UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

FORMAÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETE $O_2(^1\Delta_g)$ POR FAGÓCITOS

FLÁVIA GARCIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ HENRIQUE CATALANI

São Paulo 2005

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

Garcia, Flávia
G216f Formação de oxigênio singlete O₂(¹Δ_g) por fagócitos / Flávia Garcia. -- São Paulo, 2005. 101p.
Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica. Orientador : Catalani, Luiz Henrique
1. Oxigênio ativo no ser vivo : Bioquímica 2. Radical livre : Bioquímica I. T. II. Catalani, Luiz Henrique, orientador.

"Formação de oxigênio singlete ${}^{1}O_{2}({}^{1}\Delta_{g})$ por fagócitos"



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



ACREDITAR

"Creio em mim mesmo. Creio nos que trabalham comigo. Creio nos meus amigos e creio na minha família. Creio que Deus me emprestará tudo que necessito para triunfar, contanto que eu me esforce para alcançar com meios lícitos e honestos. Creio nas orações e nunca fecharia meus olhos para dormir, sem pedir antes a devida orientação a fim de ser paciente com os outros e tolerante com os que não acreditam no que eu acredito. Creio que o triunfo é resultado de esforco inteligente, que não depende da sorte, da magia, de amigos, companheiros duvidosos ou do meu chefe. Creio que tirarei da vida exatamente o que nela colocar. Serei cauteloso quando tratar com os outros, como quero que eles sejam comigo. Não diminuirei meu trabalho por ver que os outros o fazem. Prestarei o melhor serviço do que sou capaz, porque jurei a mim mesmo triunfar na vida, e sei que o triunfo é sempre resultado do esforço consciente e eficaz. Finalmente, perdoarei os que me ofendem, Porque compreendo que às vezes ofendo os outros e necessito do perdão." Palavras de um grande líder.

Mahatma Gandhi

Dedico este trabalho à minha mãe Maria Teresa, pessoa sábia e serena, que ama incondicionalmente. E simplesmente por ser uma verdadeira MÃE. E à meu pai Enio, meu amigo e herói, por seus exemplos de determinação e coragem em sua caminhada, e por nunca desistir.

À minha irmã Michele, pelo companheirismo, amizade, incentivo, paciência e amor em todos os momentos. À minha irmã caçula Carolina, pelo incentivo, amor, confiança e por sempre acreditar em mim.

À Deus criador do universo, meu amigo, pela dádiva da vida, pela oportunidade de realizar este trabalho, que tanto contribuiu para meu enriquecimento pessoal, intelectual e profissional.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
LISTA DE ABREVIATURAS	ii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMO	vii
ABSTRAT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos Gerais	1
1.2 Sistema Fagocítico: leucócitos polimorfonucleares e células mononucleares	2
1.3 Mieloperoxidase	4
1.4 Composto indólico biologicamente importante: melatonina	7
1.4.1 Melatonina nas respostas imunológicas e inflamatórias	9
1.5 Quimiluminescência e <i>burst</i> oxidativo	10
1.6 Oxigênio singlete em processos biológicos: sinalização por indução oxidativa	16
1.6.1 Identidade de oxigênio singlete	18
1.6.2 Luminescência do oxigênio singlete	20
1.6.3 Geração, reatividade e detecção do oxigênio singlete	21
1.6.4 Derivados antracênicos	23
1.6.5 Fotossensibilização	24
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Material	28
3.1.1 Reagentes	28
3.2 Equipamentos	29
3.3 Métodos	31
3.3.1 Preparo de reagentes	31
3.3.1.1 Preparação de estímulos	31
3.4 Processos Experimentais	32
3.4.1 Isolamento de neutrófilos humanos de sangue periférico	32
3.4.1.2 Detecção indireta de $^{1}O_{2}$ em células polimofonucleares através do captador químico DPA	33
3.4.2 Isolamento de células mononucleares e monócitos humanos de sangue periférico	34
3.4.2.1 Detecção indireta de $^{1}O_{2}$ em células mononucleares através do captador químico DPA	34
3.4.3 Obtenção de eosinófilos de lavado bronco alveolar de camundongos	35
3.4.4 Utilização do 9,10-difenilantraceno como captador químico de ¹ O ₂	36

3.4.5 Obtenção de imagens por microscopia confocal	38
3.4.6 Estudo da quimiluminescência do ¹ O ₂ na região do infravermelho	38
3.4.7 Avaliação do efeito da MLT em neutrófilos, células mononucleares e eosinófilos sobre a produção	
de ¹ O ₂	39
3.4.8 Síntese do ácido 9,10-antracenil-3-bispropiônico	39
3.4.8.1 Bromação radicalar 9,10-dimetilantraceno	40
3.4.8.2 Síntese malônica	40
3.4.8.2.1 Tratamento de solventes e do éster malônico	41
3.4.8.3 Hidrólise e descarboxilação	41
3.4.9 Síntese do éster 9,10-antracenil-3-bispropionato de etila	42
3.4.10 Síntese do 9,10-dimetilantraceno	43
3.4.10.1 Preparação do 9,10-dihidroxi-9,10-dimetilantraceno	43
3.4.10.2 Preparação do 9,10-dimetilantraceno partindo do 9,10-dihidroxi-9,10-dimetilantraceno	44
3.4.11 Preparação dos endoperóxidos: ABPEO ₂ e AABPO ₂	45
3.5 Detecção indireta de ¹ O ₂ em fagócitos: neutrófilos e monócitos através do captador ABPE	47
3.6 Análise Estatística	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 Detecção de ¹ O ₂ gerado em sistema celular através do captador químico DPA	49
4.1.1 Detecção indireta de ¹ O ₂ em células mononucleares: PBMC	49
4.1.2 Detecção indireta de ¹ O ₂ em células polimofonucleares: neutrófilos	50
4.1.3 Avaliação do efeito da MLT sobre a produção de ¹ O ₂ de neutrófilos e células mononucleares	53
4.1.4 Detecção indireta de ¹ O ₂ em monócitos e células mononucleares	55
4.1.5 Detecção indireta de ¹ O ₂ em eosinófilos de lavado bronco alveolar de Balb/c	57
4.1.6 Avaliação do efeito da MLT sobre a produção de ¹ O ₂ de eosinófilos de lavado bronco alveolar	58
4.1.7 Detecção de ¹ O ₂ utilizando a sonda DPA através de microscopia confocal	60
4.2 Detecção direta de ¹ O ₂ gerado por leucócitos por quimiluminescência na região do infravermelho	62
4.3 Desenvolvimento de uma nova sonda para ¹ O ₂ intracelular	66
4.3.1 Síntese do 9,10-dimetilantraceno	66
4.4 Síntese do éster 9,10-antracenil-3-bispropionato de etila	68
4.5 Síntese do ácido 9,10-antracenil-3-bispropiônico	71
4.6 Detecção e separação por HPLC/MS/MS dos padrões de ABPE, AABP e seus respectivos	
endoperóxidos	73
4.7 Detecção de ¹ O ₂ gerado em sistema celular através da sonda ABPE	75
4.7.1 Detecção indireta de ¹ O ₂ em células mononucleares e neutrófilos	75
4.7.2 Avaliação do ABPE em neutrófilos e células mononucleares ativados por via receptor dependente	
e independente	81
4.7.3 Detecção de $^{1}O_{2}$ em PMN para fins de comparação entre as sondas DPA e ABPE	83
5. CONCLUSÕES	85
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Henrique Catalani, pela amizade, oportunidade de realizar este trabalho, permitindo que eu voasse sozinha, mas me socorrendo quando necessário. Também pela severidade na orientação, que muito me enriqueceu intelectualmente. Minha admiração especial.

A Profa. Dra. Ana Campa, meu porto seguro na pós-graduação, pela colaboração científica, confiança, amizade e por me fazer batalhar, aprender, crescer. Minha eterna gratidão.

Ao Prof. Dr. Paolo Di Mascio pelo apoio científico, valiosa colaboração para a realização de parte importante deste trabalho, paciência e amizade.

A Gláucia minha amiga, pelos ensinamentos científicos, paciência, incentivo e carinho. Minha gratidão especial.

A especialista Fernanda, pelos ensinamentos científicos do espectro de massa, paciência e amizade.

