



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO MULTIDISCIPLINAR UFRJ – MACAÉ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



LARYSSA CASTRO CORRÊA LAGRECA SALEMA

**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE HIDRAZIDAS AROMÁTICAS COMO
INIBIDORES DE MIELOPEROXIDASE**

Macaé
2022

LARYSSA CASTRO CORRÊA LAGRECA SALEMA

**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE HIDRAZIDAS AROMÁTICAS COMO
INIBIDORES DE MIELOPEROXIDASE**

Trabalho de conclusão de curso (TCC) apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé, como requisito para obtenção do título de farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Louback da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Evanoel Crizanto de Lima

Macaé
2022

CIP - Catalogação na Publicação

S163a Salema , Laryssa Castro Corrêa Lagreca
Avaliação Farmacológica de Hidrazidas Aromáticas
como Inibidores de Mieloperoxidase / Laryssa
Castro Corrêa Lagreca Salema . -- Rio de Janeiro,
2022.
51 f.

Orientador: Leandro Louback da Silva .
Coorientador: Evanoel Crizanto de Lima .
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Ciências Farmacêuticas, Bacharel em Farmácia,
2022.

1. estresse oxidativo . 2. antioxidante . 3.
anti-inflamatório . 4. neutrófilo . I. Silva ,
Leandro Louback da, orient. II. Lima , Evanoel
Crizanto de, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

LARYSSA CASTRO CORRÊA LAGRECA SALEMA

**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE HIDRAZIDAS AROMÁTICAS COMO
INIBIDORES DE MIELOPEROXIDASE**

Trabalho de conclusão de curso (TCC) defendido e aprovado como requisito para obtenção do título de farmacêutico, no curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro *campus* Macaé.

Macaé, 15 de junho de 2022

Comissão avaliadora:

Prof. Dr. Leandro Louback da Silva
UFRJ/Campus Macaé
<http://lattes.cnpq.br/3640859565231717>

Profa. Dra. Juliana M. Raimundo
UFRJ/Campus Macaé
<http://lattes.cnpq.br/5226925321575185>

Prof. Dr. Leonardo Araújo de Abreu
UFRJ/Básico da saúde
<http://lattes.cnpq.br/1182000138097293>

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me sustentado e amparado durante toda a minha trajetória até aqui, pela oportunidade de realizar esse sonho. Por ter me dado força e coragem para enfrentar os obstáculos e dificuldades dessa caminhada.

Aos meus avós, Selma e Gilson, que sempre fizeram o possível e o impossível para que eu chegasse até aqui, dedico este trabalho a eles.

À minha avó, Maria José, que mesmo de longe me ajudou e mandou várias mensagens de incentivo e apoio.

Ao meu pai, Ricardo, por ser minha maior inspiração e referência. Sempre prezou pela minha educação e conhecimento, para que eu pudesse ser uma pessoa melhor. Pelos conselhos sábios, incentivo e força.

À minha mãe e minha irmã, Renata e Gabriella, que estiveram ao meu lado nessa jornada, pelo apoio e pela paciência nos meus momentos de estresse.

À minha tia e madrinha, Vanessa, por ter me auxiliado nos trabalhos e tarefas da faculdade com seus conhecimentos.

Ao meu namorado, Edson, por sempre me apoiar e me motivar a comemorar as conquistas. Por ouvir com muita paciência e carinho as minhas lamentações, sempre me lembrando que sou capaz.

Aos meus colegas de turma, pelo companheirismo e pelos momentos de descontração que tornaram essa caminhada mais leve.

Ao meu orientador, Leandro Louback, por todo conhecimento e ensinamentos transmitidos com muita dedicação, paciência e competência

À UFRJ e todo corpo docente, que me acolheram por todo esse tempo, sendo fundamentais para minha formação.

A vocês, que tiveram ao meu lado durante todo esse tempo e contribuíram para realização deste sonho, deixo aqui o meu reconhecimento e gratidão.

RESUMO

Introdução: A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima abundante em neutrófilos onde constitui um componente essencial da defesa inata do organismo, tendo a produção de HOCl como arsenal no ataque a organismos invasores. Por outro lado, mesmo sem a presença de patógenos, no caso de inflamação crônica, síndromes inflamatórias e/ou estresse oxidativo, pode ocorrer a liberação da MPO para fora dos fagócitos, gerando HOCl em fluidos extracelulares, resultando em danos teciduais e, conseqüentemente, participando da fisiopatologia de uma série de doenças, como por exemplo a aterosclerose. Sendo assim, a MPO se apresenta como importante alvo terapêutico no desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios. Neste sentido, a atividade inibitória de hidrazidas e hidrazonas tem sido descrita, atuando como inibidores reversíveis e irreversíveis da MPO. **Objetivo:** O trabalho visa avaliar o perfil farmacológico de sete hidrazidas aromáticas sobre a atividade da MPO, verificando o potencial anti-inflamatório desses derivados. **Métodos:** A atividade da MPO foi verificada em seu ciclo de cloração, ou seja, através da produção de HOCl, empregando o método da cloro-aurina. A atividade sequestrante de cloro-aurina também foi medida utilizando o mesmo meio reacional da atividade de cloração, substituindo o peróxido pela cloro-aurina. A atividade oxidante frente as espécies radicalares foi avaliada através do método do DPPH. O tratamento estatístico foi realizado no *software GraphPad Prism* e todas as CI_{50} estão expressas em μM (Média \pm erro padrão da média). **Resultados:** Todas os 7 derivados avaliados, INL12, INL16, INL18, INL22, LOCH01, LOCH25 e NIL01, foram capazes de inibir a produção de HOCl pela MPO. Sendo INL18, LOCH01 e LOCH25 os mais potentes ($0,11 \pm 0,02$; $0,18 \pm 0,04$ e $0,23 \pm 0,05$, respectivamente), os derivados INL16, INL 22 e NIL01 apresentaram uma potência intermediária ($1,15 \pm 0,12$; $0,57 \pm 0,18$ e $0,71 \pm 0,17$, respectivamente), enquanto INL12 foi o menos potente ($1,81 \pm 0,42$). Quanto à capacidade sequestrante de cloro aurina, o derivado NIL01 não apresentou atividade nas concentrações testadas, o derivado INL12 apresentou baixa potência ($43,75 \pm 3,91$), enquanto os derivados INL16, INL18, INL22, LOCH01 e LOCH25 se mostraram mais potentes, com valores de CI_{50} similares entre si ($14,48 \pm 1,17$; $16,81 \pm 1,1,29$; $15,24 \pm 2,87$; $12,92 \pm 1,81$; $16,87 \pm 0,7$, respectivamente). Em relação à atividade sequestrante de espécies radicalares (DPPH), os derivados NIL01 e INL12 não apresentaram atividade significativa nas concentrações testadas. Dentre os derivados ativos, o INL16 foi o menos potente ($60,8 \pm 2,8$), quando comparado aos derivados INL18, INL22, LOCH1 e LOCH25 ($38,9 \pm 3,2$; $42,6 \pm 4,6$; $40,3 \pm 4,4$ e $43,3 \pm 3,4$, respectivamente). **Discussão:** Apesar da atividade sequestrante de cloro aurina apresentada pela maioria dos derivados, isso não parece interferir na inibição da MPO, uma vez que a potência da atividade sequestrante foi no mínimo 12 vezes maior que a potência da atividade inibitória (INL16). O derivado NIL01 não apresentou atividade antioxidante, nem frente à cloro-aurina nem frente ao DPPH, enquanto o derivado INL12 se mostrou ativo apenas frente a cloro-aurina. Os demais derivados foram capazes de interagir com o DPPH e a cloro-aurina, de forma semelhante. **Conclusão:** Os estudos permitiram a identificação de potentes inibidores da MPO, INL18, LOCH01 e LOCH25, com CI_{50} a entre 100 e 300 nM. Esses resultados demonstram o alto potencial desses derivados atuarem como anti-inflamatórios e confirmam o grupamento hidrazida como importante farmacofórico para a inibição da MPO.

Palavras-chave: estresse oxidativo; antioxidante; anti-inflamatório; neutrófilo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura da mieloperoxidase madura.....	12
Figura 2- Ciclos catalíticos da MPO.....	14
Figura 3- Fagocitose e atividade microbicida de neutrófilo.....	15
Figura 4- O papel da MPO na aterosclerose.....	19
Figura 5- Estrutura química da melatonina.....	21
Figura 6- Estrutura química do 3-metilindol, 5-fluorotriptamina e 5-clorotriptamina, respectivamente.....	21
Figura 7- Estrutura química da isoniazida e do ABAH.....	22
Figura 8- Estrutura química da TX2.....	22
Figura 9- Estrutura química do ácido salicilhidroxâmico.....	23
Figura 10- Estrutura química do 7-(benziloxi)-3H-[1,2,3] triazolo] 4,5-d] pirimidina-5- amina.....	24
Figura 11- Estrutura química dos derivados hidrazídicos aromáticos.....	27
Figura 12- Curvas concentração-resposta dos derivados hidrazídicos aromáticos sobre a atividade da MPO.....	33
Figura 13- Comparação entre as estruturas do derivado não substituído e bromo substituídos.....	35
Figura 14- Comparação entre as estruturas do derivado não substituído e derivados com flúor e metila como substituintes.....	35
Figura 15- Comparação entre as estruturas do derivado não substituído e o derivado ciclizado.....	36
Figura 16- Curvas concentração-resposta dos derivados hidrazídicos aromáticos sobre a atividade sequestrante de Cl-Tau.....	37
Figura 17- Curvas concentração-resposta dos derivados hidrazídicos aromáticos sobre a atividade sequestrante do radical DPPH.....	41
Figura 18- Possíveis correlações entre as atividades dos derivados hidrazídicos aromáticos.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Razão entre as potências de sequestro de Cl-aurina e inibição do ciclo cloração da MPO.....	39
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Potência inibitória dos derivados hidrazídicos aromáticos sobre a atividade clorinante da MPO.....	34
Gráfico 2- Potência sequestrante dos derivados hidrazídicos aromáticos sobre o sequestro de Cl-aurina.....	38
Gráfico 3- Potência sequestrante dos derivados hidrazídicos aromáticos sobre o DPPH.....	42

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

MPO	Mieloperoxidase
TPO	Tireoperoxidase
LPO	Lactoperoxidase
EPO	Eosinófilo peroxidase
GPX	Glutathiona peroxidase
VPO	Vascular peroxidase
EROS	Espécies reativas de oxigênio
DCV	Doenças cardiovasculares
NOS	Óxido nítrico sintase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
HDL	Lipoproteína de alta densidade
CI ₅₀	Concentração inibitória média
SHA	Ácido salicilhidroxâmico
ABAH	4-hidrazida do ácido benzoico
TMB	3,3', 5,5'-tetrametilbenzina
pH	Potencial hidrogeniônico
Cl-tau	Cloro-aurina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	1,1-Difenil-2-picrilhidrazil

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Mieloperoxidase: origem e estrutura.....	11
1.2 Ciclo catalítico da MPO.....	12
1.3 Produção e função fisiológica da MPO.....	14
1.4 O papel da MPO nas doenças cardiovasculares.....	16
1.5 Inibidores da MPO e mecanismo de inibição.....	19
1.5.1 Substratos fracos do ciclo peroxidação.....	20
1.5.2 Inibidores irreversíveis.....	21
1.5.3 Inibidores reversíveis.....	23
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivos gerais.....	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Obtenção dos derivados hidrazídicos aromáticos.....	27
4.2 Obtenção da MPO.....	28
4.3 Avaliação farmacológica dos derivados hidrazídicos aromáticos sobre o ciclo cloração.....	28
4.4 Avaliação da capacidade sequestrante de Cl-Tau pelos derivados hidrazídicos aromáticos.....	29
4.5 Avaliação da capacidade sequestrante do radical DPPH pelos derivados hidrazídicos aromáticos.....	30
4.6 Análise estatística.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 Efeitos dos derivados hidrazídicos aromáticos sobre o ciclo cloração da MPO.....	32

5.2 Efeitos dos derivados hidrazídicos aromáticos sobre a atividade sequestrante de Cl-Tau.....	36
5.3 Efeitos dos derivados hidrazídicos aromáticos sobre a atividade sequestrante do radical DPPH.....	40
6. CONCLUSÃO.....	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mieloperoxidase: origem e estrutura

Historicamente, a mieloperoxidase (MPO) foi isolada de pus canino e fluido purulento de pacientes que apresentavam empiema tuberculoso, sendo inicialmente denominada de verdoperoxidase, devido a sua intensa coloração verde, resultante da presença do ferro em sua estrutura, além disso, foi observado que a mesma apresentava atividade peroxidase (AGNER, 1941). A renomeação da enzima ocorreu após observações de que a sua expressão advinha de uma série mieloide de células hematopoiéticas, sendo localizada em grânulos azurófilos, resultando na substituição do prefixo “verde” pelo termo “mielo” (KOEFFLER; RANYARDPERTCHECK, 1985; YAMADA; KURAHASHI, 1984).

