, que conseqüentemente inibe alguns dos mediadores inflamatórios (TNF α , IL-2, LTB $_4$, entre outros), que são de extrema importância na patogenia da DPOC. A inibição dessas citocinas causa um relaxamento da musculatura lisa e uma broncodilatação, trazendo benefícios para o tratamento da doença. A inibição da PDE4 também é capaz de inibir a desgranulação dos neutrófilos (HATZELMANN *et al.*, 2010).

Hatzelmann e cols (2010) realizaram uma série de estudos pré-clínicos “in vitro” e “in vivo” para entender melhor o modo de ação funcional de roflumilaste na DPOC. “In vitro”: demonstrou-se que o roflumilaste afeta as funções de vários tipos de células, incluindo neutrófilos, monócitos / macrófagos, células T CD4 + e CD8 +, células endoteliais, células epiteliais, células musculares lisas e fibroblastos e conseqüentemente tem-se redução das crises de tosse e função pulmonar melhorada. “In vivo”: Atenua os principais mecanismos de doenças relacionadas à DPOC, como a inflamação pulmonar induzida pela fumaça do tabaco, mau funcionamento mucociliar, remodelamento fibrótico e enfisematoso do pulmão, estresse oxidativo, remodelação vascular pulmonar e hipertensão pulmonar (HATZELMANN *et al.*, 2010).

Neutrófilos de indivíduos que fumam tem mais MPO dos que os não fumantes e os níveis de MPO são elevados no escarro de pacientes com DPOC, junto com 3-clorotirosina que é um produto da atividade da MPO. Portanto saber se um determinado medicamento é inibidor da MPO pode ser muito importante para o tratamento da doença.

A MPO é uma enzima presente principalmente nos grânulos de neutrófilos, mas está presente também nos monócitos e macrófagos. Na presença de peróxido de hidrogênio catalisa vários substratos com a formação de ácido hipocloroso, oxigênio singlete, radical hidroxil, cloraminas e espécies reativas de nitrogênio.

A fumaça do cigarro produz peróxido de hidrogênio e MPO presente em maior quantidade nos indivíduos fumantes pode usar este peróxido para formar ácido hipocloroso, que é um potente oxidante, causando lesão tecidual (BAGDAGE *et al.*, 1970; DELAMAIRE *et al.*, 1995 e 1997; GALLACHER *et al.*, 1995; MARHOFFER *et al.*, 1992; SATO *et al.*, 1997; WILSON *et al.*, 1986).

CONCLUSÃO

O Roflumilaste inibiu a quimiluminescência do luminol, e esta não foi dependente da concentração do medicamento, demonstrando atividade antioxidante. No presente trabalho, demonstramos que o Roflumilaste inibiu a quimiluminescência do luminol, ou pelo sequestro do ácido hipocloroso ou pela

inibição da MPO, mas somente com os nossos dados não conseguimos responder estas questões. A quimiluminescência dependente do luminol (QLDL), é um método sensível de estudo de alterações na produção de espécies reativas de oxigênio, mas é pouco específico no que se refere à espécie reativa que está oxidando o luminol (BAGDAGE *et al.*, 1970; DELAMAIRE *et al.*, 1995 e 1997; GALLACHER *et al.*, 1995; MARHOFFER *et al.*, 1992; SATO *et al.*, 1997; WILSON *et al.*, 1986).

Portanto as perguntas a serem respondidas e perspectivas futuras são:

- a produção das espécies reativas de oxigênio, envolvidas diretamente (HOCl) na oxidação do luminol estaria prejudicada? Nesse caso, o Roflumilaste estaria agindo sobre a mieloperoxidase?
- O Roflumilaste estaria funcionando como “scavengers” de HOCl?

Posteriormente a meta é avaliar os melhores mecanismos envolvidos na supressão da QLDL pelo Roflumilaste. Um dos testes a ser executado será o teste do TMB (tetrametilbenzidina), que é um teste bastante específico devido à propriedade única do HOCl de reagir com taurina formando taurina-cloramina. A alta concentração de taurina e a constante de reação entre este composto com o HOCl faz com que a taurina seja o principal alvo do HOCl formado pelo sistema enzimático do neutrófilo (FOLKES *et al.*, 1995). Nessas condições experimentais, a adição de qualquer substrato é capaz de afetar a produção de HOCl por três diferentes mecanismos: a) competindo com taurina pelo HOCl; b) reagindo com taurina-cloramina; c) competindo com cloreto pelo composto I da MPO. Outro teste será avaliar a atividade da enzima MPO também com TMB que é muito mais sensível (MARQUEZ; DUNFORD, 1998).