A Profa. Dra. Célia Regina Garcia pela disponibilizarão do Microscópio eletrônico confocal e a seu aluno Flávio, pela ajuda técnica científica das imagens de microscopia.

Ao Prof. Dr. Momtchilo Russo do ICB e a Eliana (Lili) sua aluna, pelo apoio científico.

A Profa. Maria Teresa, minha mãe, pela ajuda nas correções gramaticais deste trabalho.

A todos os amigos do laboratório: Vânia, Guilhermino, Luiz Carlos, Silvia, Reginaldo, Patrícia, Romeu, Aline e Claudete, pelo sangue tão precioso, pelo companheirismo, paciência e incentivo e em especial, a Janaína pela amizade, dedicação e carinho em todos os momentos e ao Antônio, pelo apoio e amizade. Considero a todos como uma dádiva divina.

Ao Valdecir grande amigo, pelas sugestões e pelo valioso carinho.

Ao grupo do laboratório da Ana: Elaine, Cristiane, Silvana, Sabrina, Flávia Mammy, Silene, Rose e Alziana pela convivência e apoio, em especial a Maria Rita, pelo incentivo e amizade, e a Sueli, pela contribuição científica, carinho e apoio.

A todos os colegas de convívio e amizade no Instituto de Química: Sayuri, Lolo, Marcelo, Ana Maria, Joy, Lydia, Miriam, Daniela, Erick, Mara, Carlos, Festa.

A minhas amigas Andréia e Fátima, pela calorosa recepção em São Paulo e pelo incentivo sempre. E ao Paulo colega de graduação, pelo apoio na pósgraduação.

Aos queridos tio Luiz Carlos e tia Dita, meu carinho nas horas difíceis, principalmente na época de Ribeirão Preto. Aos amigos Marcelo, Rose Mary, Aparício, Ivanilde e Dona Maria também desta época.

Minhas amigas de república Larissa e Baby pelo convívio e amizade em Alfenas e a Mareliane, criatura maravilhosa, especial amiga de todas as horas.

A todos os familiares e amigos, que de alguma maneira, colaboraram para minha formação acadêmica e pessoal.

A todos os anônimos doadores de sangue pelo apoio, meu muito obrigado. Aos funcionários da pós-graduação, pela boa vontade e eficiência.

Aos funcionarios da pos-graduação, pela boa voltade e enc

LISTA DE ABREVIATURAS

AABP: ácido 9,10-antracenil-3-bispropiônico ou antraceno-9,10-bis[3propionato de hidrogênio]

(IUPAC : ácido 3-[10-(2-carboxi-etil)-antracen-9-il]propiônico])

AABPO₂: antraceno-9,10-endoperóxido-9,10-bis[3-propionato de hidrogênio] (IUPAC: ácido 3-[10-(2-carboxi-etil)-9,10-dihidro-9,10-epidioxiantracen-9il]propiônico])

ABPE: éster 9,10-antracenil-3-bispropionato de etila ou antraceno-9,10-bis[3propionato de etila]

(IUPAC: 3-[10-(2-etoxicarbonil-etil)-antracen-9-il]propionato de etila)

ABPEO₂: antraceno-9,10-endoperóxido-9,10-bis[3-propionato de etila]

(IUPAC: ácido 3-[10-(2-etoxicarbonil-etil)-9,10-dihidro-9,10-epidioxiantracen-9-il]propiônico])

AABPEO₂: ácido antraceno-9,10-endoperóxido-10[3-propionato de etila]-9-[3propiônico]

(IUPAC: ácido 3-[10-(2-etoxicarbonil-etil)-9,10-dihidro-9,10-epidioxiantracen-9-il]propiônico])

AP-1: proteína-1 de ativação

AP-2: proteína-2 de ativação

APCI-: ionização química a pressão atmosférica no modo negativo

APCI+: ionização química a pressão atmosférica no modo positivo

CL: quimiluminescência

COX2: ciclooxigenase induzida

DMA: 9,10-dimetilantraceno

DMSO: dimetil sulfóxido

DPA: 9,10-difenilantraceno

DPAO₂: difenilantraceno-9,10-endoperóxido

EPO: eosinofilperoxidase

ERO: espécie reativa de oxigênio

ERN: espécie reativa de nitrogênio

- ESI-: modo negativo de ionização por electrospray
- ESI+: modo positivo de ionização por electrospray
- IL: interleucina
- MON: monócitos
- MLT: melatonina
- MPO: mieloperoxidase
- MAPKs: proteínas quinases ativadas por mitogênio
- NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
- NF- κ B: fator nuclear κ B
- ¹O₂: oxigênio singlete
- O2: ânion superóxido
- PBMC: células mononuclares periféricas sangüíneas
- PBS: tampão fosfato salino
- PMA: acetato de forbol miristato
- PMN: polimorfonucleares
- Sens: sensibilizador
- TNF-α: fator de necrose tumoral
- ZO: zimosan opsonizado

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação de células fagocitárias que participam do processo	
inflamatório.	4
Figura 2. Formação de HOCI por fagócitos.	5
Figura 3. Ciclo Peroxidásico da MPO.	7
Figura 4. Via de formação de espécies microbicidas	12
Figura 5. Organização do sistema NADPH oxidase quando fagócitos são	
estimulados.	13
Figura 6. Vias de estimulação para a produção de ânion superóxido por	
fagócitos.	15
Figura 7. Esquema dos efeitos do oxigênio singlete na modulação da	
expressão gênica.	18
Figura 8. Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares (π *) do oxigênio no	
estado excitado singlete (${}^{1}\Sigma_{g}^{+}$, ${}^{1}\Delta_{g}$) e no estado fundamental triplete (${}^{3}\Sigma_{g}^{-}$).	19
Figura 9. Reação de um derivado de antraceno EAS com ¹ O ₂ gerando	
o respectivo endoperóxido EASO ₂ .	22
Figura 10. Esquema de fotosensibilização mostrando os mecanismos tipo l	
e II. (S = substrato, ISC = cruzamento intersistema, sens = sensibilizador).	24
Figura 11. Rota de formação do DPAO ₂ .	36
Figura 11-a Espectro de emissão e excitação do DPA em acetonitrila.	37
Figura 11-b Cromatogramas do padrão de DPA e DPAO ₂	
após fotosensibilização.	37
Figura 12. Rota de síntese do ácido 9,10-antracenil-3-bispropiônico.	39
Figura 13. Síntese do éster 9,10-antracenil-3-bispropionato de etila.	42
Figura 14. Rota de síntese do 9,10-dimetilantraceno.	43
Figura 15. Rota de formação dos endoperóxidos ABPEO ₂ , AABPEO ₂	
e AABPO _{2.}	47
Figura 16. Cromatograma de formação de DPAO ₂ em células	
mononucleares e neutrófilos.	51
Figura 17. Formação de DPAO ₂ por neutrófilos e células mononucleares.	52

mononucleares e neutrófilos	48
Figura 17. Formação de DPAO ₂ por neutrófilos e células mononucleares.	49
Figura 18. Efeito da melatonina na produção de DPAO ₂ por neutrófilos e	
células mononucleares.	52
Figura 19. Formação de DPAO ₂ por monócitos e células mononucleares.	54
Figura 20. Cromatograma de formação de DPAO ₂ por eosinófilos (A), efeito	55
da adição de íons brometo na formação de DPAO ₂ por eosinófilos (B).	
Figura 21. Efeito da melatonina sobre a formação de DPAO ₂ por eosinófilos.	57
Figura 22. Oxidação de DPA por neutrófilos por microscopia confocal.	59
<i>Figura</i> 23. Quimiluminescência do $^{1}O_{2}$ em λ = 1270 em neutrófilos.	61
Figura 24. Quimiluminescência do ${}^{1}O_{2}$ em λ = 1270 em eosinófilos.	62
Figura 25. Rota de síntese do ácido 9,10-antracenil-3-bispropiônico e do	
éster 9,10-antracenil-3-bispropionato de etila.	64
Figura 26. Espectro de massas do DHDMA obtido no modo ESI+.	64
Figura 27. (A) Cromatograma obtido com detecção UV em λ = 260 nm. (B)	
Cromatograma obtido selecionando o íon em m/z = 207 correspondente ao	
DMA. (C) Espectro de massas do DMA obtido no modo APCI+.	65
Figura 28. Espectro de RMN de ¹ H do BBMA em CDCl₃.	67
Figura 29. Espectro de massas do tetrácido obtido no modo ESI	68
Figura 30. Cromatogramas do tetrácido e do AABP obtidos pela	
seleção dos íons no modo ESI- de m/z = 409 e 321	69
Figura 31. Espectro de massas do AABP obtido no modo ESI	69
Figura 32 Análise cromatográfica do ABPE	70
Figura 33.1 Análise cromatográfica dos padrões de AABP, AABPO ₂ e	
AABPEO ₂ .	71
Figura 33.2 Espectros de massas dos padrões de AABP, AABPO ₂ e	
AABPEO ₂ obtido no modo APCI	72
Figura 33.3 Espectro de massa do padrão de ABPE obtido do modo APCI [≁]	73
Figura 34. Ilustração de formação dos endoperóxidos de ABPE no meio	
intracelular.	74
Figura 35.1 Análise cromatográfica da oxidação de AABP, em fagócitos no	