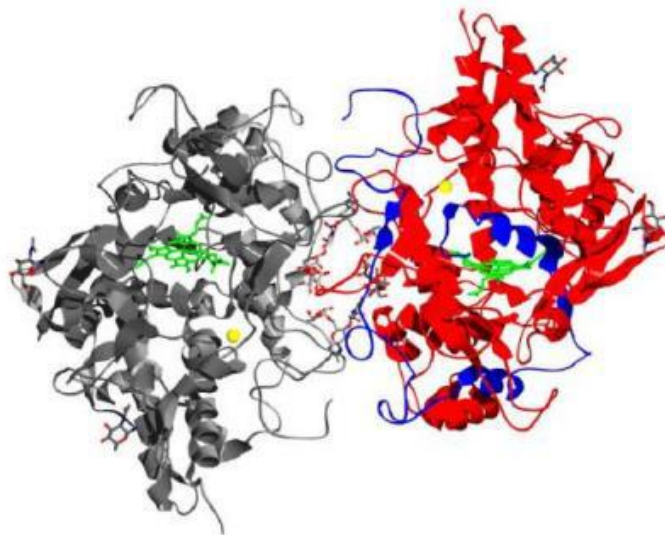
A MPO pertence à superfamília das peroxidases, que inclui tireoperoxidase (TPO), lactoperoxidase (LPO), eosinófilo peroxidase (EPO), glutathiona peroxidase (GPX) e mais recentemente descoberta, a vascular peroxidase (VPO), na qual cada uma desempenha um papel importante na catálise de reações fisiológicas, sendo relacionadas a eventos como produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), imunidade inata, biossíntese hormonal e patogênese de determinadas doenças, através da utilização de peróxidos, especialmente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), para catalisar reações de oxidação de diversos compostos orgânicos e inorgânicos (KHAN et al., 2014; KLEBANOFF, 2005; SHIVAKUMAR; BG; MR, 2017, MA, ZHANG & PENG, 2013). As peroxidases compartilham características estruturais, no entanto, são expressas de maneira diferente, tanto em relação à localização intracelular quanto no tecido (NAUSEEF, 2018).

A MPO madura é uma proteína dimérica (Figura 1), com uma massa total de 146 kDa, consistindo de dois monômeros de 73 kDa ligados através de uma ponte de cistina em Cys153. Cada monômero, que é idêntico e funcionalmente independente, consiste em dois componentes: uma cadeia pesada composta de 467 aminoácidos e pesando 58,5 kDa e uma cadeia leve composta de 106 aminoácidos e pesando 14,5 kDa. O grupo heme fica localizado no interior de uma fenda profunda, dificultando o acesso da maioria dos substratos, apenas H_2O_2 e pequenos ânions apresentam acesso facilitado ao átomo de ferro. Outros substratos que são oxidados pela enzima se ligam em uma bolsa hidrofóbica na entrada da cavidade distal do heme

(BOLSCHER; WEVER, 1984; FIEDLER; DAVEY; FENNA, 2000; FURTMÜLLER et al., 2006; ZENG; FENNA, 1992)

Ainda sobre a estrutura, é importante destacar que a superfície da MPO contém resíduos de lisina e arginina, tornando a molécula altamente catiônica, o que permite a interação eletrostática com diversos compostos ou células que apresentam característica de superfície (ou domínio) aniônica, incluindo células bacterianas, células endoteliais, componentes da matriz extracelular, particularmente glicosaminoglicanos polianiônicos, apolipoproteínas B-100, albumina e α 1-antitripsina (NDREPEPA, 2019).

Figura 1 – Estrutura da mieloperoxidase madura.



Cada subunidade é composta por uma cadeia leve (azul), uma pesada (vermelha) e um grupamento heme (verde) (FURTMÜLLER et al., 2006).

1.2 Ciclo catalítico da MPO

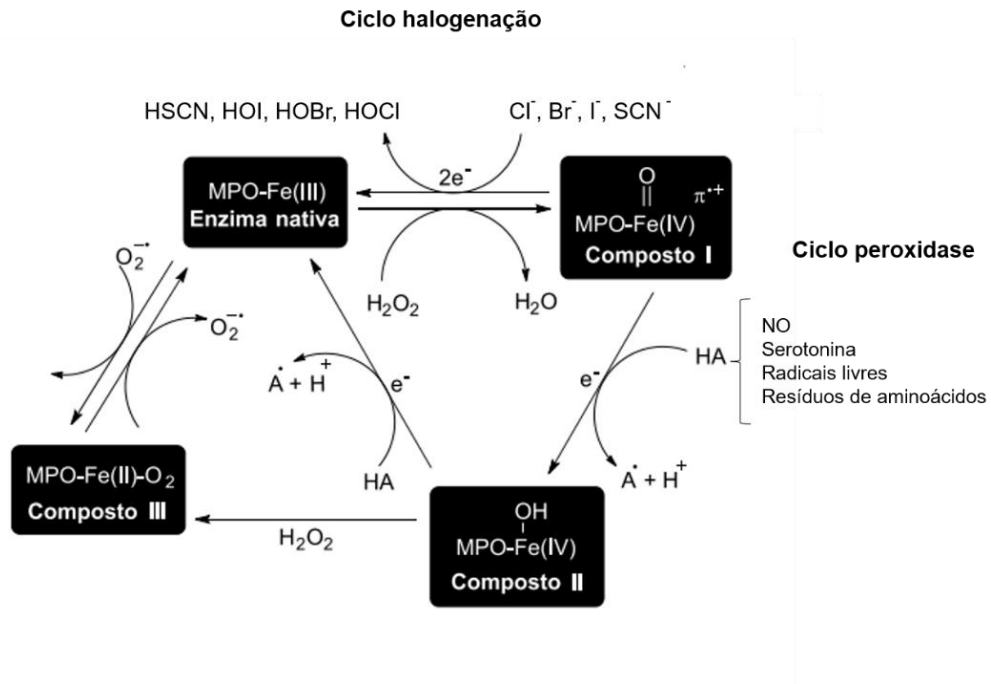
A MPO catalisa reações de oxidação de um e de dois elétrons, através dos ciclos catalíticos, peroxidase e halogenação, respectivamente (Figura 2). Tendo em vista a maior presença de íons cloreto no ambiente fisiológico, estando em concentrações que variam de 100 a 140 mM, enquanto que íons brometo variam de 20 a 100 μ M, íons iodeto de 0,1 a 0,6 μ M e íons tiocianato de 20 a 120 μ M, podemos considerar que o HOCl é o principal produto da MPO. Esses ciclos são compostos por reações sucessivas de oxidação e redução, gerando seus produtos e retornando a enzima ao

seu estado nativo a cada ciclo (FURTMÜLLER; BURNER; OBINGER, 1998; LAZAREVIĆ-PASTI; LESKOVAC; VASIĆ, 2015).

O ciclo halogenação é caracterizado pela formação do Composto I ($^{+}Por-Fe[IV]=O$), sendo gerado a partir da oxidação do íon férrico Fe^{3+} do grupamento heme da MPO nativa, quando na presença de H_2O_2 . Em seguida, o Composto I reage com o haleto disponível, resultando na produção do ácido correspondente. No caso da reação com Cl^- , é gerado o HOCl, ocorrendo assim, o ciclo cloração. O composto I é uma forma instável da MPO que oxida o haleto através de um processo de transferência de dois elétrons (DAVIES, 2011; FURTMÜLLER; BURNER; OBINGER, 1998).

Alternativamente, o Composto I pode realizar reações de oxidação pela transferência de apenas um elétron. Sendo assim, reduzido por doadores de um elétron para gerar o Composto II ($Por-Fe^{4+}-OH$), iniciando assim, o ciclo peroxidase, caracterizado pela utilização de substratos orgânicos e inorgânicos, como óxido nítrico, serotonina, hormônios esteroides, ácido ascórbico, urato, resíduos de aminoácidos, como tirosina e triptofano. Caso o Composto II receba a transferência de mais um elétron, ocorre a retomada da sua conformação nativa ($Por-Fe^{3+}$) (DAVIES, 2011; FURTMÜLLER et al., 2003).

Ainda é possível ocorrer a geração do Composto III ($Por-Fe^{2+}-O_2$ ou $Por-Fe^{3+}-O_2$) proveniente da reação da MPO nativa com o ânion superóxido ou ainda pela reação do Composto II com o H_2O_2 . Foi observado que o Composto III, tal como o Composto II, não é capaz oxidar haletos e gerar ácidos correspondentes, ou seja, não realiza o ciclo halogenação (HOOGLAND et al., 1987; PAUMANN-PAGE et al., 2013).

Figura 2 - Ciclos catalíticos da MPO.

A conversão mútua entre seus estados de oxidação, ciclos de halogenação e peroxidação, com seus substratos enzimáticos e produtos gerados. Adaptado de (PEREIRA DE JESUS et al., 2022).

1.3 Produção e função fisiológica da MPO

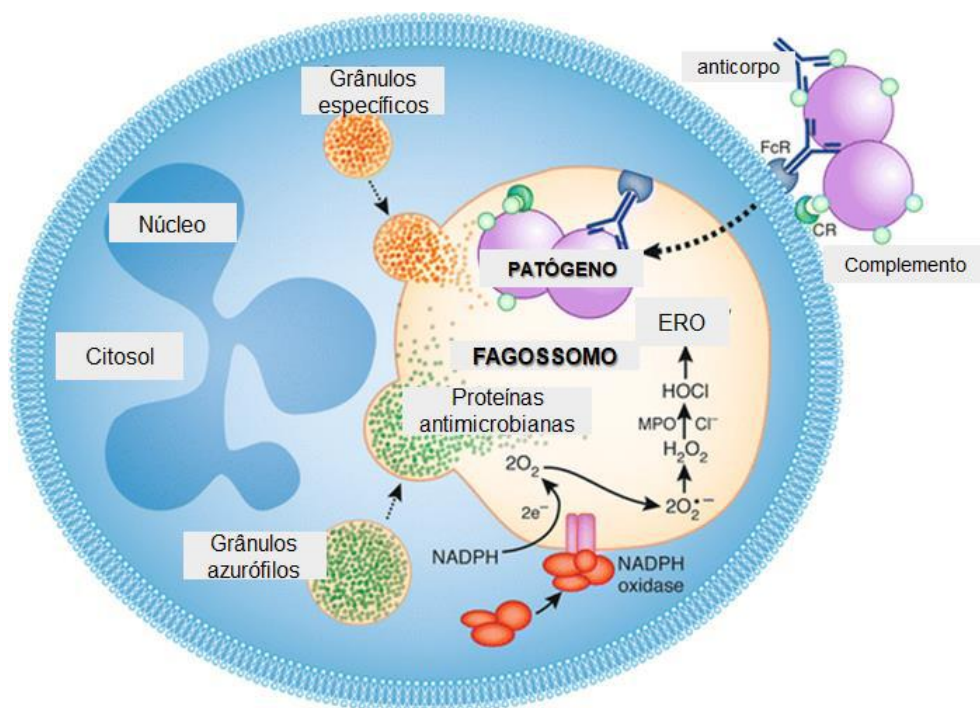
A mieloperoxidase é produzida nas células mieloides, que incluem todos os leucócitos, com exceção do linfócito. De fato, MPO é responsável por até 5% da massa seca total de leucócitos humanos. Essas células apresentam dois tipos de grânulos, azurófilos e específicos, que têm origem e natureza distintas. Os grânulos azurófilos grandes e densos caracterizam um tipo especial de lisossomo primário contendo peroxidases e enzimas lisossomais, sendo produzidos durante o estágio promielócito, e surgem da face concava do aparelho de Golgi. Diferentemente dos grânulos específicos que não apresentam peroxidases como produto de secreção, são produzidos mais tarde no estágio de mielócitos, e surgem da face oposta do aparelho de Golgi (BAINTON; ULLYOT; FARQUHAR, 1971; SCHULTZ; KAMINKER, 1962). Sendo assim, a forte presença da MPO em células fagocíticas evidencia a sua importância na imunidade inata (MALLE et al., 2007).

Durante uma infecção e/ou dano tecidual inicia-se um processo inflamatório, caracterizado pelo recrutamento de neutrófilos devido às alterações na superfície do endotélio resultantes da estimulação por mediadores inflamatórios, que são liberados

por células residentes localizadas no sítio inflamatório à medida que entram em contato com o patógeno. Este processo envolve uma complexa interação entre o neutrófilo e o endotélio vascular adjacente, onde ocorre uma sequência de eventos como rolamento, adesão e transmigração até que o neutrófilo consiga alcançar o local da inflamação (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

A atividade microbicida do neutrófilo se dá através da ação da MPO e de outros sistemas antimicrobianos armazenados em grânulos citoplasmáticos, que por sua vez, se fundem aos fagossomos contendo os microrganismos fagocitados. A ativação dessas células gera a montagem de um complexo enzimático NADPH oxidase (NOX) na membrana plasmática e uma consequente "explosão respiratória", gerando $O_2^{\cdot-}$ a partir de O_2 . Este radical sofre rápida dismutação espontânea ou catalisada pela superóxido dismutase (SOD), gerando H_2O_2 (DAVIES, 2011). Na sequência, a MPO utiliza H_2O_2 e íon Cl^- , para gerar $HOCl$, um potente microbicida (KLEBANOFF et al., 2013; LAZAREVIĆ-PASTI; LESKOVAC; VASIĆ, 2015) (Figura 3).

Figura 3 - Fagocitose e atividade microbicida de neutrófilo.



Após a fagocitose, ocorre a destruição do patógeno através da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e liberação do conteúdo dos grânulos dentro do fagolisossomo. Adaptado de (KENNEDY; DELEO, 2009).

O significado biológico da MPO, dentro da imunidade inata, é evidenciado a partir de estudos que relacionam indivíduos com deficiência parcial ou completa de MPO a uma maior suscetibilidade destes a infecções crônicas. A deficiência primária de MPO é o defeito fagocitário mais comum, com uma frequência de 1:4000 (KOETH; HASELDEN; TANG, 2013). Ainda, pacientes com deficiência completa de MPO, apresentaram uma incidência aumentada de tumores sólidos ou hematológicos (KANG et al., 2011).

Sabe-se que a MPO apresenta pouco efeito microbicida direto, dependendo assim dos seus produtos gerados a partir do ciclo halogenação, como ácido hipocloroso (HOCl), ácido hipobromoso (HOBr), hipiodoso ácido (HOI) e ácido hipotiociano (HOSCN). Por outro lado, mecanismos microbicidas independentes de MPO podem compensar a sua ausência em indivíduos deficientes, apesar de apresentarem uma atividade microbicida mais lenta que o normal (UZEL; HOLLAND, 2013).