REFERÊNCIAS

- ALLEN, R. C. Haloperoxidase acid optimum chemiluminescence assay system. U. S. Patent 5, 556, 758; 1996. In: **Methods Enzymol.**, ALLEN, R. C.; DALE, D. C. and TAYLOR Jr., F. B. Blood phagocyte luminescence: gauging systemic immune activation, v. 305, p. 591-609, 2000.
- ALMEIDA A.P.B. Inflamação e doença pulmonar obstrutiva crônica. **Revista Port. Pneumol**, v. 3, p.57-78, 2015.
- AZZI, D.C., OLIVEIRA G.G., JANEGITZ. B.C., BONIFÁCIO V.G., FILHO O.F., JUNIOR L.H.M. Determinação de rutina em formulações farmacêuticas utilizando um sistema de análise por injeção em fluxo envolvendo multicomutação. **EcléticaQuímica Journal**, vol. 41, p. 32-42, 2016.
- BAGDADE, J. D.; ROOT R. K.; BULGER R. J. Host defense in diabetes mellitus. The feckless phagocyte during poor control and ketoacidosis. **Diabetes**, v. 19, p. 364, 1970.
- BAGATIN E., JARDIM J.R.B., STIRBULOV R. Doença pulmonar obstrutiva crônica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, vol.32, São Paulo, 2006.
- DA COSTA C.H., RUFINO R. Tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, vol.12, nº2, Rio de Janeiro, 2013.
- DA COSTA C.H., RUFINO R., LAPA J.R., SILVA. Células inflamatórias e seus mediadores na patogênese da DPOC. **Revista Assoc. Med. Bras.**, p. 347-54, 2009.
- DARIO S.P. DPOC - Uma revisão bibliográfica. **Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente**, p.11-17, 2016.

DELAMAIRE, M. *et al.* Impaired leucocyte functions in diabetic patients. **Diabetic Medicine**, v. 14, p. 29-34, 1997.

DELAMAIRE, M.; MAUGENDRE, D.; MORENO, M.; LE GOFF M. C.; ALLANNIC, H.; GENETET, B. Exploration des differentsetapas du fonctionnement des polynucléariesneutrophiles chez les paientsdia-bétiques. **J. Maladies Vasculaires**, v. 20, p. 107-112, 1995.

ESPORCATTE R., REY H.C.V., RANGEL F.O.D., ROCHA R.M., FILHO H.T.F.M., DOHMANN H.F.R., FILHO F.M.A. Valor Preditivo da Mieloperoxidase na Identificação de Pacientes de Alto Risco Admitidos por Dor Torácica Aguda. **Arq. Bras. Cardiol**, p.377-384, 2007.

FOLKES, L. K., CANDEIAS, L. P., WARDMAN, P. Kinetics and mechanisms of hypochlorous acid reactions. **ArchBiochemBiophys**, v. 323, 1995.

FURTADO R.D. Implicações anestésicas do tabagismo. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, vol. 52, 2002.

GALLACHER, S. J.; THOMSON, G.; FRASER, W. D.; FISHER, B. M.; GEMMELL, C. G.; MACCUISH, A. C. Neutrophil bactericidal function in diabetes mellitus: evidence for association with blood glucose control. **Diabetic Medicine**, v. 12, p. 916-20, 1995.

HATZELMANN A., MORCILLO E.J., LUNGARELLA G., ADNOT S., SANJAR S., BEUME R., SCHUDT C., TENOR H. The preclinical pharmacology of roflumilast – A selective, oral phosphodiesterase 4 inhibitor in development for chronic obstructive pulmonary disease. **PulmonaryPharmacology&Therapeutics**, v.23, p. 235-256, 2010.

JADIM J.R.,NASCIMENTO OLIVER A. Epidemiologia, Impacto e Tratamento da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) no Brasil. **Revista Racine**, p. 32-47, 2009.

JARDIM J.R., PINHEIRO B., OLIVEIRA J.A. Doença pulmonar obstrutiva crônica. **Revista Brasileira de Medicina**, p. 68-76, 2009.