modo negativo.	75
Figura 35.2 Espectros de massas AABP, AABPO ₂ e AABPEO ₂ no modo	
APCI- em fagócitos.	76
Figura 35.3 Análise cromatográfica de ABPE e ABPEO2 por fagócitos no	
modo positivo.	77
Figura 35.4 Espectros de massas do ABPE e ABPEO ₂ em fagócitos.	78
Figura 36. Formação de AABPO ₂ por neutrófilos e células mononucleares	
ativadas por PMA e ZO.	79
Figura 37. Formação de DPAO ₂ e AABPO ₂ por neutrófilos ativados por	
PMA.	81

RESUMO

Neste trabalho avaliamos a formação de oxigênio singlete *in vitro* em fagócitos, (células mononucleares e neutrófilos) isolados de sangue periférico humano, e eosinófilos, de lavado bronco alveolar de camundongos balb/c, ativados por estímulo partículado: zimosan opsonizado contendo o 9,10-difenilantraceno (DPA) adsorvido como sonda captadora de ${}^{1}O_{2}$. Por este método, a formação do ${}^{1}O_{2}$ pode ser verificada pela formação do 9,10-difenilantraceno endoperóxido (DPAO₂), que é detectado por HPLC. Observamos, que os fagócitos formam ${}^{1}O_{2}$ e que esta formação parece ocorrer de forma diferenciada para os dois tipos celulares (neutrófilos e células mononucleares).

Visando ampliar os estudos anteriores sobre o papel da melatonina (MLT) no processo inflamatório, foi testado seu efeito em fagócitos e a relação na produção de ¹O₂ destas células. Observamos que MLT inibe a formação de ¹O₂ totalmente no caso de neutrófilos e parcialmente no caso de células mononucleares e eosinófilos.

Paralelamente, foi desenvolvida a síntese de um novo captador químico de ¹O₂, o éster 9,10-antracenil-3-bispropionato de etila (ABPE), cuja finalidade principal é o acúmulo no interior da célula, depois de sofrer hidrólise enzimática. Esta sonda, terá facil acesso ao interior das células em sua forma ester.

Este novo captador de ¹O₂ foi testado em células mononucleares e neutrófilos estimulados de formas diferentes: via receptor independente e dependente. Os resultados demonstraram produção equivalente de ¹O₂ nestes fagócitos.

ABSTRACT

In this study, we evaluated the singlet oxygen $({}^{1}O_{2})$ formation *in vitro* from phagocytes (neutrophils and mononuclear cells) isolated from human blood cells and eosinophils isolated from bronchoalveolar lavage fluid of mice balb/c activated, by opsonized zymosan.

To determine whether singlet oxygen is produced by phagocytes, zymosan particles were coated with a specific chemical trap for ${}^{1}O_{2}$, 9,10-diphenylanthracene (DPA). The production of ${}^{1}O_{2}$ was followed using HPLC, to measure its product, 9,10-diphenylanthracene endoperoxide (DPAO₂). We also noticed that the ${}^{1}O_{2}$ production occurs at different levels of for two cell types, neutrophils and mononuclear cells.

In order to broaden previous studies on the role of melatonin (MLT) in inflammatory processes, its effect was tested in phagocytes was tested in relation to ${}^{1}O_{2}$ formation by these cells. We observed that MLT inhibits the ${}^{1}O_{2}$ formation totallymt neutrophils and partiallym mononuclear cells and eosinophils.

At the some time, it was also developed the synthesis of a new probe for ${}^{1}O_{2}$, the 9,10-anthracene-bis-3-ethyl-propionate (ABEP), with the purpose to accumulate inside the cells, after its enzymatic hydrolysis. This probe presents easy access to the inferior of the cells in its ester form.

This new probe for trapping ${}^{1}O_{2}$ was tested in mononuclear cells and neutrophils stimulated in two ways: via independent and dependent receptor. The results showed equivalent production of ${}^{1}O_{2}$ for both cell types.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

O sistema imune compreende uma complexa rede de células importantes na manutenção da homeostasia. Estas células, tais como leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos, células NK (natural killer), e células dendríticas, são ativadas quando microorganismos patogênicos conseguem romper as barreiras naturais de proteção.

O papel fagocítico tem sido reconhecido desde 1883, quando Metchinikoff, um zoologista russo, descreveu os grânulos conhecidos como "corpúsculos" brancos encontrados no sangue como sendo neutrófilos, pois não se coravam nem com corantes básicos (basófilos) nem com corantes ácidos, como a eosina (eosinófilos). Ele postulou para estas células, as quais chamou de fagócitos, um papel crucial na defesa do hospedeiro (Babior, 1978; Babior, 2000).

Fagócitos profissionais, dentre os quais neutrófilos, eosinófilos e monócitos/macrófagos constituem uma defesa potente contra muitos patógenos. Devido a sua alta mobilidade, fagócitos são consideradas armas rápidas no policiamento de espaços tissulares. A atividade microbicida está associada ao sistema NADPH oxidase que gera espécies reativas de oxigênio, participando tanto da morte de patógenos como de danos a tecidos do hospedeiro. Além de efeitos deletérios, a participação de espécies reativas de oxigênio tem sido proposta na sinalização de várias vias ativas na inflamação (Khan e Wilson, 1995). Funcionalmente, estas células formam a primeira linha de defesa do hospedeiro contra microorganismos invasores.

Na vigência de um processo inflamatório, fagócitos são atraídos ao foco inflamatório pela liberação de substâncias vasoativas, interleucinas e fatores quimiotáticos do local da lesão para a corrente sanguínea, o que induz o aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade capilar e transmigração de células sanguíneas para a região da lesão (Cotran et al., 1996). Assim, fagocitam

microorganismos, células apoptóticas e tumorais (Remick e Villarete, 1996; Abbas, et al., 2004).

O processo de reconhecimento é mediado por receptores específicos da superfície celular, que reconhecerá complexo formado entre o material estranho e anticorpos ou opsoninas vindas do plasma. Duas classes de receptores são particularmente importantes: receptores de opsonina ($Fc\gamma R$), que reconhecem alvos biológicos recobertos de imunoglobulinas e estímulos opsonizados (zimosan), e receptores de complemento (CR1,2 e 3) (Massol et al., 1998).

Após o reconhecimento de um patógeno, estes são rapidamente envoltos por um vacúolo derivado de uma porção invaginada da membrana plasmática do fagócito. Esse vacúolo se funde com um lisossomo rico em hidrolases formando o fagolisossomo. A etapa final da fagocitose é a destruição e a degradação do patógeno (Contran et al., 1996; Witko-Sarsat et al., 2000). Portanto, a inflamação é fundamentalmente uma resposta de proteção com o objetivo de debelar a causa inicial da agressão celular.

Em resumo, a fagocitose é um processo que envolve três etapas distintas, porém inter-relacionadas: reconhecimento e adesão da partícula a ser ingerida, englobamento da partícula com formação de um vacúolo fagocitário e destruição ou degradação do material ingerido (Moore et al., 1978).