Embora a MPO apresente funções benéficas na vigilância imunológica e nos mecanismos de defesa do hospedeiro, os oxidantes derivados da MPO também têm a capacidade de danificar os tecidos do hospedeiro. Sob condições patológicas, a ativação persistente do sistema MPO-H₂O₂ de fagócitos ativados pode afetar negativamente os tecidos, principalmente devido a capacidade dos seus produtos oxidantes de iniciarem reações de modificação direcionadas a lipídios, DNA e lipoproteínas, incluindo cloração de uracila, de tirosina; halogenação de aminas; produtos radiculares; peroxidação lipídica (ABU-SOUD; HAZEN, 2000; KOETH; HASELDEN; TANG, 2013; MALLE et al., 2007).

1.4 O papel da MPO nas doenças cardiovasculares

Mesmo sem a presença de patógenos, no caso de inflamação crônica, síndromes inflamatórias e/ou estresse oxidativo, haverá a ativação e migração do neutrófilo para o sítio inflamatório. Uma vez que o neutrófilo é ativado, por uma variedade de estímulos, a MPO pode ser liberada para fora dos fagócitos, gerando HOCl em fluidos extracelulares, resultando em danos teciduais e, conseqüentemente, participando da fisiopatologia de uma série de doenças de caráter inflamatório (HAWKINS; DAVIES, 2021; VAN DER VEEN; DE WINTHER; HEERINGA, 2009)

Vários estudos sugerem uma associação entre MPO e doenças cardiovasculares (DCV), incluindo doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca congestiva, hipertensão arterial, acidente vascular cerebral, arritmia cardíaca e trombose venosa. A sequência de eventos que acarretam as DCV é disfunção endotelial, formação e ruptura da placa aterosclerótica, na qual a inflamação tem sido associada aos estágios de evolução das placas ateroscleróticas. Além disso, o estresse oxidativo é considerado um fenômeno chave no desenvolvimento de DCV. Níveis elevados de MPO estão relacionados a um prognóstico ruim, incluindo aumento do risco de mortalidade geral e relacionada as DCV (NDREPEPA, 2019; ROSS, 1999; STOCKER; KEANEY, 2004).

A aterosclerose é caracterizada como uma doença crônica, multifatorial e inflamatória, a qual envolve uma disfunção endotelial vascular, o estabelecimento de alterações oxidativas e inflamatórias e a modificação de lipoproteínas, sendo responsável por promover um grupo de doenças cardiovasculares (SOUBHYE et al., 2016). O marco inicial da aterosclerose é a disfunção endotelial, sendo um fator importante para a progressão da doença. A disfunção endotelial é caracterizada pela diminuição da produção ou biodisponibilidade de NO, resultando numa perturbação da homeostase vascular, podendo aumentar a vasoconstrição (CHENG et al., 2019).

A diminuição dos níveis de NO está estreitamente relacionada ao aumento dos níveis de espécies oxidantes. Além da vasoconstrição, esse processo pode também aumentar o recrutamento de monócitos, a expressão de moléculas de adesão de superfície, e a produção de fatores de crescimento que promovem a proliferação e migração das células do músculo liso vascular. Sendo assim, essas alterações contribuem para a formação da placa aterosclerótica (GLASS; WITZTUM, 2001).

A MPO tem participação na disfunção endotelial e, conseqüentemente, na aterosclerose. Esta enzima parece estar envolvida em todo o processo de aterogênese, desde a lesão inicial até a ruptura da placa (Figura 4). Foi observado que os níveis de MPO circulante correlacionam-se fortemente com o risco de disfunção endotelial em humanos (VITA et al., 2004). Além disso, a enzima ativa está presente nas células endoteliais de placas ateroscleróticas (DAUGHERTY et al., 1994). Juntos, esses dados evidenciam uma potencial ligação entre disfunção endotelial mediada por MPO e aterosclerose. Foi visto que a deficiência de MPO preserva a função vasomotora (RUDOLPH et al., 2012). Indivíduos que apresentam

polimorfismo genético na região promotora da MPO resultando na expressão diminuída desta enzima parecem ser cardioprotetidos (HOY et al., 2001).

A ativação dos neutrófilos durante o processo inflamatório resulta na liberação de MPO, que pode se ligar à célula endotelial, sendo rapidamente internalizada para o espaço subdotelial. Este posicionamento anatômico coloca estrategicamente a enzima para interferir no relaxamento arterial, conseqüentemente diminuindo a biodisponibilidade de NO, visto que o mesmo apresenta uma alta afinidade como substrato endógeno da enzima. Além disso, os oxidantes formados pela MPO são capazes de inibir a atividade da óxido nítrico sintase (NOS), podendo ocorrer a cloração da arginina após a reação com HOCl, reduzindo sua disponibilidade como substrato para NOS, o que impede a produção de NO (ABU-SOUD; HAZEN, 2000; EISERICH et al., 2002).

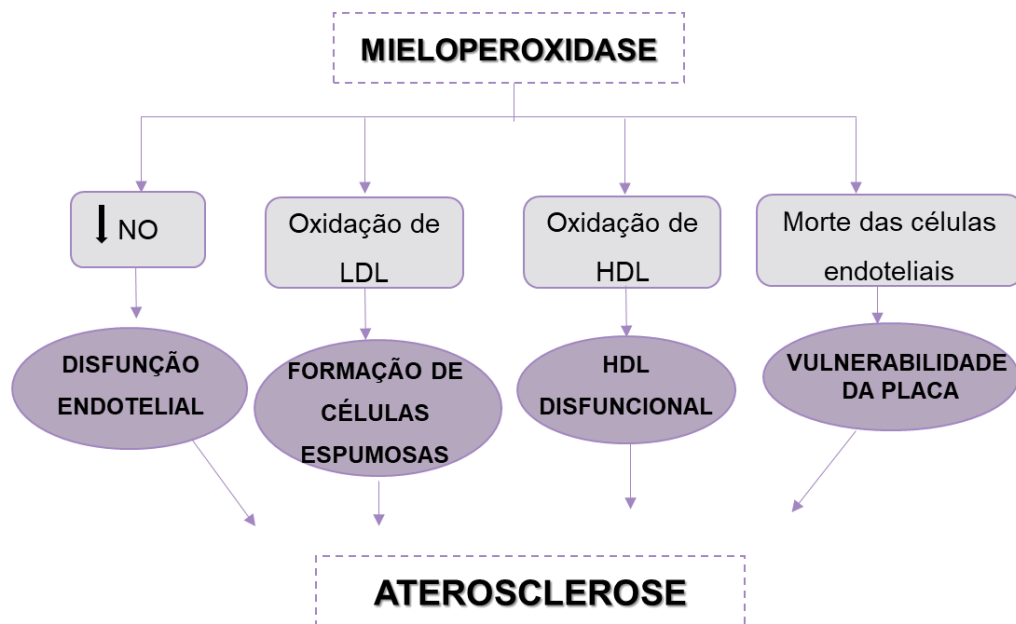
Outro mecanismo que evidencia o envolvimento da MPO na aterosclerose é a sua capacidade de oxidação de proteínas e lipídios de LDL e HDL. A LDL que sofreu modificação desempenha um papel crucial na promoção dos processos aterogênicos, uma vez que a mesma é reconhecida por receptores *scavenger* da membrana plasmática de macrófagos, ocorrendo a internalização e degradação dessas lipoproteínas modificadas, resultando na formação de células espumosas enriquecidas com colesterol. Além disso, a LDL oxidada pela MPO estimula produção de interleucina-8 pelas células endoteliais, que por sua vez, promoverá a ativação de monócitos. Por outro lado, a oxidação da HDL impossibilita a remoção do excesso de colesterol das lesões ateroscleróticas e inibe a NOS, por alterar sua localização na membrana plasmática (DELPORTE et al., 2013; STEINBERG et al., 1989).

A presença de clorotirosina é um marcador específico para a oxidação de MPO, encontra-se enriquecida em espécies lipídicas em lesões. Além disso, outros produtos de oxidação que são gerados pela MPO, através de outras vias, também são encontrados na placa de ateroma, como nitrotirosina, formado por uma modificação pós-traducional gerada por espécies reativas de nitrogênio e ditirosina, uma reticulação oxidativa formada por vias mediadas por radicais tiosil (NICHOLLS; HAZEN, 2005).

Além da oxidação de LDL e HDL e disfunção das células endoteliais, a MPO promove o desenvolvimento de placa vulnerável. A ruptura da capa fibrosa que

reveste a superfície da placa aterosclerótica permite a exposição de materiais trombogênicos à circulação, resultando na formação de trombos no lúmen. Acredita-se que a apoptose de células endoteliais provocada pelo HOCl, produzido pela MPO no espaço subendotelial seja uma causa crítica do desenvolvimento de placa vulnerável, tornando-as mais suscetíveis a quebra, o que resulta em isquemia. De fato, existe a associação da MPO à ativação da cascata de proteases e fenômenos pró-apoptóticos e pró-trombóticos ligados à instabilidade da placa (HAZEN, 2004).

Figura 4- O papel da MPO na aterosclerose.



A MPO está envolvida em vários processos fisiopatológicos da aterosclerose: ao diminuir a biodisponibilidade do NO, induz a disfunção endotelial; a geração de espécies reativas de nitrogênio converte o LDL em forma modificada/oxidada facilitando a formação de células espumosas; a conversão de HDL fisiologicamente funcional em HDL disfuncional com diminuição do efluxo de colesterol anti-aterosclerótico e propriedades anti-inflamatórias; ao aumentar a morte e descolamento das células endoteliais e a expressão do fator tecidual, participa do desenvolvimento de placas vulneráveis. Adaptado de (KAMANNA; GANJI; KASHYAP, 2013).

1.5 Inibidores da MPO e mecanismo de inibição

Diante da relação entre a MPO e o desenvolvimento de síndromes inflamatórias crônicas fazem da MPO um importante alvo para busca de novos fármacos anti-inflamatórios. No entanto, até o momento não existe no mercado farmacêutico um inibidor aprovado para uso clínico. É importante destacar que a enzima localizada no fagossomo dentro do neutrófilo desempenha um papel significativo no sistema imunológico, sendo a MPO extracelular relacionada aos efeitos nocivos nos tecidos do hospedeiro.

Dentre os inibidores já conhecidos, poucos são terapeuticamente adequados e visam especificamente a MPO, dado problemas de toxidez e necessidade de concentrações elevadas para um efeito inibitório significativo. Sendo assim, vários grupos de pesquisa têm se empenhado a encontrar novos inibidores de MPO que apresentem eficácia clínica e segurança adequada (FORBES; KETTLE, 2018; GALIJASEVIC, 2019).

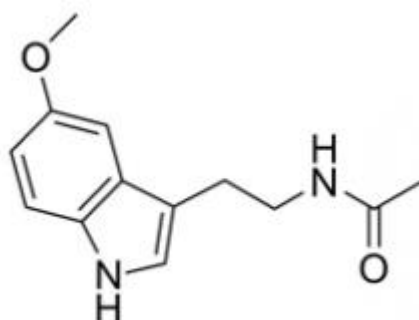
Os inibidores da MPO descritos na literatura nos últimos tempos, podem ser divididos de acordo com seu mecanismo de inibição da enzima em três classes principais: os inibidores que promovem o acúmulo do Composto II, os quais conseguem reagir rapidamente com o Composto I e lentamente com o Composto II, sendo substratos fracos do ciclo peroxidação; os inibidores irreversíveis, que são oxidados pela MPO, promovendo sua inativação por modificação estrutural e os inibidores reversíveis (PEREIRA DE JESUS et al., 2022).

1.5.1 Substratos fracos do ciclo de peroxidação

A inibição da MPO através de substratos fracos do ciclo peroxidação, que gera o acúmulo de Composto II, aparentemente não é capaz de expressar um efeito terapêutico proveitoso, dado a existência de melhores substratos naturais de peroxidação em condições fisiológicas, como ascorbato e urato, resultando na rápida conversão do Composto II em enzima nativa. Sendo assim, é necessário que a substância em estudo forme um complexo estável com o Composto II, a fim de evitar a sua conversão à enzima nativa (LAZAREVIĆ-PASTI; LESKOVAC; VASIĆ, 2015).

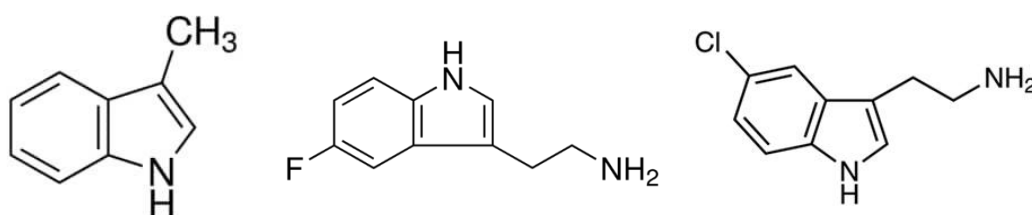
Um exemplo desta classe é a melatonina (Figura 5), um neuro-hormônio indólico, que apresentou capacidade de diminuir a taxa de consumo de H_2O_2 no ciclo de peroxidação, devido a formação de um complexo melatonina- MPO inativo e ainda, na presença de íons cloreto, referentes ao ciclo de halogenação, evidenciou-se que ela compete pelo sítio ativo da enzima e atua como doador de elétrons para o Composto I acelerando sua conversão em Composto II. No entanto, a concentração de melatonina em condições fisiológicas não é suficiente para modular corretamente a atividade da MPO (GALIJASEVIC; ABDULHAMID; ABU-SOUD, 2008).