JÚNIOR U.F.E., ELIHIIMAS H.C.S., LEMOS V.M., LEÃO M.A., SÁ M.P.B.O., FRANÇA E.E.T.F., LEMOS A., VALENTE L.M., FILHO B.M. Tabagismo como fator de risco para a doença renal crônica: revisão sistemática. **J. Bras. Nefrol**, v. 36, 2014.

KEBIR D.E., JÓZSEF L., PAN W., FILEP J.G. Myeloperoxidase Delays Neutrophil Apoptosis Through CD11b/CD18 Integrins and Prolongs Inflammation. **Circulation Research**, p. 352-359, 2018.

MARHOFFER, W.; STEIN, M.; MAESER, E.; FEDERLIN, K. Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes. **Diabetes Care**, v. 15, p. 256-60, 1992.

MARCHIORI R.C., SUSIN C.F., LAGO L.D., FELICE C.D., SILVA D.B., SEVERO D.M. Diagnóstico e tratamento da DPOC exacerbada na emergência. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, p. 214-223, 2010.

MARQUEZ, L. A; DUNFORD, H. B. Mechanism of the oxidation of 3, 5, 3', 5'- tetramethylbenzidine by myeloperoxidase determine by transient- and steady-state kinetics. **Biochemistry**, v. 36, p. 9349-9355, 1998.

MEIRELLES R.H.S. Tabagismo e DPOC – dependência e doença – fato consumado. **Pulmão RJ**, p. 13-19, 2009.

NUSSBAUM C., KLINKE A., ADAM M., BALDUS S., SPERANDIO M. Myeloperoxidase: A Leukocyte-Derived Protagonist of Inflammation and Cardiovascular Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, vol. 18, nº 6, 2013.

OLIVEIRA, P. C. Apresentações Clínicas da DPOC. **Pulmão RJ**, p. 15-18, 2013.

PIRES K.M.P., MELO A.C., LANZETTI M., CASQUILHO N.V., ZIN W.A., PORTO L.C., VALENÇA S.S. Ventilação mecânica com baixo volume corrente e estresse oxidativo em pulmões saudáveis de camundongos. **Jornal Brasileiro de Pneumonia**, vol. 38, 2012.

QUADROS A.U., DALPOSSO L.M., KARAM T. K., MAINARDES R.M., KHALIL N.M. Efeito da nicotina sobre fagócitos ativados. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, Maringá, v. 35, n.1, p.105-109, 2013.

RIBEIRO G.F. Abordagem ambulatorial do paciente com DPOC e comorbidades. **Gazeta Médica da Bahia**, p.52-58, 2008.

ROMAN R.M., WENDLAND A.E., POLANCYK C.A. Mieloperoxidase e Doença Arterial Coronariana: da Pesquisa à Prática Clínica. **Arq. BrasCardiol**, p. 12-19, 2008.

RUFINO R., COSTA C.H. Etiopatogenia da DPOC. **Pulmão RJ**, p. 9-14, 2013.

RUFINO R., COSTA C.H., SOUZA H.S.P., MADI K., SILVA J.R.L. Perfil celular do escarro induzido e sangue periférico na doença pulmonar obstrutiva crônica. **Jornal Brasileiro de Pneumonia**, v. 33, 2007.

RUFINO R., SILVA J.R.L. Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica. **Jornal Brasileiro de Pneumonia**, v.32, p. 1-10, São Paulo, 2006.

RUFINO R., MADI K., SOUZA H.S.P., COSTA C.H., SAITO E.H., SILVA J.R.L. Avaliação quantitativa das fibras elásticas na doença pulmonar obstrutiva crônica. **Jornal Brasileiro de Pneumonia**, v. 33, 2007.

SANTOS R.M.S., SANTOS M.F. Quimiluminescência e Bioluminescência. **Química Nova**, p. 200-209, 1994.

SATO, N.; SHIMIZU, H.; SHIMOMURA, Y.; SUWA, K.; MORI, M.; KOBAYASHI, I. Mechanism of inhibitory action of ketone bodies on the production of reactive oxygen intermediates (ROIS) by polymorphonuclear leukocytes. **Diabetes Care**, v. 20, p. 995-8, 1997.

ZONZIN G.A., CLEMENTE R.S.G., SILVEIRA J.C.D.F., COSTA A.F. O que é importante para o diagnóstico da DPOC?. **Pulmão RJ**, p. 5-14, 2017.

WILSON, R. M., REEVES, W. G. Neutrophil phagocytosis and killing in insulin-dependent diabetes. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 63, p. 478-84, 1986.