1.2 Sistema Fagocitário: Leucócitos Polimorfonucleares e Mononucleares

As células do sistema mononuclear e polimorfonucleares fagocíticos, assim como todas as células sanguíneas, originam-se na medula óssea a partir de uma célula primordial pluripotente, a *stem cell*, que se diferencia em células progenitoras de linhagens específicas, em resposta a ação de interleucinas específicas presentes no microambiente medular. Uma das vias de diferenciação vai dar origem as células fagocíticas mononucleares.

Na medula óssea o precursor desta linhagem se diferencia em monoblasto, que passará depois a ser pró-monócito, célula esta que se divide ativamente para dar origem ao monócito (Gordon et al., 1986). Depois de um período de maturação na medula, os monócitos são liberados para a circulação sanguínea passando a constituir de 3 a 10% de todos os leucócitos circulantes. O monócito tem uma vida media na circulação de aproximadamente 1 a 3 dias, passando depois aos tecidos onde se transforma em macrófago (Van Furth, 1985; Gordan et al., 1986).

Durante o processo de maturação os macrófagos adquirem um conteúdo importante em vesículas lisossomais, além de microfibrilas e microtúbilos que dão grande mobilidade e promovem a atividade fagocitária. Uma grande gama de enzimas está inclusa nos grânulos lisossomais dos leucócitos, sendo liberadas mediante ativação destas células. Estas enzimas liberadas são capazes de degradar macromoléculas complexas (Wasserman, 1992).

Quando o processo inflamatório se instala, os monócitos migram mais tardiamente que os neutrófilos, onde esta migração celular é mediada por moléculas de adesão da família das selectinas, integrinas e imunoglobulinas que são expressas na superfície dos leucócitos. Estas moléculas de adesão são produzidas em resposta aos mediadores liberados na inflamação, como histamina, leucotrieno B4 (LTB4), fator ativador de plaquetas (PAF) e as citocinas TNF- α , IL-1, IL-8 (Kuna, et al., 1993).

O sistema mononuclear fagocítico participa dos numerosos processos homeostáticos, imunológicos e inflamatórios. Em 1882, Metchnikoff (Metchnikoff, 1905), baseado nos seus estudos de patologia comparada da inflamação, chamou-os de "macrófagos" pela sua capacidade de ingerir grandes partículas. Metchnikoff foi o primeiro a propor que a resistência à infecção dependia do poder fagocítico e digestivo dos leucócitos. Mackaness e Blanden, em 1967 (Mackaness e Blanden, 1967), mostraram que o aumento da resistência no hospedeiro é exercido através dos macrófagos que se tornaram funcionalmente ativados.

Já outra via de diferenciação vai dar origem a linhagem granulocítica, que são os precursores dos PMN segmentados circulantes. O desenvolvimento dos PMN na medula óssea tem sido classicamente dividido em seis estágios: mieloblasto, promielócito, mielócito, metamielócito, bastonete e polimorfonuclear segmentado (Bainton et al.,1971; Bainton, 1995). Os neutrófilos são células do sistema imune que representam a maior população de leucócitos polimorfonucleares na circulação. Os PMN possuem os grânulos azurófilos que

contém toda mieloperoxidase celular, proteínas catiônicas de baixo peso molecular (que podem diretamente incrementar a permeabilidade vascular, liberar histamina, amplificar a fagocitose ou exacerbar a atividade microbicida), hidrolases ácidas e proteases neutras (Dewald e Baggiolini, 1986).



Figura1. Representação de células fagocitárias que participam do processo inflamatório.

1.3 Mieloperoxidase

Leucócitos polimorfonucleares (PMN) são considerados a primeira linha de defesa contra invasão microbiana. A atividade *killing* de neutrófilos se dá devido à produção de EROs e a degranulação enzimática que juntos completam a bateria microbicida desta célula. Dentre as enzimas liberadas está a MPO, que na presença de íons cloreto e peróxido de hidrogênio forma um potente agente microbicida o ácido hipocloroso (HOCI) (Figura 2), que é considerado uma das espécies mais microbicidas formada pelos neutrófilos (Pekoe e Measurement, 1987), justificando a importância da MPO no *killing* de patógenos. A expressão de MPO se dá em células precursoras na medula óssea.

$$H_2O_2 + H^+ + CI^- \xrightarrow{MPO} HOCI + H_2O$$



Figura 2. Formação de HOCI por fagócitos

MPO representa 5% do peso seco de neutrófilos (Pekoe e Measurement, 1987; Klebanoff, 2005) e é o maior constituinte dos grânulos azurófilos citoplasmáticos. Nas células granulocíticas esses grânulos correspondem a grânulos eletrodensos (primários) relativamente grandes vistos ao microscópio eletrônico (O'Brien et al., 1980; Bainton et al., 1971); os grânulos secundários (específicos) são menos eletrodensos e aparecem no estágio de mielócito (O'Brien et al., 1980; Breton-Gorius, 1991; para revisão ver Klebanoff, 2005). Monócitos circulantes contém cerca de um terço do conteúdo de MPO quando comparados a neutrófilos, e esta enzima não está compartimentalizada nesta célula, mas quando monócito se diferencia em macrófago *in vivo* ou *in vitro* este conteúdo é perdido. Recentemente, foi demonstrado que macrófagos recém migrados possuem MPO ativa, estando habilitados a formar HOCI, cloraminas e oxidar substratos. (Rodrigues et al., 2002).

Estudos sugerem que macrófagos podem adquirir atividade peroxidásica via fagocitose de neutrófilos e/ou eosinófilos durante o processo inflamatório (Shepherd et al., 1990; Lefkowitz et al., 1992). A mieloperoxidase é uma heme peroxidase clássica que catalisa a formação do HOCI. Atualmente se reconhece

que MPO pode ter uma participação mais ampla na bioquímica dos neutrófilos e monócitos. Isto inclui funções mais abrangentes, além de sua atividade microbicida, como o seu papel na imunomodulação (Lefkowitz et al., 1992). Trabalhos demostram que HOCI está envolvido na sinalização de apoptose de células do sistema imune (Grisham et al., 1984). Além disto, produtos gerados a partir de HOCI (cloraminas) são capazes de ativar a produção de citocinas.

A eosinofilperoxidase (EPO), enzima encontrada nos grânulos dos eosinófilos, possui uma grande similaridade com MPO e também forma um potente microbicida, o HOBr (Klebanoff, 1991; McCormick et al., 1994; para revisão ver Klebanoff, 2005). Além da formação dos agentes microbicidas citados, foram descritas, para estas enzimas, funções adicionais como no caso da EPO, que poderia atuar como um ativador de macrófagos (Spessolto et al., 1995) e a MPO que pode catalisar a oxidação de uma variedade de compostos (Kettle et al., 1994; Hampton et al., 1998).

O mecanismo de reação da MPO envolve a reação da forma férrica (MP³⁺) com H_2O_2 para formar um intermediário redox - composto I, o qual oxida cloreto para produzir ácido hipocloroso. A oxidação de substratos orgânicos se dá através de duas transferências sucessivas de um elétron envolvendo os intermediários - composto I e composto II. Substratos seqüestrariam o composto I e inibiriam a produção de ácido hipocloroso, a não ser que O_2^- , ou outra molécula do substrato, esteja presente para reciclar a enzima (Hampton et al.,1998). A oxidação de substratos orgânicos pode se dar também pelo envolvimento de MPO composto III (MP²⁺O₂) (Figura 3).

Apesar da MPO catalisar a formação de um importante microbicida, o HOCI, indivíduos deficientes em MPO não apresentam maiores comprometimentos, a não ser uma aparente maior susceptibilidade à infecções fúngicas. Tem sido aventado que o aumento do *burst* oxidativo, aumento da degranulação de grânulos de β -glucuronidase, lisozima e vitamina B₁₂ ligada à proteína e aumento da fagocitose contrabalançariam a deficiência de MPO (Klebanoff et al., 1991). MPO ainda parece ter um papel na nitração de proteínas, peroxidação lipídica (Hazen et al., 1999) e em imunomodulação (Leftowitz et al., 1992).