Figura 5 - Estrutura química da melatonina.



Os derivados indólicos também são inibidores da MPO, atuam como doadores de um elétron dos Compostos I e II das peroxidases. Entre eles, 3-metilindol, 5-fluorotriptamina e 5-clorotriptamina (Figura 6) apresentaram os menores valores de Cl_{50} (0,10 μ M; 0,79 μ M e 0,73 μ M, respectivamente). Foi demonstrado que esses doadores de um elétron aromáticos são capazes de se ligarem à bolsa hidrofóbica na cavidade heme distal e são eficientemente oxidados pelo Composto I. Esses compostos, portanto, inibem a MPO acelerando a formação do Composto II da MPO (JANTSCHKO et al., 2005).

Figura 6- Estrutura química do 3-metilindol, 5-fluorotriptamina e 5-clorotriptamina, respectivamente.

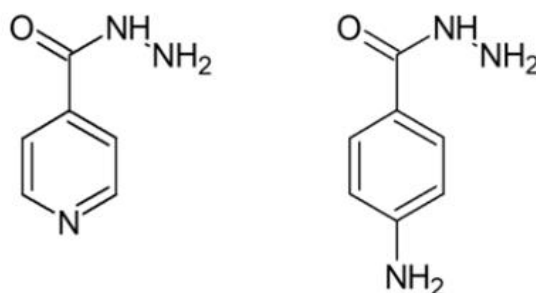


1.5.2 Inibidores irreversíveis

As hidrazinas (RNHNH₂) e hidrazidas (RCONHNH₂) são substâncias identificadas como substratos suicidas de MPO, ou seja, inibem irreversivelmente a enzima. A isoniazida (Figura 7), hidrazida utilizada na clínica como agente antituberculose, inibe irreversivelmente ambas as atividades da MPO (cloração e peroxidação), apresentando uma Cl_{50} de 5 μ M. O 4-hidrazida do ácido benzoico (ABAH) (Figura 6) foi identificado como o inibidor da atividade peroxidase da MPO mais potente, apresentando Cl_{50} de 0,3 μ M. O ABAH é oxidado no ciclo da peroxidase

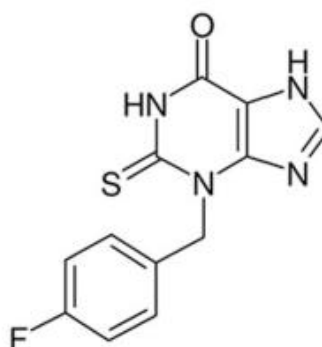
pelos compostos I e II e os radicais produzidos convertem rapidamente a enzima ao seu estado férrico e a formação de Composto III. A inibição irreversível ocorre com a ausência de oxigênio e com o acúmulo de MPO no seu estado férrico, inativando o grupo protético heme pelos radicais formados pelo ABAH (KETTLE; GEDYE; WINTERBOURN, 1997; MALLE et al., 2007).

Figura 7- Estrutura química da isoniazida e do ABAH, respectivamente.



Os derivados com um grupo 2-tioxantina demonstraram alto potencial inibitório, como por exemplo a TX2 ($0,2 \pm 0,02 \mu\text{M}$) (Figura 8). Após a oxidação da 2-tioxantina pelo Composto I, ocorre formação de um radical livre de tioxantina que apresenta alta reatividade, tal radical transfere um elétron para o grupo heme do Composto II e forma uma ligação covalente através do átomo de enxofre com um dos anéis pirrólicos do grupo heme da MPO (TIDÉN et al., 2011).

Figura 8 – Estrutura química da TX2.

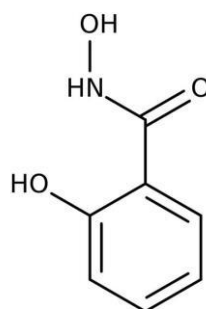


1.5.3 Inibidores reversíveis

Ácidos hidroxâmicos (RCNOHOH ou RC(O)NHOH) são conhecidos pela capacidade de atuarem como substratos redutores para Compostos I e II da MPO, além de atuarem como substitutos para o H₂O₂ nas reações de cloração. Um exemplo dessa classe é o ácido salicilhidroxâmico (SHA) (Figura 9), que apresenta efeito inibitório sobre a MPO, apresentando valor de CI₅₀ de 3-5 mM. Acredita-se que o mecanismo que envolve a inibição da MPO pelo SHA seja a partir da ligação do seu anel aromático a uma região hidrofóbica no sítio de ligação do grupamento heme (SCHONBAUM, 1973; SCHONBAUM; LO, 1972).

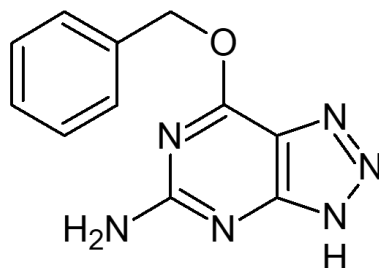
O SHA impediu a formação dos compostos I e II, quando o H₂O₂ estava em baixas concentrações, demonstrando que pode competir pelo sítio de ligação de H₂O₂ na enzima (LAZAREVIĆ-PASTI; LESKOVAC; VASIĆ, 2015).

Figura 9 – Estrutura química do ácido salicilhidroxâmico.



Em uma busca por novas substâncias com potencial inibitório frente à MPO e mecanismo de ação reversível, foi feita uma avaliação sequencial de análogos triazolopirimidinas com padrões de substituição variados com a finalidade de se identificar o derivado da série com o melhor potencial inibitório. O derivado 7-(benziloxi)-3H-[1,2,3] triazolo] 4,5-d] pirimidina-5- amina (Figura 10) apresentou a maior potência (CI₅₀ = 0,1 μM) da série. Em relação ao seu mecanismo parece se ligar ao sítio ativo da MPO, impedindo a atividade catalítica sem formação de radicais intermediários. Além disso, se mostrou capaz de inibir a cloração *in vitro* da apolipoproteína A-1 e a produção de HOCl dos neutrófilos em modelo de camundongos (DUCLOS et al., 2017).

Figura 10- Estrutura química do 7-(benziloxi)-3H-[1,2,3] triazolo] 4,5-d] pirimidina-5- amina.



É importante destacar que a busca por inibidores da MPO visa apenas a inibição da enzima localizada extracelularmente, sem o comprometimento do efeito antimicrobiano da enzima. Acredita-se que isso pode ser conseguido por meio do desenvolvimento de inibidores com característica relativamente polares, visto que esses compostos apresentam maior dificuldade de atravessar a membrana celular do neutrófilo. Há ainda poucos estudos no sentido de medir a capacidade dos inibidores de MPO de entrar ou não nas células (SOUBHYE et al., 2016).

2. JUSTIFICATIVA

Embora o papel da MPO no estresse oxidativo e no dano tecidual progressivo característicos de processos inflamatórios crônicos já seja descrito na literatura, além do seu reconhecimento como um importante alvo terapêutico para o tratamento de diversas doenças inflamatórias, até o momento não existe no mercado farmacêutico um inibidor aprovado para uso clínico (HAWKINS; DAVIES, 2021).

Assim, considerando que muitos estudos visam o desenvolvimento de novas substâncias capazes de inibir a atividade maléfica da MPO, e a falta de inibidores eficazes e seguros, torna-se necessário a avaliação de novos derivados, a fim de descobrir possíveis candidatos a fármacos para o tratamento de doenças de caráter inflamatório (PEREIRA DE JESUS et al., 2022).

Além disso, foi possível observar uma escassez em relação a estudos recentes que avaliam a atividade inibitória das hidrazidas aromáticas sobre o ciclo cloração da MPO, demonstrando que a avaliação farmacológica das mesmas pode agregar novos dados para literatura.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O presente trabalho visa avaliar o perfil farmacológico de 7 derivados hidrazídicos aromáticos sobre a atividade da MPO, verificando assim o potencial desses derivados em atuar como possíveis protótipos de candidatos a fármacos anti-inflamatórios inibidores de MPO.

3.2 Objetivos específicos

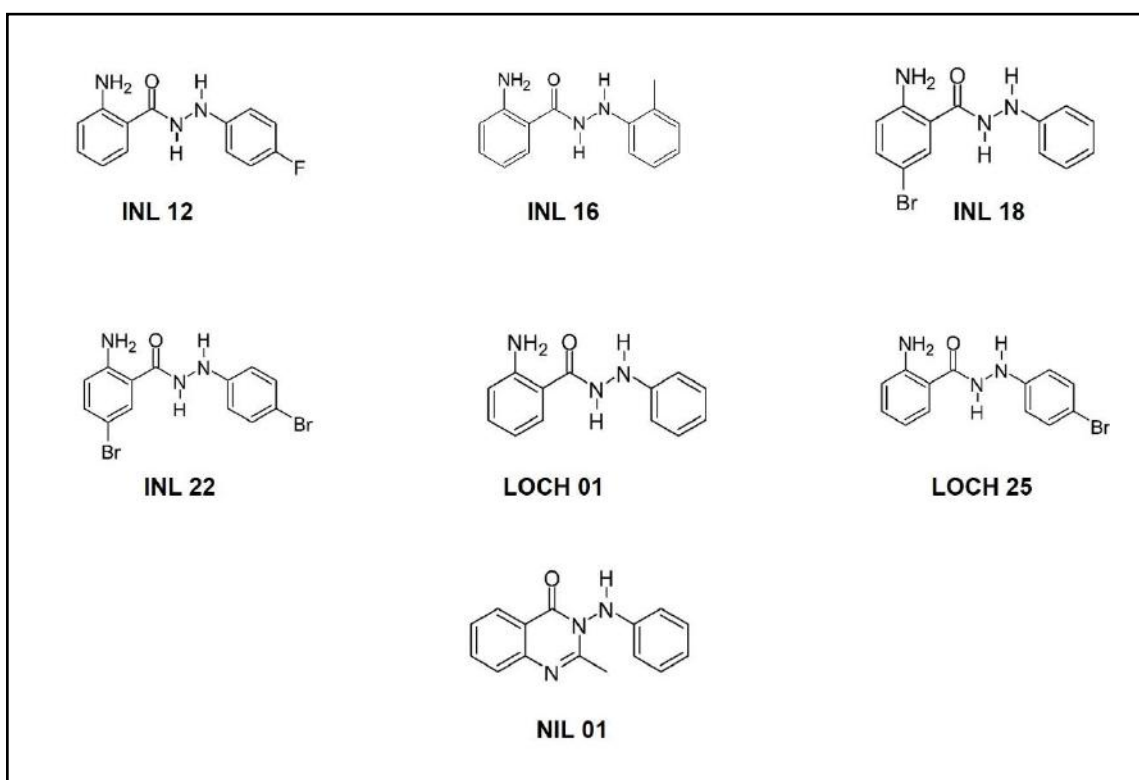
- Avaliar o efeito antioxidante indireto da série de derivados hidrazídicos aromáticos, através da inibição do ciclo cloração da MPO.
- Avaliar o efeito antioxidante direto, através da atividade dos derivados como sequestrantes de Cl-aurina, a fim de eliminar possível interferência com atividade inibitória sobre MPO.
- Avaliar o efeito antioxidante direto, através da atividade dos derivados como sequestrantes de DPPH.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos derivados hidrazídicos aromáticos

Os derivados hidrazídicos aromáticos testadas no presente trabalho (Figura 11) foram obtidos através da parceria com o professor Evanoel Crizanto de Lima, sendo sintetizados no Laboratório de Catálise e Síntese de Substâncias Bioativas - LACASB, localizado no polo Ajuda (UFRJ-Macaé) e cedidos ao Laboratório Integrado de Pesquisa em Farmacologia de Produtos Bioativos, situado na Universidade Federal do Rio de Janeiro campus Macaé, onde foram realizadas as metodologias expostas no trabalho, a fim de avaliar o perfil farmacológico das substâncias frente a atividade da MPO.

Figura 11 - Estrutura química dos derivados hidrazídicos aromáticos.



4.2 Obtenção da MPO

Como fonte de MPO foi empregado sobrenadantes de homogeneizados de células provenientes de lavados de medula óssea ratos. Foi realizada a lavagem do interior dos ossos das patas traseiras dos ratos (fêmur e tíbia) com NaCl 0,9% gelado, para se obter a medula óssea. O material foi então homogeneizado com o auxílio de pipeta plástica com bulbo, tipo Pasteur, e centrifugado por 10 min, a 3000 rpm e em temperatura ambiente (Centribio, 80-2B, Equipar Ltda, Curitiba, Brasil). O sobrenadante foi descartado e o pellet novamente homogeneizado em 5 mL de salina hipotônica (NaCl 0,2% e EDTA 1 mM) por 30 segundos, em seguida, foram adicionados 5 mL de salina hipertônica (NaCl 1,6% e EDTA 1 mM) para o alcance de uma solução novamente isotônica. O material foi novamente centrifugado por 10 min, a 3000 rpm e em temperatura ambiente. Esse procedimento visa a retirada de células vermelhas da amostra e foi repetido até a obtenção do pellet totalmente branco, em geral, duas a três vezes. Uma vez obtido o pellet branco, este foi homogeneizado em homogeneizador tipo Potter (Novatecnica, NT 136, Novatecnica Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, Brasil) com 3 mL de tampão PBS pH 7 10 mM, contendo NaCl 2 mM e MgCl₂ 1 mM (denominado aqui tampão A), esse material foi centrifugado por 15 min, a 20.000 G e a 4 °C (Cientec, ct-15000, Cientec Equipamentos Científicos Ltda, Belo Horizonte, Brasil). O pellet obtido foi novamente homogeneizado em homogeneizador tipo Potter, agora utilizando tampão A acrescido de 1% de HTAB. Após a homogeneização, o material foi novamente centrifugado a 20.000 G, 4 °C por 15 minutos e o sobrenadante foi coletado, fracionado e armazenado em congelador até a realização dos testes (KARIYA et al., 1987; SARKARATI; AKYOL; KILINÇ, 2015).

Para fins estatísticos, cada n representa uma amostra biológica diferente, ou seja, os experimentos foram realizados empregando amostras provenientes de animais diferentes, sendo cada um realizado em triplicata.

4.3 Avaliação farmacológica dos derivados hidrazídicos aromáticos sobre o ciclo clorinação

A atividade da MPO foi avaliada através da produção de HOCl. Para isso, a enzima foi incubada com H₂O₂ e íons cloreto, e o HOCl produzido, por ser altamente instável, foi transformado em cloro-aurina (Cl-Tau), estando a taurina em excesso no

meio reacional (KETTLE et al., 2014; KETTLE; WINTERBOURN, 1994). A quantificação da Cl-Tau se deu através da utilização da tetrametilbenzidina (TMB), reagente incolor, que ao ser oxidado pela Cl-Tau em uma reação catalisada pelo ânion iodeto, gera a sua diimina correspondente (TMB oxidado), de coloração azul. A alteração do pH do meio para ácido, através da adição de H₂SO₄, aumenta a estabilidade dos produtos bem como melhora a sensibilidade do método, alterando a cor do meio para amarelo, que pode ser então detectado por espectrofotometria UV a 450 nm.

Os testes foram realizados em placas de 96 poços, para um volume final de 125 µL, onde foram incubados os derivados hidrazídicos aromáticos, a MPO, tampão fosfato 10 mM pH 7,4, taurina (10 mM) e NaCl (100 mM). Após período de incubação de 15 minutos, adicionou-se H₂O₂ na concentração final 100 µM. Após 15 minutos, a reação foi parada pela adição de catalase, na concentração final de 40 µg/mL, que consumiu qualquer H₂O₂ remanescente no meio reacional. Depois de 5 minutos, foram adicionados 65 µL de solução cromogênica (solução comercial de TMB e 100 KI µM). Após mais 5 minutos adicionou-se 50 µL de solução de H₂SO₄ 1 M, ocorrendo mudança da coloração do meio de azul para amarelo. Em seguida, foi feita a leitura da placa no espectrofotômetro (Biochrom Asys UVM340 Microplate Reader, Biochrom Ltda, Cambridge, Inglaterra) ao comprimento de onda de 450 nm e tendo a densidade óptica obtida diretamente proporcional à quantidade de HOCl gerado pela MPO.

Em etapa de triagem farmacológica os derivados foram avaliados na concentração de 10 µM e em seguida, os ativos foram avaliados em diferentes faixas de concentração para a construção das curvas concentração-resposta correspondentes. A CI₅₀ (concentração inibitória média) foi determinada pela curva de regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

4.4 Avaliação da capacidade sequestrante de Cl-Tau pelos derivados hidrazídicos aromáticos

A atividade sequestrante de cloro-aurina foi medida utilizando o mesmo meio reacional da atividade de cloração, substituindo o H₂O₂ pela cloro-aurina. Essa metodologia foi empregada a fim de eliminar possíveis falsos positivos obtidos na inibição do ciclo cloração. Sendo assim, os derivados hidrazídicos aromáticos que

demonstraram potencial inibitório do ciclo cloração na triagem farmacológica foram também submetidos ao teste de avaliação da capacidade de sequestro Cl-Tau (ZERAİK et al., 2012).

Foram incubados em placas de 96 poços, para um volume final de 100 μL , os derivados hidrazídicos aromáticos em concentração final de 50 μM , tampão fosfato 10 mM pH 7,4 e Cl-Tau a 50 μM . Sendo a Cl-Tau obtida através da mistura de hipoclorito de sódio de uso doméstico com de taurina a 10 mM em tampão fosfato. Em seguida, aguardou-se 15 minutos para que ocorresse a interação entre o derivado e a molécula de Cl-Tau. Após a espera, adicionou-se 25 μL de solução cromogênica (solução comercial de TMB e 300 KI μM) para detecção da Cl-Tau remanescente no meio reacional, aguardou-se 5 minutos para estabilização da coloração e adicionou-se 50 μL de solução de H_2SO_4 a 1 M. Ao final, a placa foi submetida à leitura no espectrofotômetro ao comprimento de onda de 450 nm e tendo a densidade óptica obtida diretamente proporcional à quantidade de Cl-Tau remanescente.

4.5 Avaliação da capacidade sequestrante do radical DPPH pelos derivados hidrazídicos aromáticos

A atividade antioxidante dos derivados hidrazídicos aromáticos, frente a espécies radicalares, foi avaliada a 200 μM usando o DPPH (1,1-Difenil-2-picrilhidrazil). Os radicais DPPH são caracterizados como uma metodologia representativa na triagem preliminar de compostos que apresentam a capacidade de sequestrar espécies de oxigênio ativado, apresentando vantagens de maior estabilidade e facilidade de manusear quando comparados aos radicais livres de oxigênio. Além disso, têm sido amplamente empregados para medir a atividade antioxidante de diferentes compostos (SANTOS et al., 2020).

Foram incubados em placas de 96 poços, para um volume final de 200 μL , estando ambos, os derivados hidrazídicos aromáticos e o DPPH, na concentração final de 200 μM em metanol. Em seguida, colocou-se a mistura na placa agitadora (Ethik Technology, 108, Ethik Technology equipmentsolutions, São Paulo, Brasil), em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 30 minutos. Após o tempo de reação, foi feita leitura em espectrofotômetro a 517 nm.

4.6 Análise estatística

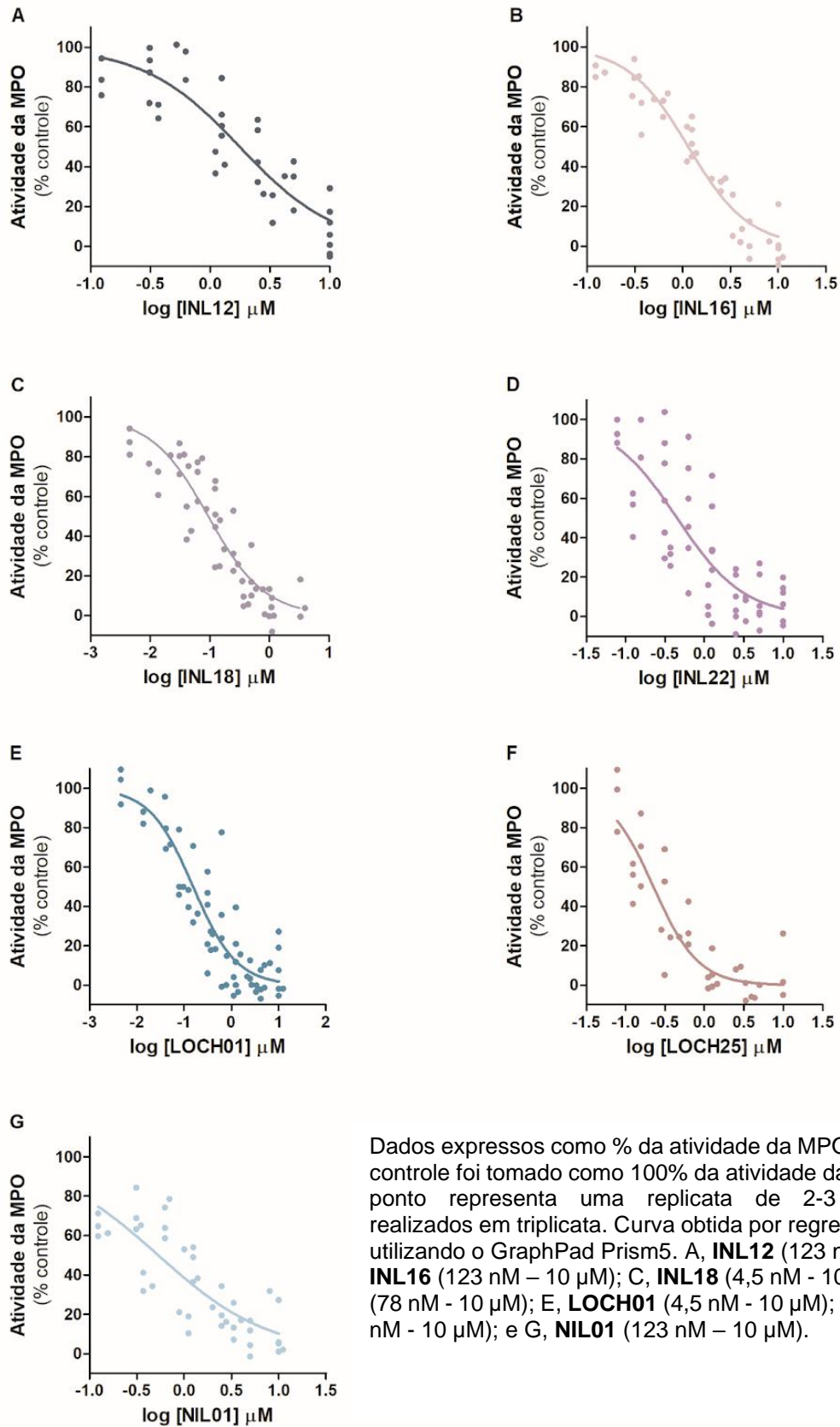
Foi usado o programa GraphPad Prism v.5.0. para cálculo de médias e erro padrão da média, regressão não linear para determinação de CI_{50} , testes de normalidade e medida da significância estatística de possíveis diferenças entre as médias. Foram empregados Teste de Tukey para múltiplas comparações através de análise por ANOVA e Teste t de Student em comparações de pares. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeitos dos derivados hidrazídicos aromáticos sobre o ciclo cloração da MPO

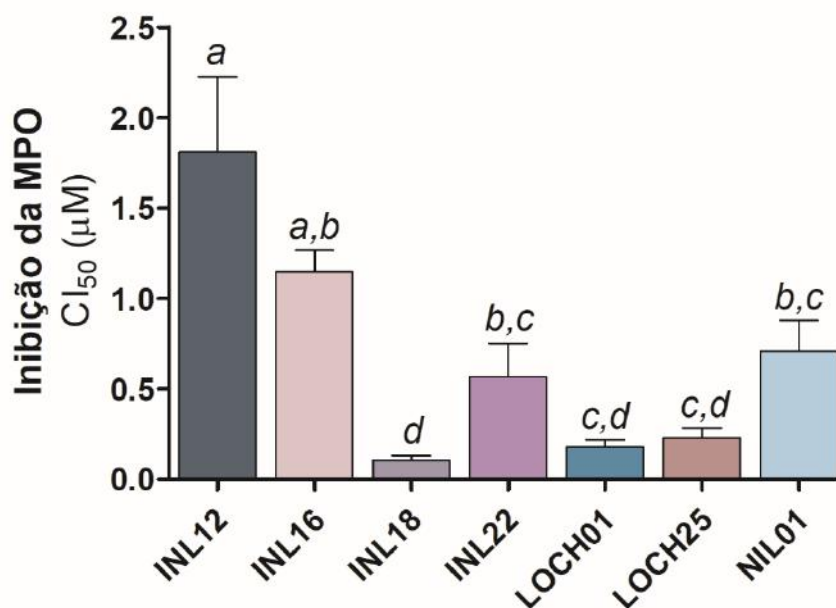
Na etapa de triagem farmacológica sobre a atividade clorinante da MPO, na concentração de 10 μ M, todas as substâncias avaliadas, **INL12**, **INL16**, **INL18**, **INL22**, **LOCH01**, **LOCH25** e **NIL01**, foram capazes de inibir a produção de HOCl pela MPO em valores próximos a 100% (média \pm erro padrão da média: 101,1 \pm 3,2, 101,1 \pm 1,7, 102,7 \pm 1,9, 102,4 \pm 0,6, 103,1 \pm 0,02, 101,5 \pm 1 e 100,3 \pm 3,1, respectivamente). Sendo assim, a relação concentração-resposta de todos os derivados foi avaliada para determinação de suas potências (Figura 12).

Figura 12- Curvas concentração-resposta dos derivados hidrazídicos aromáticos sobre a atividade clorinante da MPO.



Dados expressos como % da atividade da MPO, onde o grupo controle foi tomado como 100% da atividade da enzima. Cada ponto representa uma replicata de 2-3 experimentos realizados em triplicata. Curva obtida por regressão não linear utilizando o GraphPad Prism5. A, **INL12** (123 nM – 10 μM); B, **INL16** (123 nM – 10 μM); C, **INL18** (4,5 nM - 10 μM); D, **INL22** (78 nM - 10 μM); E, **LOCH01** (4,5 nM - 10 μM); F, **LOCH25** (78 nM - 10 μM); e G, **NIL01** (123 nM – 10 μM).

Gráfico 1- Potência inibitória dos derivados hidrazídicos aromáticos sobre a atividade clorinante da MPO.



Valores de CI_{50} foram obtidos através de regressão não linear utilizando o GraphPad Prism5. Barras representam a média e traços o erro padrão da média de ao menos três experimentos independentes. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística, *a,b,c* pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$) e *d* pelo Teste *t* de Student.