Além da formação de HOCI, MPO-composto I pode oxidar alguns substratos gerando composto II, que também tem atividade frente alguns substratos regenerando a forma da MPO nativa. Este é o ciclo clássico de uma peroxidase. Desta forma, a MPO é vista como capaz de produzir espécies microbicidas e ao mesmo tempo, via reação do HOCI ou seus derivados, ou ainda através do ciclo peroxidásico clássico, atingir alvos celulares e contribuir com o dano que acompanha o processo inflamatório.



Figura 3. Ciclo Peroxidásico da MPO

1.4 Composto indólico biologicamente importante: Melatonina

Dentre os compostos indólicos biologicamente relevantes está o hormônio produzido pela glândula pineal, melatonina (N¹-acetil-5-metoxitriptamina; MLT), um importante derivado do triptofano (Reiter, 1991; Reiter, 1991; Zhdanova et al., 1997). A glândula pineal é um órgão neuroendócrino que exerce influências regulatórias importantes em animais vertebrados devido à secreção deste hormônio. A concentração de MLT no plasma é baixa durante o dia (1-6pg/mL) e alta à noite (200-300pg/mL), o que define um ciclo diário para MLT (Conn et al., 1997).

MLT é um hormônio altamente lipofílico e pode atravessar a membrana celular. Devido esta característica, a MLT pode modificar diretamente reações que ocorrem no interior das células ou se ligar a receptores presentes na membrana nuclear (Reiter, 1991; Maestroni et al., 1993; Tan et al., 2003). Desta maneira, a presença de receptores em membranas confere uma especificidade de ação para as células que os possuem, além de permitir que a resposta fisiológica ocorra em concentrações muito baixas (Tan et al., 2003).

Este composto indólico possui várias atividades biológicas incluindo um papel chave na sinalização de ritmos biológicos (Kvetnoy et al., 1997). Sítios de ligação de MLT tem sido reportados no sistema nervoso central (SNC) e em vários tecidos periféricos de diferentes espécies, tais como: retina, gônada, fígado, baço, coração, trato gastrointestinal, glândulas mamárias, órgãos linfóides e vários tecidos neoplásicos (Reiter, 1991; Reiter, 1991; Reppert et al., 1994). O efeito de melatonina parece não depender somente da concentração do hormônio, mas também do tempo de exposição do composto aos tecidos e da sensibilidade dos receptores de melatonina, a qual parece variar em função da hora do dia (Reiter, 1991; Zhdanova et al., 1997; Conn et al., 1997; Tan et al., 2003).

Estudos dos possíveis papéis fisiológicos da MLT ainda relatam o seu efeito sobre a pigmentação e termorregulação (fenômeno que não ocorre em mamíferos), sobre a maturação das gônadas (pode ter um papel no controle da reprodução no homem), além de parecer controlar o sono nos seres humanos. (Reiter, 1991; Hardeland et al., 1995; Zhdanova e Wurtmam, 1997). MLT controla várias funções fisiológicas essenciais associadas ao ritmo circadiano e sazonal (Hardeland et al., 1995). Mais do que isto, este composto pode desempenhar funções estratégicas.

Estudos realizados apontam para o possível papel desse hormônio como scavenger de radicais livres endógenos (Reiter et al., 2000; Cuzzocrea et al., 2001) e atuação sobre a resposta imunológica e inflamatória, (Maestroni et al., 1993; Hardeland et al., 1995; Reiter et al., 1999), porém muitos dos seus efeitos não estão ainda esclarecidos.

Além disto, MLT pode ser oxidada pela indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), enzima envolvida na metabolização de indóis, presente em monócitos e neutrófilos e fortemente induzida por interferon- γ (Angeli et al., 1988).

1.4.1 Melatonina nas respostas imunológica e inflamatória

Nos últimos tempos, vários trabalhos têm mostrado que MLT possui propriedades imunomodulatórias (Calvo et al., 1995). A síntese de MLT foi descrita em células do sistema imune (Finocchiaro et al. 1991; Carrilo-Vico et al., 2004). Portanto, este composto poderia ter uma participação no cenário de ativação e desativação de fagócitos.

O fato que suporta o papel da MLT na imunoregulação é a presença de receptores para este hormônio em linfócitos T (Calvo et al., 1995), neutrófilos (Lopez-Gonzalez et al., 1993) e monócitos (Barjavel et al., 1998). Foi descrito que, em alguns modelos de inflamação, ela diminui o edema, a migração de neutrófilos, o volume de exsudato (Antolin et al., 1996; Cuzzocrea et al., 1997; Constatino et al., 1998; Jaworek et al., 2003).

Em monócitos, a MLT induz a secreção de IL-1, IL-2 e IL-6 (Garcia-Maurino et al., 1998), ativa a formação de intermediários reativos de oxigênio e a citotoxicidade contra células tumorais (Barjavel et al., 1998; Morrey et al., 1994). Já em neutrófilos que produzem as enzimas óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e ciclooxigenase induzida (COX2) (Cotran et al., 1996; Haslett et al., 1997) no processo inflamatório, a MLT é capaz de reduzir a síntese destas enzimas e de seus produtos em diferentes modelos experimentais (Cuzzocrea et al., 2001; Tan et al., 2003). O efeito inibidor da MLT está diretamente relacionado à sua capacidade de bloquear a ativação do fator nuclear Kappa B (NF κ B), que é o caminho na indução de iNOS e COX2 em processos inflamatórios (Haslett, 1997).

Sítios de ligação para MLT são mais abundantes em células CD4⁺ do que CD8⁺, sugerindo que os linfócitos CD4⁺ são as células mais responsivas a MLT na subpopulação linfocitária. Nessas células a MLT estimula a produção de interleucina-2 (IL-2) e interferon gama (IFN_γ). Porém, a administração de IL-2 inibe

a produção de MLT pela glândula pineal, indicando um sistema de retroalimentação negativo (Maestroni et al., 1995).

MLT é um bom doador de elétrons e reage eficientemente com radical hidroxila (Matuszak et al., 1997), peroxinitrito, (Zhang et al., 1998; Zhang et al., 1999), ácido hipocloroso e oxigênio singlete (Zhang et al., 1999; Tan et al., 2000; Reiter et al., 2001). MLT tem se mostrado eficiente em inibir o dano celular induzido por oxigênio singlete durante o processo de isquemia e reperfusão (Sewerynek et al., 1996).

Foi sugerida que a atividade imunoregulatória de MLT ainda poderia estar associada a sua atividade antioxidante (Antolin et al., 1996; Tan et al., 2000). Vários trabalhos também relatam a ação de MLT sobre o retardo do envelhecimento, como agente protetor contra a toxicidade de drogas antitumorais, lesões geradas por reperfusão após isquemia e proteção contra úlcera gástrica além de diminuir o estresse oxidativo no sistema nervoso central (Tan et al., 2000; Cuzzocrea et al., 2001; Vijayalaxmi et al., 2002). Este hormônio ainda estimula a expressão gênica das enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase e glutationa peroxidase. (Antolin et al., 1996; Rodriguez et al., 2004).

MLT é também substrato da MPO. Assim, é oxidada ao seu análogo do tipo quinurenina (AFMK e AMK) por neutrófilos ativados numa reação que requer MPO e ERO. Estudos recentes apontam para a possibilidade de que a ação destes compostos possa ser mais intensa do que a própria MLT (Kelly e Amato 1984; Tan et al., 2001; Ressmeyer et al., 2003).

1.5 Quimiluminescência e burst oxidativo

Os átomos e moléculas absorvem diferentes radiações resultando em transições energéticas de vários tipos, dependente do comprimento de onda da radiação. Radiação com comprimento de onda na região do visível ou ultravioleta geram estados eletronicamente excitados em moléculas, os quais são instáveis e devem desativar-se voltando ao estado fundamental.

Quimiluminescência é o fenômeno onde ocorre a formação de estados eletronicamente excitados através de uma reação química e pode ser observada quando o estado excitado decai para o estado fundamental emitindo luz. Se a reação ocorrer em um organismo vivo, ou for derivado de um, receberá o nome de bioluminescência.