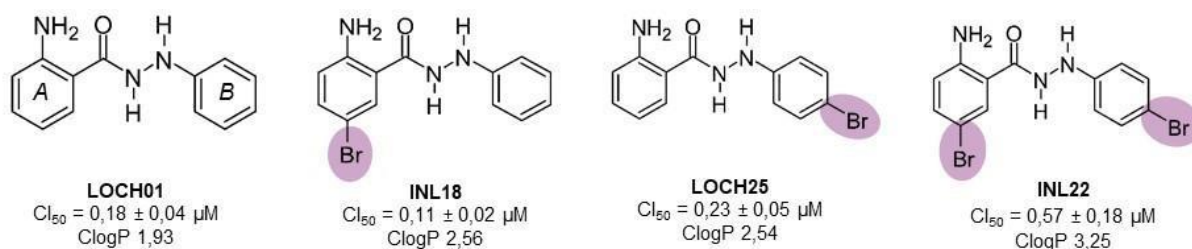
Considerando a estrutura básica dos derivados aqui avaliados, temos dois anéis aromáticos ligados por uma hidrazida, sendo o anel carbonílico (*A*) uma anilina e, na outra extremidade um anel (*B*) oriundo da fenil hidrazina, podemos considerar o derivado **LOCH01** como o protótipo não substituído da série.

Quando se compara com derivado não substituído **LOCH01** ($0,18 \pm 0,04 \mu\text{M}$), a substituição com bromo, seja no anel *A*, como em **INL18**, seja no anel *B*, como em **LOCH25**, ou ainda em ambos os anéis, como em **INL22**, parece não interferir de forma significativa na potência inibitória dos derivados hidrazídicos aromáticos ($0,11 \pm 0,02 \mu\text{M}$, $0,23 \pm 0,05 \mu\text{M}$ e $0,57 \pm 0,18 \mu\text{M}$, respectivamente) (Gráfico1). No entanto, quando se compara as potências dos derivados bromo substituídos entre si, a presença do substituinte bromo nos dois anéis (**INL22**) diminui afinidade de ligação pelo sítio da enzima, em relação a substituição apenas no anel *A* (**INL18**), já que a potência de **INL22** é significativamente menor que a potência do **INL18** (Figura 13).

Foi visto que substâncias aromáticas se ligam a uma bolsa hidrofóbica da enzima para ter acesso ao grupamento heme (HORI et al., 1994). Estudos de relação

estrutura-atividade mostram a relação entre ClogP e a atividade inibitória da enzima por flavonoides, onde sugerem que existe uma espécie de lipofilicidade ótima (~1,5) para atividade inibitória dos flavonoides (SHIBA et al., 2008). Sabe-se que a substituição com o bromo é responsável por aumentar a lipofilicidade da molécula, dado o valor de ClogP do derivado **INL22** (3,25) ser maior que o valor de ClogP do derivado **INL18** (2,56). Sendo assim, é possível concluir que o derivado **INL22** possua uma excessiva lipofilicidade, afetando assim sua afinidade de interação com o sítio da MPO.

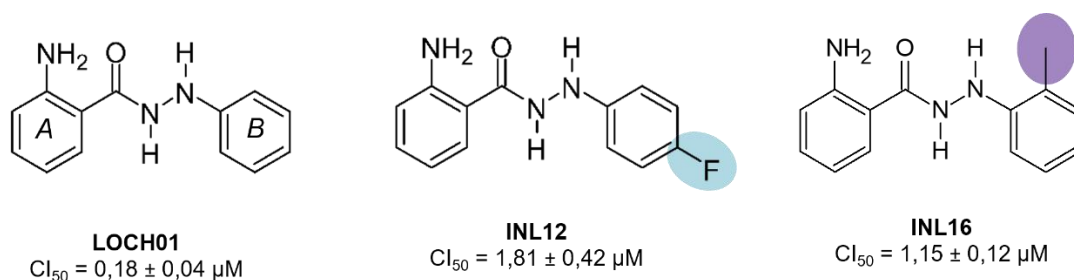
Figura 13- Comparação entre as estruturas do derivado não substituído e bromo substituídos.



Concentração inibitória média (Cl_{50}) da atividade inibitória sobre o ciclo cloração da MPO e ClogP dos derivados hidrazídicos aromáticos **LOCH01**, **INL18**, **LOCH25** e **INL22**. ClogP calculado em <http://www.swissadme.ch/>.

Por outro lado, a presença do flúor e da metila do anel **B** nos derivados **INL12** e **INL16**, respectivamente, diminuiu de forma significativa a potência inibitória do ciclo cloração da MPO desses derivados ($1,81 \pm 0,42 \mu\text{M}$ e $1,15 \pm 0,12 \mu\text{M}$) (Gráfico 1) em comparação com o derivado não substituído, **LOCH01** ($0,18 \pm 0,04 \mu\text{M}$) (Figura 14).

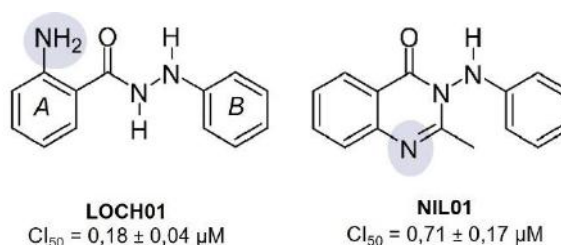
Figura 14- Comparação entre as estruturas do derivado não substituído e derivados com flúor e metila como substituintes.



Concentração inibitória média (Cl_{50}) da atividade inibitória sobre o ciclo cloração da MPO dos derivados hidrazídicos aromáticos **LOCH01**, **INL12** e **INL16**.

Uma alteração estrutural importante pode ser observada no derivado **NIL01**, onde temos um derivado cíclico, representando a perda do grupamento $-NH_2$ livre da anilina, além de uma restrição conformacional quando comparado aos demais da série. A potência inibitória desse derivado ($0,71 \pm 0,17 \mu M$) (Gráfico1), no entanto, não diferiu de forma significativa daquela do derivado não substituído **LOCH01** ($0,18 \pm 0,04 \mu M$), dessa forma, nem a restrição conformacional causada pelo processo de ciclização, que reduziu o número de ligações rotáveis para apenas 2, nem a perda de uma função amina que poderia funcionar como grupamento doador de ligação de hidrogênio foram capazes de prejudicar a afinidade do derivado pelo sítio catalítico da enzima (Figura 15).

Figura 15- Comparação entre as estruturas do derivado não substituído e o derivado ciclizado.



Concentração inibitória média (Cl_{50}) da atividade inibitória sobre o ciclo cloração da MPO dos derivados hidrazídicos aromáticos **LOCH01** e **NIL01**.

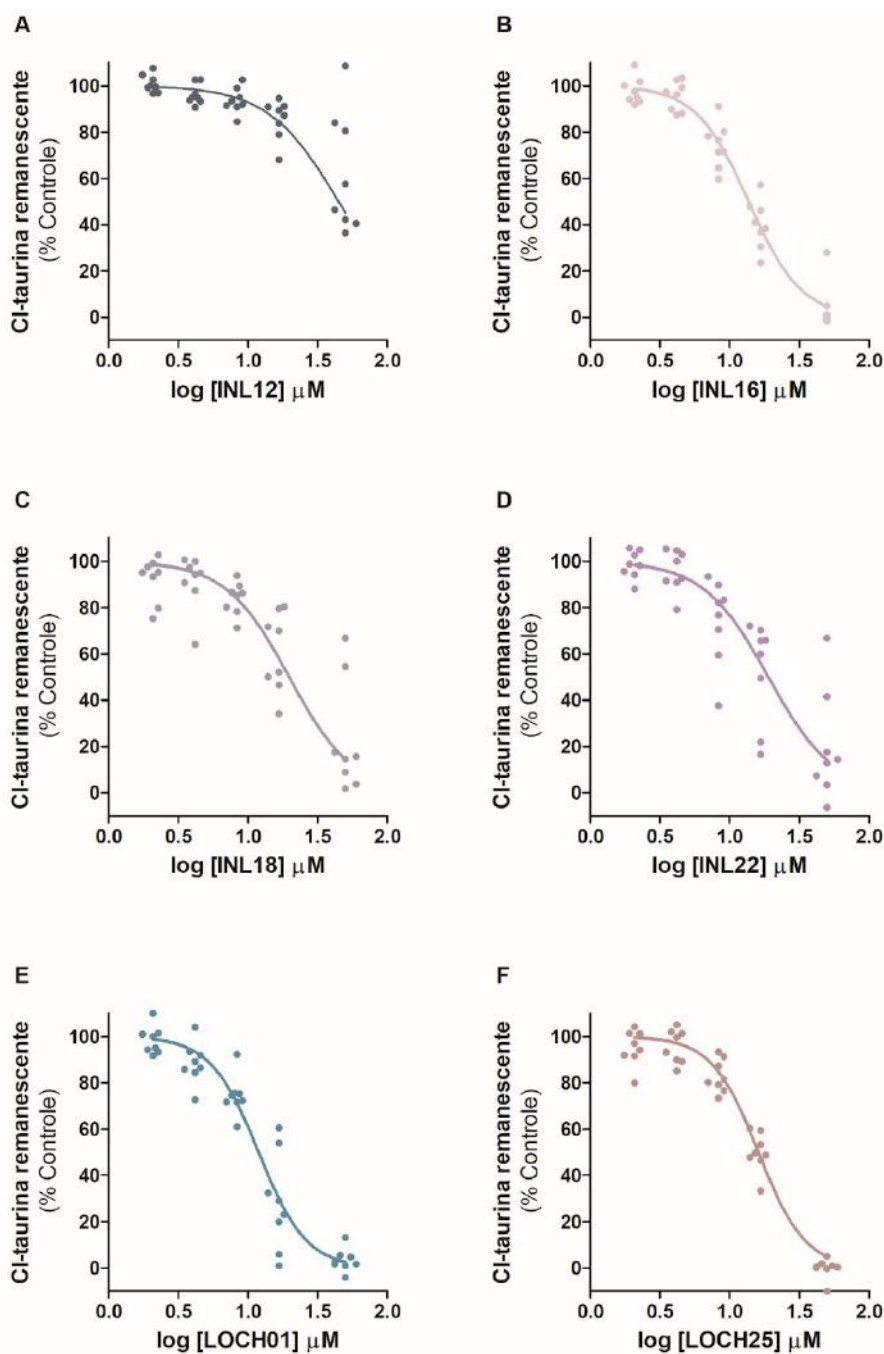
5.2 Efeitos dos derivados hidrazídicos aromáticos sobre a atividade sequestrante de Cl-Tau

Considerando que todos os derivados hidrazídicos aromáticos apresentaram atividade inibitória sobre o ciclo cloração da MPO, os mesmos foram submetidos ao protocolo que investiga possíveis interferências em reações que não seja aquela catalisada pela enzima, o qual chamamos de avaliação da capacidade sequestrante de Cl-Tau. Esse teste, portanto, visa principalmente eliminar possíveis falsos positivos, uma vez que essas interferências podem ser confundidas com uma menor produção de HOCl.

Em etapa de triagem farmacológica, na concentração de $50 \mu M$, os derivados **INL16**, **INL18**, **INL22**, **LOCH01** e **LOCH25** apresentaram atividade sequestrante de Cl-Tau, respectivamente ($108 \pm 4,9 \%$; $98,6 \pm 4,6 \%$, $102,8 \pm 3,3 \%$, $104,9 \pm 3,5 \%$, $109 \pm 4,1 \%$). Enquanto o derivado **INL12** apresentou menor atividade sequestrante

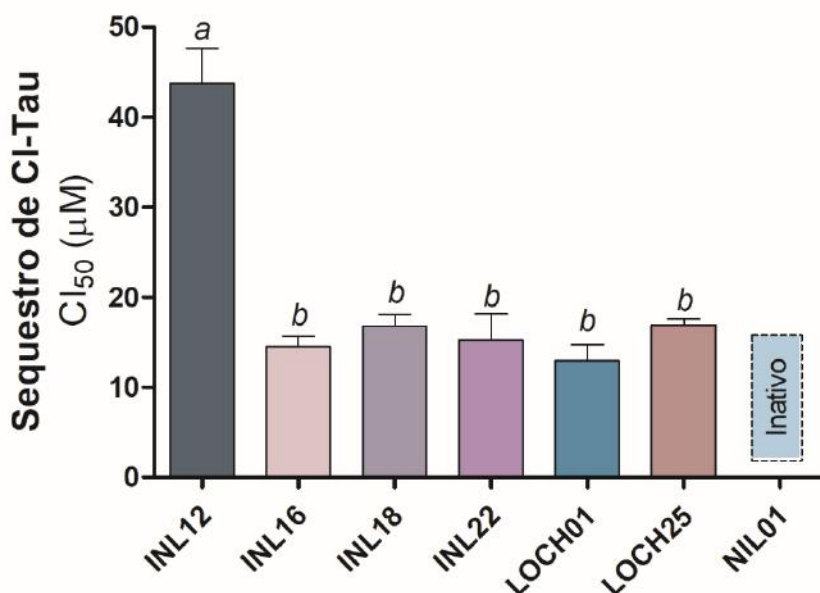
de Cl-Tau ($42,6 \pm 3,7 \%$) e o derivado **NIL 01** não apresentou atividade significativa ($14,4 \pm 7,3 \%$). Sendo assim, a relação concentração-resposta dos derivados que apresentaram atividade sequestrante significativa foi avaliada para determinação de suas potências (Figura 16).

Figura 16- Curvas concentração-resposta dos derivados hidrazídicos aromáticos sobre a atividade sequestrante de Cl-Tau.



Dados expressos como % da Cl-aurina remanescente, onde o grupo controle foi tomado como 100%. Cada ponto representa uma replicata de 2 experimentos realizados em triplicata. Curva obtida por regressão não linear utilizando o GraphPad Prism5. A faixa de concentração 2,1 a 50 μM foi empregada para todos os derivados testados. A, **INL12**; B, **INL16**; C, **INL18**; D, **INL22**; E, **LOCH01**; e F, **LOCH25**

Gráfico 2- Potência sequestrante dos derivados hidrazídicos aromáticos sobre o sequestro de Cl- taurina.



Valores de Cl₅₀ foram obtidos através de regressão não linear utilizando o GraphPad Prism5. Barras representam a média e traços o erro padrão da média de 2 experimentos independentes. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística pelo Teste de Tukey (P < 0,05).

Os derivados **INL16**, **INL18**, **INL22**, **LOCH01** e **LOCH25** apresentaram atividade sequestrante, com valores de Cl₅₀ próximos (14,48 ± 1,17 µM, 16,81 ± 1,29 µM, 15,24 ± 2,87 µM, 12,92 ± 1,81 µM e 16,87 ± 0,7 µM, respectivamente). Enquanto, o derivado **INL12** apresentou menor potência, com valor de Cl₅₀ de 43,75 ± 3,91 µM (Gráfico 2). Esses dados corroboram o perfil observado na etapa de triagem farmacológica.

Considerando que apenas o derivado **NIL01** se mostrou desprovido de capacidade sequestrante de Cl-tau na concentração avaliada, considerando também, que este derivado é o único que possui uma diferença estrutural, onde não há a presença do grupamento -NH₂ da anilina, podemos supor então que este grupamento pode estar relacionado com essa propriedade do derivado.

O derivado menos potente frente a atividade sequestrante de Cl-Tau foi **INL12**, apresentando em sua estrutura química um flúor como substituinte no anel *B*. Sabe-se que a introdução do flúor como substituinte pode alterar significativamente as características eletrônicas de compostos orgânicos, devido a sua alta

eletronegatividade, modificando a reatividade dos grupos vizinhos (BOECHAT; PINTO; BASTOS, 2015). Desse modo, a menor capacidade sequestrante do **INL12** pode estar relacionada com a característica eletro-atratora do flúor, que diminui a densidade eletrônica do anel *B*, uma vez que, o derivado **LOCH25** é mais potente, dado que apresenta no mesmo anel e posição o bromo, sabidamente da mesma família do flúor, porém menos eletronegativo.

Foi feita a comparação entre as potências dos derivados hidrazídicos de sequestrar Cl-Tau e de inibir o ciclo cloração da MPO, a fim de provar que a atividade sequestrante não interferiu na atividade inibitória dos derivados. O derivado **INL16** foi o que apresentou a menor razão entre as CI_{50} de sequestro e de inibição (12,6), demonstrando assim, que realmente não houve interferência da atividade sequestrante de Cl-Tau na atividade inibitória dos derivados sobre o ciclo cloração da MPO. Podemos destacar ainda, o derivado **INL18**, que não apenas apresenta a menor CI_{50} para atividade inibitória da MPO, mas também possui a maior razão entre as CI_{50} de sequestro e de inibição (152,8) (Tabela 1).

Tabela 1 - Razão entre as potências de sequestro de Cl-aurina e inibição do ciclo cloração da MPO.

Substância	Sequestro Cl-Tau	Inibição MPO	Razão (sequestro/inibição)
	CI_{50} (μ M) Média \pm epm	CI_{50} (μ M) Média \pm epm	
INL12	43,75 \pm 3,91	1,81 \pm 0,42	24,2
INL16	14,48 \pm 1,17	1,15 \pm 0,12	12,6
INL18	16,81 \pm 1,29	0,11 \pm 0,02	152,8
INL22	15,24 \pm 2,87	0,57 \pm 0,18	26,7
LOCH01	12,92 \pm 1,81	0,18 \pm 0,04	71,8
LOCH25	16,87 \pm 0,7	0,23 \pm 0,05	73,3
NIL01	ND	0,71 \pm 0,17	-

5.3 Efeitos dos derivados hidrazídicos aromáticos sobre a atividade sequestrante do radical DPPH

Os derivados hidrazídicos aromáticos também foram submetidos ao protocolo de sequestro do radical DPPH, a fim de avaliar a capacidade dos mesmos de agirem como substâncias antioxidantes capazes de interagir com espécies radicalares, visto a importância da atividade antioxidante em proteger o organismo dos danos causados pelos radicais livres (OLIVEIRA, 2015).

Em etapa de triagem farmacológica, na concentração de 200 μ M, os derivados **INL16**, **INL18**, **INL22**, **LOCH01** e **LOCH25** apresentaram atividade sequestrante do radical DPPH, respectivamente (média \pm erro padrão da média: 93,2% \pm 1,1; 92,7% \pm 1,1; 91,2% \pm 1,3; 93,8% \pm 0,9; 92,9% \pm 0,8). Enquanto o derivado **INL12** apresentou menor atividade (24,6% \pm 4,3) e o derivado **NIL 01** foi inativo (10,4% \pm 3,8). Sendo assim, a relação concentração-resposta dos derivados que apresentaram atividade sequestrante acima de 50% foi avaliada para determinação de suas potências (Figura 17).

Figura 17- Curvas concentração-resposta dos derivados hidrazídicos aromáticos sobre a atividade sequestrante do radical DPPH

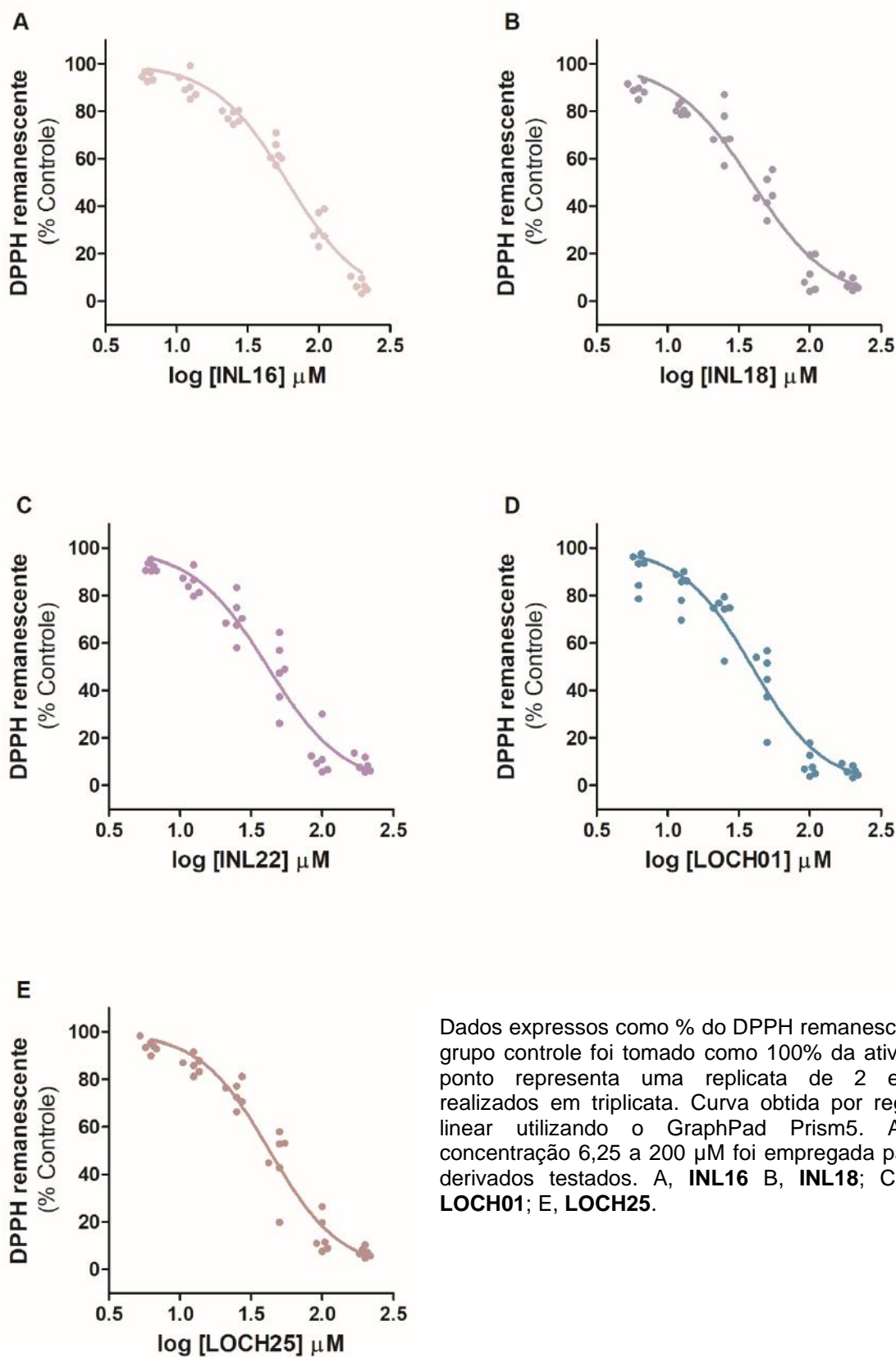
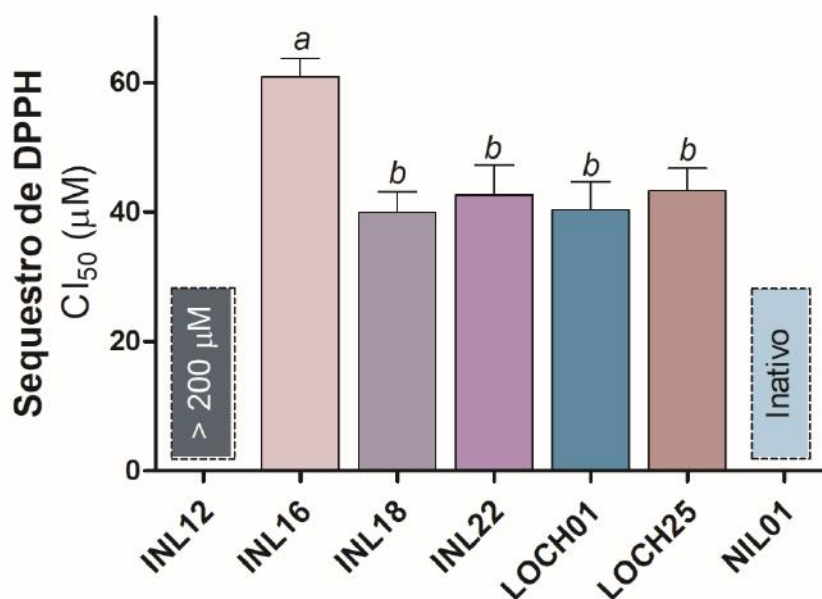


Gráfico 3 - Potência sequestrante dos derivados hidrazídicos aromáticos sobre o DPPH.



O efeito dos derivados foi avaliado frente a 200 µM de DPPH em metanol. Valores de CI₅₀ foram obtidos através de regressão não linear utilizando o GraphPad Prism5. Pontos representam a média e traços o erro padrão da média de 2 experimentos independentes. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

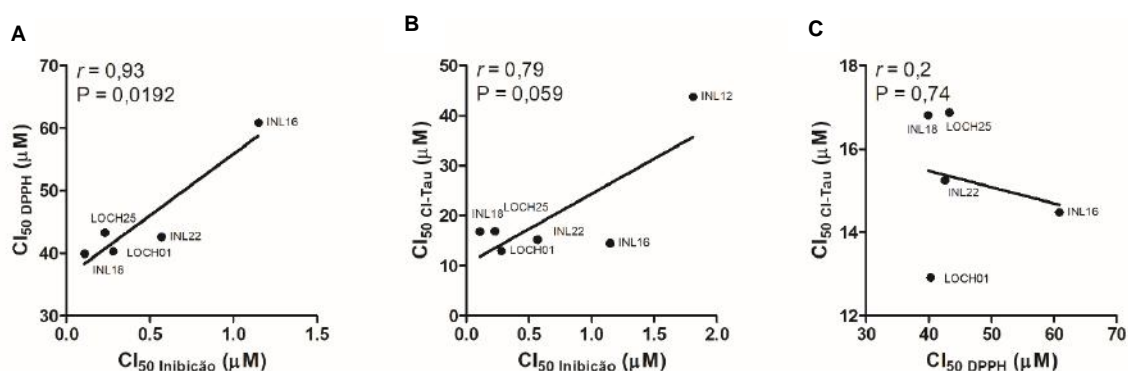
O derivado **NIL01** não apresentou atividade sequestrante de DPPH, mostrando que a perda do grupamento $-NH_2$ da anilina prejudicou a capacidade desse derivado de reagir com este radical. Assim como, a eletronegatividade do substituinte flúor do derivado **INL12** parece reduzir a sua atividade sequestrante de DPPH.

Diferente do que foi observado na atividade sequestrante de Cl-Tau, a qual o derivado **INL16** estava entre os mais potentes, na atividade sequestrante de DPPH, este derivado foi menos potente ($60,8 \pm 2,80 \mu\text{M}$) quando comparado ao **INL18**, **INL22**, **LOCH01** e **LOCH25** ($38,9 \pm 3,2 \mu\text{M}$; $42,6 \pm 4,6 \mu\text{M}$; $40,3 \pm 4,4 \mu\text{M}$; $43,3 \pm 3,4 \mu\text{M}$ respectivamente). Considerando que o derivado **INL16** apresenta em sua estrutura uma metila como substituição na posição *orto* do anel *B*, e ainda que os outros substituintes desse anel se encontram na posição *para*, não podemos desprezar possíveis efeitos estéricos, além de efeitos eletrônicos no prejuízo dessa atividade (Gráfico 3).

Observando todas as atividades apresentadas pelos derivados hidrazídicos aromáticos, podemos verificar se existe correlação entre elas. A atividade inibitória do

ciclo cloração da MPO parece estar mais relacionada com a atividade sequestrante de DPPH ($r = 0,93$; $p = 0,0192$) (Figura 18a) do que com a atividade sequestrante de Cl-Tau ($r = 0,79$; $p = 0,059$) (Figura 18b). Além disso, as atividades de sequestro de Cl-Tau e de DPPH não apresentaram correlação entre si ($r = 0,2$; $p = 0,74$) (Figura 18c).