Todas as reações bioluminescentes conhecidas e a maioria das reações quimiluminescentes são direta ou indiretamente resultado de oxidações envolvendo oxigênio molecular ou alguns dos seus derivados como H_2O_2 , O_2^- , $^{\circ}OH$, $^{1}O_2$, entre outros. Para muitas destas reações tem sido proposto o envolvimento de intermediários peroxídicos lineares ou cíclicos (anéis 1,2-dioxetânicos), os quais são conhecidos pela sua capacidade de gerar estados excitados após clivagem térmica (Hasting, 1976).

As condições essenciais para a ocorrência de uma reação quimiluminescente são:

a) a reação deve ser exotérmica e deve gerar energia suficiente para permitir a formação de um estado eletronicamente excitado;

b) deve existir um caminho de reação pelo qual essa energia possa ser canalizada para a formação de um estado eletronicamente excitado;

c) este deve ser capaz de perder energia na forma de um fóton ou então ser capaz de transferir energia para uma molécula capaz de emitir luz;

Quimiluminescência de ultra-baixa intensidade foi demonstrada pela primeira vez em 1961 por Tarusov em fígado de rato (Campbell, 1988). Uma atenção especial tem sido dada a quimiluminescência nativa que acompanha a ativação de fagócitos (neutrófilos, eosinófilos e monócitos/macrófagos). Esta quimiluminescência é decorrente de uma reação de oxigenação específica, que possibilita a formação de ânion superóxido (O_2^-), através do sistema NADPH oxidase que catalisa a produção de O_2^- através da redução unieletrônica do O_2 molecular, utilizando o NADPH como doador de elétrons.

NADPH + $2O_2 \rightarrow 2O_2^{-} + NADP^+ + H^+$

A partir de O_2^- poderão ser formadas outras ERO por diferentes meios, tais como: redução de O_2^- a peróxido de hidrogênio (Segal, 1988; Hampton et al., 1998) via ação enzimática da superóxido dismutase (SOD) ou dismutação espontânea.

$$O_2 \longrightarrow O_2 \xrightarrow{e^- + 2H^+} H_2O_2 \xrightarrow{e^- + H^+} H_2O_2 \xrightarrow{e^- + H^+} H_2O_2$$

 $2O_2^{-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$

Ocorre também a formação de peroxinitrito (ONOO⁻) pela reação de O₂⁻ com óxido nítrico (NO) e produtos halogenados como hipoclorito (OCI⁻) via ação enzimática da MPO. Cloraminas (R-NHCI) podem ser geradas pela reação de HOCI com compostos contendo nitrogênio.

NO[•] + O₂^{•−} → ONOO[−]

HOCI + $2NH_2 \rightarrow RNHCI + H_2O$

Existem dois mecanismos para a produção de radical hidroxila (OH) por fagócitos: reação de Fenton, onde H_2O_2 reage com íons metálicos, como íons ferro ou através da reação de HOCI mais O_2^- .

$$O_2^{\cdot-} + M^{n+1} \rightarrow M^n + O_2$$

$$M^n + H_2O_2 \rightarrow M^{n+1} + OH^- + HO^-$$

$$O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow OH^- + HO^- + O_2$$

Reação de Fenton

$$HOCI + O_2^{--} \longrightarrow HO^{-} + CI^{-} + O_2$$

Reação do HOCI

Oxigênio singlete ($^{1}O_{2}$) pode ser produzido pela reação de H₂O₂ com o HOCI intermediado por MPO, todas com ação microbicida (Figura 4).

$$H_2O_2 + H^+ + C\Gamma \xrightarrow{MPO} HOCI + H_2O$$
$$OC\Gamma + H_2O_2 \xrightarrow{} ^1O_2 + C\Gamma + H_2O$$

Este processo é conhecido como *burst* respiratório ou oxidativo e é precedido do reconhecimento do agente invasor e organização, na membrana plasmática, de um sistema complexo denominado NADPH oxidase (Figura 5).



Figura 4. Via de formação de espécies microbicidas

Este sistema enzimático é formado por componentes que se encontram dispersos na célula em repouso. Estes componentes são o $p40^{phox}$, a $p47^{phox}$ e a $p67^{phox}$ agrupadas em um complexo protéico citoplasmático. Também há o citocromo b₅₅₈, composto pelas proteínas $p22^{phox}$ e $gp91^{phox}$, localizadas nas membranas das vesículas secretórias e dos grânulos específicos do citosol. Há ainda outras proteínas de baixo peso molecular, ligantes de nucleotídeo guanina: a Rac1 e 2 e Rap1a, que também participam do processo (Babier, 2002; Bokoch e Knaus, 2003; Roos et al., 2003).

A ativação do sistema NADPH oxidase se inicia pela fosforilação do componente citosólico p47^{phox}, resultando na migração de todas as proteínas citosólicas para a membrana plasmática. Essas proteínas, uma vez na membrana, se associam ao citocromo b₅₅₈ que migrou para a mesma através da fusão das vesículas secretórias e dos grânulos específicos. A Rac1 e 2 liga-se simultaneamente ao trifosfato de guanina (GTP) e migra para a membrana juntamente com o complexo citosólico (Figura 5).



Figura 5. Organização do sistema NADPH oxidase quando fagócitos são estimulados

O sistema NADPH oxidase, uma vez ativo, é responsável pela transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio molecular, formando ânion

superóxido (Babier,1999; Babier, 2000; Babier, 2002). Além da transferência de elétrons, o sistema multienzimático é responsável pela passagem de íons H^+ e outros cátions, especialmente K^+ , para o interior do fagolisossoma (Reeves et al., 2002).

Os produtos da redução de oxigênio podem levar a oxigenação de substratos biológicos, levando a formação de estados eletronicamente excitados e conseqüentemente, originar a baixa emissão de luz observada nestes processos (Allen, 1984). Esta quimiluminescência nativa tem sido aplicada como uma técnica para o estudo das funções fagocíticas e diagnóstico de algumas doenças.

O envolvimento do ${}^{1}O_{2}$ no *burst* respiratório de neutrófilos foi sugerido há muito tempo, baseado na emissão de luz por PMN durante a fagocitose (Allen, 1975) e no fato de que bactérias ricas em carotenóides eram resistentes ao *killing* por PMN (Klebanoff, 1970).

A introdução de um substrato quimiluminescente a um sistema teste de fagócitos aumenta em várias ordens de grandeza o rendimento de luminescência facilitando a monitoração da atividade de oxigenação destas células. As características de reação do substrato quimiluminescente também definem a natureza do agente oxidante a ser avaliado.

O acompanhamento do *burst* pode oferecer importantes dados relativos à produção das espécies microbicidas. O comprometimento de alguns dos passos que levam à produção do O_2^- ou a degranulação, pode levar à diminuição da eficiência microbicida de células fagocíticas.

No *burst* respiratório, a ativação da proteína C quinase fosforila a proteína p47^{pHox} e leva à organização do sistema NADPH oxidase. Em neutrófilos não ativados, a maior parte do citocromo b₅₅₈ está localizada dentro de grânulos específicos e pouco associada à membrana plasmática (Borregaard e Tauber, 1984; Ohno et al., 1985). Os estímulos comumente utilizados ativam os PMN e monócitos por diferentes caminhos. PMA atua diretamente sobre a proteína C quinase, enquanto os estímulos opsonizados (zimosan) (dependem da expressão de receptores de opsonina) atuam via fosfolipase, suprindo os diglicerídeos que ativarão a proteína C quinase (Henderson et al., 1993; Inoue et al., 1994). Assim,

ambas as atividades, dependentes e independentes de receptores de opsonina, podem ser avaliadas através da utilização, respectivamente, de estímulos opsonizados e de ésteres de forbol (Figura 6).



Figura 6. Vias de estimulação para a produção de ânion superóxido por fagócitos

1.6 Oxigênio singlete em processos biológicos: sinalização celular

Dentre as espécies ativas de oxigênio capazes de danos aos sistemas vivos destaca-se o ¹O₂. Esta espécie é um potente oxidante frente a compostos contendo alta densidade eletrônica.

As moléculas alvo *in vivo* incluem proteínas, ácidos nucléicos, além de sistemas organizados como membranas. Tais reações levam, via de regra, a produtos oxidados que perdem suas propriedades gerando disfunções. Entretanto, sob o ponto de vista de fotobiologia no escuro, sistemas enzimáticos que geram ¹O₂ tem grande importância, visto que estes poderiam estar atuando como um possível sinalizador celular no caminho que culmina com a modulação da expressão gênica, com funções importantes para a manutenção do sistema celular, além de outras funções na cadeia de produção de ERO.

Uma nova área da biologia vem dando um enfoque sobre o papel de ${}^{1}O_{2}$ como mensageiro intracelular. Foi demonstrada a formação intracelular de ${}^{1}O_{2}$ durante o processo de fagocitose (Steinbeck et al., 1991; Steinbeck et al., 1993).

Foi observado que muitos outros eventos celulares dependem da formação de ${}^{1}O_{2}$ como a participação da ativação do fator de transcrição NF- κ B (Ryter e Tyrell, 1998). NF- κ B é um complexo protéico que ativa a transcrição dos genes de citocinas em diversos tipos celulares envolvidos na inflamação e infecção em resposta a vários estímulos como choque térmico por calor, vírus, IL-1, TNF, PMA, luz UV, H₂O₂, inibidores de proteína quinase e fosfatases (Baeuerle e Henklet, 1994; Khan e Wilson, 1995; para revisão ver Klotz, 2002).

Alguns desses estímulos agem por ligação a receptores específicos presentes na superfície celular, cujo caminho comum é a liberação da porção inibitória $I\kappa B$, ligada ao NF- κB inativo no citoplasma. Quando o NF- κB é transcolado para núcleo onde se liga aos elementos controles do DNA, induz a síntese de mRNA e consequentemente a expressão de genes (Baeuerle e Baltimore, 1988; Brown e Ogryslo, 1995; Khan e Wilson, 1995).

Foi demonstrado que ${}^{1}O_{2}$ gerado por radiação UVA e terapia fotodinâmica (PDT) é capaz de ativar as MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos), através das porções JNK (c-Jun-N-terminal quinase) e p38 (Schereck, 1992; para revisão ver Klotz, 2002), ativando o fator de transcrição AP-1 (proteína-1 de ativação). Na PDT a conseqüência biológica é a indução de necrose e apoptose celular de carcinoma epidérmico (Chan et al., 2000).

A ativação da AP-1 por ${}^{1}O_{2}$ implica na ativação da secreção de IL-8 e TNF- α . Este último exerce múltiplos mecanismos de atuação biológicas que não são totalmente bem defenidos , mas sabe-se que sua atividade anti-tumoricida parece ser decorrente da ativação de neutrófilos (Mattehews, 1987).

TNF-α aumenta a atividade fagocitária de granulócitos, a indução da liberação de enzimas lisossomais e a estimulação da produção de ânion superóxido (Klebanoff, 1991), em mononucleares estímula a secreção de IL-1 e IL-6 na circulação (Baggiolini, 1997).

A ativação do AP-1 também induz a expressão gênica da síntese da hemeoxigenase (HO-1), uma enzima de regulação da via de degradação do heme. Essa enzima pode ser induzida *in vivo* e *in vitro* por diversos fatores e, em fibroblastos de pele humana ela pode ser induzida pela radiação UVA. Neste caso foi mostrado que o ${}^{1}O_{2}$ é o efetor primário da indução pela análise dos níveis de mRNA dessa enzima (Basu-Modak e Tyrell, 1993; Klotz et al., 1997; Klotz et al., 1999).

A modulação da AP-2 (proteína-2 de ativação) por ${}^{1}O_{2}$ está descrita na literatura onde a ativação está envolvida na transcrição da matriz metaloproteinase-1(MMP-1) responsável pela manutenção da integridade da matriz extracelular da pele. Embora tenha sido mostrado que o ${}^{1}O_{2}$ está envolvido nesse processo, o mecanismo não está bem elucidado, e sua participação na cascata de sinalização pode ser mais complexa. Neste sentido, a participação de ${}^{1}O_{2}$ foi mostrada em eventos iniciais na membrana celular que precedem a indução de interleucinas IL-1 e IL-6 (Wlaschek et al., 1997; para revisão ver Klotz, 2002).

O fator de transcrição AP-2 também está envolvido com a morfogênese em vertebrados, em particular na diferenciação e desenvolvimento de queratinócitos na epiderme, está envolvido na indução da síntese da molécula de adesão intracelular (ICAM-1). Este processo é mediado por ${}^{1}O_{2}$ em queratinócitos humanos, além disso, foi proposto que o mecanismo desse processo envolve a geração não enzimática de ceramida a partir de esfingomielina que causa a ativação de AP-2 (Grether-Beck et al., 1996; Grether-Beck et al., 2000) (Figura 7).



Figura 7. Esquema dos efeitos do oxigênio singlete na modulação da expressão gênica (Klotz 2002).

1.6.1 Identidade de oxigênio singlete

A configuração eletrônica de oxigênio molecular no seu estado fundamental triplete (${}^{3}\Sigma_{g}$) prevê um caráter biradicalar visto que seu par de elétrons do HOMO, que ocupam dois orbitais π^{*} degenerados (orbitais diferentes com a mesma energia), apresentam spins paralelos. Esta característica conferiria ao oxigênio uma alta reatividade, entretanto, sua redução direta por dois elétrons com spins antiparalelos é proibida pela regra de conservação de spin, tornando-o relativamente inerte (Khan e Wilson, 1995).

O oxigênio eletronicamente excitado pode apresentar-se em dois estados distintos, ${}^{1}\Delta_{g}$ e o ${}^{1}\Sigma_{g}{}^{+}$, tendo a primeira energia 22 Kcal/mol acima do estado fundamental e vida-media alta (2 a 4 µs em água) e o segundo tendo energia de 37,5 Kcal/mol acima do estado fundamental e vida-média muito menor, decaindo rapidamente para o estado ${}^{1}\Delta_{g}$ (Figura 1.1). No primeiro e segundo estado
eletronicamente excitado estes elétrons apresentam spins antiparalelos (Foote e Clennan, 1995; Di Mascio et al., 1995).

Estado		Ocupação	Energia	tempos de
		$\pi_{x} \pi_{y}$	(kcal/mol)	vida (s)
Fundamental	$^{3}\Sigma_{g}^{-}$	\uparrow \uparrow		
Primeiro	$^{1}\Delta_{g}$	↑↓	22,5	10 ⁻⁶
Segundo	$^{1}\Sigma_{g}^{+}$	$\uparrow \downarrow$	37,5	10 ⁻¹¹

Figura 8. Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares (π *) do oxigênio no estado excitado singlete (${}^{1}\Delta_{g}^{+}$, ${}^{1}\Sigma_{g}$) e no estado fundamental triplete (${}^{3}\Sigma_{g}^{-}$).

1.6.2 Luminescência do oxigênio singlete

Sendo o ${}^{1}O_{2}$ uma molécula no estado eletrônico excitado, o decaimento para o estado fundamental pode ser acompanhado de emissão de luz. Essa luminescência é extremamente fraca e o rendimento quântico de luminescência, ou seja, a fração de molécula de ${}^{1}O_{2}$ que emitem luz ao invés de decair não radiativamente por desativação pelo solvente, varia em torno de 10^{-6} a 10^{-3} (Foote e Clennan, 1995).

Alguns grupos independentemente começaram a observar, a geração do ${}^{1}O_{2}$ em sistemas químicos, através da luminescência na região do vermelho do espectro visível que acompanhava a decomposição de H₂O₂ na presença de hipoclorito (OCI⁻). Em 1962, foi sugerido, por Stauff e Schmidkunz, que uma emissão em 634nm, poderia ser interpretada como sendo a transição simultânea de duas moléculas de oxigênio no estado excitado singlete (${}^{1}\Delta_{g}$) para o estado fundamental triplete (${}^{3}\Sigma_{g}^{-}$) (Khan, 1976.)