Figura 18- Possíveis correlações entre as atividades dos derivados hidrazídicos aromáticos.



A, correlação entre atividade sequestrante de DPPH e inibição da MPO; B, correlação entre atividade sequestrante de Cl-Tau e inibição da MPO; C, correlação entre atividade sequestrante de Cl-Tau e DPPH.

Juntos esses dados sugerem uma atividade antioxidante significativa para os derivados hidrazídicos aromáticos, seja inibindo a produção de espécies reativas pela MPO, principalmente HOCl, seja através do sequestro de espécies oxidantes radicalares, como DPPH, ou não radicalares, como Cl-Tau. Destacando o derivado **INL18** que apresentou uma maior potência da atividade inibitória do ciclo cloração da enzima, além de se mostrar capaz de sequestrar Cl-Tau e DPPH.

É importante ressaltar que a atividade inibitória dos derivados hidrazídicos aromáticos pareceu ser menos sensível em relação as alterações estruturais presentes na série, uma vez que, as diferentes substituições em pontos variados da molécula não levaram a perda total da atividade inibitória da enzima. Por outro lado, as atividades sequestrantes de Cl-Tau e de DPPH foram perdidas no derivado cíclico (**INL01**), além de terem sido reduzidas drasticamente pela presença do substituinte flúor na posição *para* do anel *B* (**INL12**).

6. CONCLUSÃO

A partir do presente estudo, foi possível observar que todos os derivados hidrazídicos aromáticos apresentaram atividade inibitória sobre o ciclo clorinação da MPO. Porém alterações estruturais tanto em relação a substituição quanto a ciclização foram responsáveis por alterar o perfil inibitório destes derivados. O derivado **INL18** apresentou a menor CI_{50} ($0,11 \pm 0,02 \mu M$) na atividade inibitória sobre o ciclo clorinação da MPO, além de se mostrar capaz de sequestrar espécies radicalares, DPPH e não radicares, CI-Tau.

A avaliação da capacidade sequestrante de CI-Tau pelos derivados hidrazídicos aromáticos foi essencial para comprovar que não houve interferência na atividade inibitória sobre o ciclo clorinação. Mais uma vez, o derivado **INL18** se destacou, visto que apresentou uma maior razão entre as CI_{50} de sequestro e de inibição (152,8).

Sendo assim, o derivado **INL18** parece ser um candidato promissor a protótipo de fármaco inibidor de MPO, podendo contribuir para a busca e desenvolvimento de novos tratamentos para doenças de caráter inflamatório, como as doenças cardiovasculares.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-SOUD, H. M.; HAZEN, S. L. Nitric Oxide Modulates the Catalytic Activity of Myeloperoxidase *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 8, p. 5425–5430, 25 fev. 2000.

AGNER, K. **Verdoperoxidase: a ferment isolated from leucocytes**. Stockholm: [s.n.].

BAINTON, D. F.; ULLYOT, J. L.; FARQUHAR, M. G. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 134, n. 4, p. 907–934, 1 out. 1971.

BOECHAT, N.; PINTO, A. DA C.; BASTOS, M. M. MÉTODOS SELETIVOS DE FLUORAÇÃO DE MOLÉCULAS ORGÂNICAS. **Química Nova**, v. 38, p. 1323–1338, dez. 2015.

BOLSCHER, B. G.; WEVER, R. A kinetic study of the reaction between human myeloperoxidase, hydroperoxides and cyanide. Inhibition by chloride and thiocyanate. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 788, n. 1, p. 1–10, 17 jul. 1984.

CHENG, D. et al. Inhibition of MPO (Myeloperoxidase) Attenuates Endothelial Dysfunction in Mouse Models of Vascular Inflammation and Atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 39, n. 7, p. 1448–1457, jul. 2019.

DAUGHERTY, A. et al. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 94, n. 1, p. 437–444, jul. 1994.

DAVIES, M. J. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 48, n. 1, p. 8–19, jan. 2011.

DELPORTE, C. et al. Low-Density Lipoprotein Modified by Myeloperoxidase in Inflammatory Pathways and Clinical Studies. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. e971579, 24 jul. 2013.

DUCLOS, F. et al. Triazolopyrimidines identified as reversible myeloperoxidase inhibitors †Electronic supplementary information (ESI) available: General synthetic methods, key compound characterization, assay methods, and crystallographic information are available in the ESI. See DOI: 10.1039/c7md00268h. **MedChemComm**, v. 8, n. 11, p. 2093–2099, 26 out. 2017.

EISERICH, J. P. et al. Myeloperoxidase, a Leukocyte-Derived Vascular NO Oxidase. **Science**, v. 296, n. 5577, p. 2391–2394, 2002.

FIEDLER, T. J.; DAVEY, C. A.; FENNA, R. E. X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8 Å resolution. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 16, p. 11964–11971, 21 abr. 2000.

FORBES, L. V.; KETTLE, A. J. A multi-substrate assay for finding physiologically effective inhibitors of myeloperoxidase. **Analytical Biochemistry**, v. 544, p. 13–21, 1 mar. 2018.

FURTMÜLLER, P. G. et al. Redox properties of the couples compound I/compound II and compound II/native enzyme of human myeloperoxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 301, n. 2, p. 551–557, 7 fev. 2003.

FURTMÜLLER, P. G. et al. Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, n. 2, p. 199–213, 15 jan. 2006.

FURTMÜLLER, P. G.; BURNER, U.; OBINGER, C. Reaction of Myeloperoxidase Compound I with Chloride, Bromide, Iodide, and Thiocyanate. **Biochemistry**, v. 37, n. 51, p. 17923–17930, 1 dez. 1998.

GALIJASEVIC, S. The development of myeloperoxidase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 29, n. 1, p. 1–7, 1 jan. 2019.

GALIJASEVIC, S.; ABDULHAMID, I.; ABU-SOUD, H. M. Melatonin is a potent inhibitor for myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 47, n. 8, p. 2668–2677, 26 fev. 2008.

GLASS, C. K.; WITZTUM, J. L. Atherosclerosis. the road ahead. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 503–516, 23 fev. 2001.

HAWKINS, C. L.; DAVIES, M. J. Role of myeloperoxidase and oxidant formation in the extracellular environment in inflammation-induced tissue damage. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 172, p. 633–651, 20 ago. 2021.

HAZEN, S. L. Myeloperoxidase and plaque vulnerability. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, n. 7, p. 1143–1146, jul. 2004.

HOOGLAND, H. et al. Spectral properties of myeloperoxidase compounds II and III. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 916, n. 1, p. 76–82, 5 nov. 1987.

HORI, H. et al. Aromatic substrate molecules bind at the distal heme pocket of myeloperoxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 11, p. 8388–8392, 18 mar. 1994.

HOY, A. et al. Serum myeloperoxidase concentration in a healthy population: biological variations, familial resemblance and new genetic polymorphisms. **European Journal of Human Genetics**, v. 9, n. 10, p. 780–786, out. 2001.

JANTSCHKO, W. et al. Exploitation of the unusual thermodynamic properties of human myeloperoxidase in inhibitor design. **Biochemical pharmacology**, v. 69, n. 8, p. 1149–1157, 1 abr. 2005.

KAMANNA, V. S.; GANJI, S. H.; KASHYAP, M. L. Myeloperoxidase and Atherosclerosis. **Current Cardiovascular Risk Reports**, v. 2, n. 7, p. 102–107, 2013.

KANG, E. M. et al. Chronic granulomatous disease: overview and hematopoietic stem cell transplantation. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 6, p. 1319–1326; quiz 1327–1328, jun. 2011.

KARIYA, K. et al. Purification and some properties of peroxidases of rat bone marrow. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 911, n. 1, p. 95–101, 5 jan. 1987.

KENNEDY, A. D.; DELEO, F. R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. **Immunologic Research**, v. 43, n. 1–3, p. 25–61, 2009.

KETTLE, A. J. et al. Measuring chlorine bleach in biology and medicine. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, Current methods to study reactive oxygen species - pros and cons. v. 1840, n. 2, p. 781–793, 1 fev. 2014.

KETTLE, A. J.; GEDYE, C. A.; WINTERBOURN, C. C. Mechanism of inactivation of myeloperoxidase by 4-aminobenzoic acid hydrazide. **Biochemical Journal**, v. 321, n. Pt 2, p. 503–508, 15 jan. 1997.

KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. [53] Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase. Em: **Methods in Enzymology**. Oxygen Radicals in Biological Systems Part C. [s.l.] Academic Press, 1994. v. 233p. 502–512.

KHAN, A. et al. Biochemical and Pathological Studies on Peroxidases –An Updated Review. **Global Journal of Health Science**, v. 6, n. 5, p. p87, 13 maio 2014.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, n. 5, p. 598–625, 2005.

KLEBANOFF, S. J. et al. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, n. 2, p. 185–198, fev. 2013.

KOEFFLER, H. P.; RANYARD, J.; PERTCHECK, M. Myeloperoxidase: its structure and expression during myeloid differentiation. **Blood**, v. 65, n. 2, p. 484–491, fev. 1985.

KOETH, R. A.; HASELDEN, V.; TANG, W. H. W. Chapter One - Myeloperoxidase in Cardiovascular Disease. Em: MAKOWSKI, G. S. (Ed.). . **Advances in Clinical Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2013. v. 62p. 1–32.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–175, mar. 2013.

Current Drug Metabolism, v. 16, n. 3, p. 168–190, 2015.

MALLE, E. et al. Myeloperoxidase: a target for new drug development? **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 6, p. 838–854, nov. 2007.

NAUSEEF, W. M. Biosynthesis of Human Myeloperoxidase. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 642, p. 1–9, 15 mar. 2018.

NDREPEPA, G. Myeloperoxidase – A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 493, p. 36–51, jun. 2019.

NICHOLLS, S. J.; HAZEN, S. L. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 6, p. 1102–1111, jun. 2005.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 36–44, mar. 2015.

PAUMANN-PAGE, M. et al. Inactivation of human myeloperoxidase by hydrogen peroxide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 539, n. 1, p. 51–62, 1 nov. 2013.

PEREIRA DE JESUS, R. et al. Myeloperoxidase Inhibitors as Anti-Inflammatory Drug Candidates. **Revista Virtual de Química**, 2022.

ROSS, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 2, p. 115–126, 14 jan. 1999.

RUDOLPH, T. K. et al. Myeloperoxidase deficiency preserves vasomotor function in humans. **European Heart Journal**, v. 33, n. 13, p. 1625–1634, jul. 2012.

SANTOS, D. C. et al. Acylhydrazones as isoniazid derivatives with multi-target profiles for the treatment of Alzheimer's disease: Radical scavenging, myeloperoxidase/acetylcholinesterase inhibition and biometal chelation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 115470, 15 maio 2020.

SARKARATI, B.; AKYOL, T. K.; KILINÇ, K. An easy two-step purification method for human leucocyte myeloperoxidase / İnsan lökosit miyeloperoksidazı saflaştırılması için kolay 2 basamaklı yöntem. **Turkish Journal of Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 410–416, 1 out. 2015.

SCHONBAUM, G. R. New Complexes of Peroxidases with Hydroxamic Acids, Hydrazides, and Amides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 248, n. 2, p. 502–511, 25 jan. 1973.

SCHONBAUM, G. R.; LO, S. Interaction of Peroxidases with Aromatic Peracids and Alkyl Peroxides: PRODUCT ANALYSIS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3353–3360, 25 maio 1972.

SCHULTZ, J.; KAMINKER, K. Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. I. Content and localization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 96, p. 465–467, mar. 1962.

SHIBA, Y. et al. Flavonoids as substrates and inhibitors of myeloperoxidase: molecular actions of aglycone and metabolites. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 8, p. 1600–1609, ago. 2008.

SHIVAKUMAR, A.; BG, J.; MR, D. Role of Peroxidase in Clinical Assays: A Short Review. **Journal of Clinical Nutrition & Dietetics**, v. 3, n. 2, 12 maio 2017.

SOUBHYE, J. et al. Myeloperoxidase as a Target for the Treatment of Inflammatory Syndromes: Mechanisms and Structure Activity Relationships of Inhibitors. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 35, p. 3975–4008, 2016.

STEINBERG, D. et al. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. **The New England Journal of Medicine**, v. 320, n. 14, p. 915–924, 6 abr. 1989.

STOCKER, R.; KEANEY, J. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 4, p. 1381–1478, out. 2004.

TIDÉN, A.-K. et al. 2-thioxanthines are mechanism-based inactivators of myeloperoxidase that block oxidative stress during inflammation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 43, p. 37578–37589, 28 out. 2011.

UZEL, G.; HOLLAND, S. M. 21 - Phagocyte deficiencies. Em: RICH, R. R. et al. (Eds.). **Clinical Immunology (Fourth Edition)**. London: Elsevier, 2013. p. 270–283.

VAN DER VEEN, B. S.; DE WINTHER, M. P. J.; HEERINGA, P. Myeloperoxidase: Molecular Mechanisms of Action and Their Relevance to Human Health and Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 11, p. 2899–2937, nov. 2009.

VITA, J. A. et al. Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans. **Circulation**, v. 110, n. 9, p. 1134–1139, 31 ago. 2004.

YAMADA, M.; KURAHASHI, K. Regulation of myeloperoxidase gene expression during differentiation of human myeloid leukemia HL-60 cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 5, p. 3021–3025, 10 mar. 1984.

ZENG, J.; FENNA, R. E. X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 226, n. 1, p. 185–207, 5 jul. 1992.

ZERAIK, M. L. et al. 4'-Aminochalcones as novel inhibitors of the chlorinating activity of myeloperoxidase. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 31, p. 5405–5413, 2012.