O espectro de emissão do ¹O₂ mostra duas linhas características principais mostradas abaixo:

(a)
$$O_2 ({}^{1}\Delta_g)v_{=0} \rightarrow O_2 ({}^{3}\Sigma_g)v_{=0} + h\nu (\lambda_{em} = 1268 \text{ nm})$$

(b)
$$O_2(^{1}\Delta_g)v_{=0} + O_2(^{1}\Delta_g)v_{=0} \rightarrow 2O_2(^{3}\Sigma_g)v_{=0} + h\nu \ (\lambda_{em} = 634 \text{ nm})$$

Enquanto a emissão tipo (b) bimolecular é passível de medição com fotomultiplicadoras convencionais, sua baixa probabilidade dificulta tal tarefa. A emissão tipo (a) transição monomolecular do ${}^{1}O_{2}$ ocorre na região do infravermelho e foi mostrada por Browne e Ogryzlo (1964) e pode ser medida diretamente com detectores específicos dos estados sólidos, sensíveis para a região do infravermelho, como o fotodiodos de germânio, e fotomultiplicadoras. A intensidade da emissão é diretamente proporcional a concentração do ${}^{1}O_{2}$. (Frimer, 1985).

1.6.3 Geração, reatividade e detecção do oxigênio singlete

Em geral, as reações químicas do ${}^{1}O_{2}$ com compostos insaturados levam à formação de hidroperóxidos alílicos, dioxetanos e endoperóxidos. Nessas reações o ${}^{1}O_{2}$ se comporta como um reagente eletrofílico e o padrão de reatividade é semelhante aquele exibido por etileno com substituintes eletronegativos (Foote e Clennan, 1995).

A reatividade do ${}^{1}O_{2}$ frente a diferentes compostos, permite detectá-lo fazendo uso de captadores químicos, cujo produto de reação possa ser facilmente detectado em baixas concentrações. Um captador químico, para ser eficiente depende principalmente da sua reatividade com ${}^{1}O_{2}$ e a sua solubilidade no solvente de interesse. A reatividade de uma substância em relação ao ${}^{1}O_{2}$ também pode ser expressa por seu valor β , que é a concentração na qual 50% do ${}^{1}O_{2}$ disponível será capturado (McCall, 1984).

Os captadores mais utilizados, por muito tempo, foram os derivados do furano (Kreitner et al., 1996). Estes compostos são oxidados a produtos dicarbonílicos presumidamente via reação Diels-Alder para formar ozonida como intermediário. Embora estes compostos sejam altamente reativos com ¹O₂, eles apresentam a desvantagem de reagir com outros oxidantes gerando os mesmos produtos observados pela reação com ¹O₂ (McCall, 1984).

Outra substância muito usada é colesterol, pois o produto da reação tipo "ene", o 5- α -hidroperóxido do colesterol, é considerado uma "impressão digital" do ¹O₂. Apesar de ser um método químico específico para detecção de ¹O₂ desenvolvido por Kulig e Smith em 1973, é um método muito pouco sensível (Foote, 1988). Suas limitações são a baixa reatividade (Foote, 1988) e uma certa instabilidade do produto que pode sofrer rearranjo para uma mistura de 7- α -hidroperóxidos sob certas condições (Foote e Clennan, 1995).

Considerando as propriedades de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, estes podem ser usados como sequestradores de ${}^{1}O_{2}$, uma vez que formam endoperóxidos à temperatura ambiente e sua decomposição ocorre somente em temperaturas razoavelmente elevadas (acima de 100° C). Uma das limitações dessas substâncias é a sua baixa solubilidade em água. Porém, este problema pode ser contornado com modificações na estrutura, adicionando-se grupos que os tornem mais hidrofílicos. A introdução de grupos carboxilas é uma opção interessante e foi usada na obtenção de um derivado hidrofílico do antraceno e do rubreno (Aubry et al., 1981).

Além disso, o produto formado da reação do captador com ${}^{1}O_{2}$ deve ser único em relação a este oxidante; produtos de oxidação do captador com outros oxidantes podem ser tolerados, desde que não gerem o mesmo produto formado pelo ${}^{1}O_{2}$, o captador e seu produto de oxidação devem ser estáveis para permitir o isolamento para caracterização e detecção em quantidades pequenas.

Modelos interessantes para uso como captador de ${}^{1}O_{2}$, são derivados de antraceno com substituintes hidrossolúveis, pois de acordo com o tipo e a posição dos substituintes no anel, a solubilidade, estabilidade e a reatividade podem ser modificadas. O sulfato mono-{2-[10-(2-sulfoxi-etil)-antracen-9-il]-etil} éster de sódio (EAS), derivado de antraceno, pode ser preparado a partir do 9,10-dibromoantraceno. Esse composto possui as características mencionadas anteriormente: reage com ${}^{1}O_{2}$ para formar o endoperóxido correspondente, EASO₂ (Figura 9), sua solubilidade independe do pH e é maior que o valor β para todos os valores de pH, possui alta estabilidade (até 120°C) e pode ser facilmente

detectado por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (McCall, 1984; Di Mascio e Sies, 1989).



Figura 9. Reação de um derivado de antraceno EAS com ¹O₂ gerando o respectivo endoperóxido EASO₂.

Um inconveniente dos derivados de antraceno é que eles absorvem luz na faixa do visível e podem agir como fotossensibilizadores e provocar sua autooxidação.

1.6.4 Derivados antracênicos

Para modificar os substituintes do antraceno, algumas características são importantes e devem ser consideradas. Os substituintes do antraceno devem ser insensíveis ao ${}^{1}O_{2}$ e ao fotossensibilizador ou as fontes químicas de ${}^{1}O_{2}$ necessárias para preparar o endoperóxido correspondente.

O antraceno em si não reage com ao ${}^{1}O_{2}$ e a ligação direta de grupos atraentes de elétrons no anel aromático diminuiria sua reatividade. Sendo assim, pelo menos um ou, preferencialmente, dois grupos doadores de elétrons devem estar presentes nas posições 9,10 do anel para permitir a cicloadiçao [4+2] e estabilizar o endoperóxido. Assim, os grupos metil do 9,10-dimetilantraceno oferecem uma posição adequada para entrada de substituintes, uma vez que a cadeia alquílica possibilita uma boa separação entre o grupo hidrofílico e o anel antracênico (Pierlot et al., 2000).

1.6.5 Fotossensibilização

 $^{1}O_{2}$ como do intermediário 0 envolvimento em reações de fotossensibilização foi sugerido, primeiro em 1939, por Kautsky. Ele demonstrou que a excitação de um sensibilizador adsorvido em sílica-gel provocava a oxidação de um substrato adsorvido em uma outra porção de partículas de sílicagel fisicamente separada daquela contendo o sensibilizador. Sugeriu ainda que a extinção da fluorescência do sensibilizador era resultado da transferência de energia para as moléculas de oxigênio e produção de oxigênio ativado. O autor chegou a conclusão considerando que a maioria dos sensibilizadores apresenta uma pequena energia de fluorescência, portanto, somente estados metaestáveis de vida longa do oxigênio, como ${}^{1}\Sigma_{g}^{+}$ e ${}^{1}\Delta_{g}$, poderiam ser formados.

Foi demonstrado que produtos gerados na presença de H_2O_2 e OCI⁻ eram os mesmos produtos obtidos quando era feita a fotossensibilização (Foote e Wexler 1964a e 1964b). Também , Corey e Taylor (1964) mostraram que espécies excitadas de oxigênio geradas por uma descarga de rádio-freqüência ou fotossensibilização reagiram com antracenos substituídos e olefinas formando os mesmos produtos.

O processo de fotossensibilização ocorre quando o sensibilizador, luz de comprimento de onda apropriado e oxigênio estão presentes simultaneamente (Kochevar e Redmond, 2000). Primeiramente, ocorre a excitação eletrônica do sensibilizador ao estado excitado singlete (¹sens*) pela energia luminosa e, na maioria dos casos, por um processo conhecido como cruzamento intersistemas, o sensibilizador é levado ao estado excitado triplete (³sens*), o qual tem uma duração maior que o ¹sens*. Dessa forma, os sensibilizadores mais eficientes são aqueles que possuem um ³sens* de longa duração e alto rendimento quântico.

O ³sens^{*} poderão seguir dois caminhos possíveis: a via que leva ao mecanismo tipo I, onde há transferência de elétron entre os componentes do sistema. Esse processo gera íons radicais que podem reagir com O₂ (${}^{3}\Sigma_{g}$) resultando em produtos oxidados (Figura 10). Já o mecanismo tipo II ocorre transferência de energia do 3 sens^{*} para o O₂ (${}^{3}\Sigma_{g}$), gerando ${}^{1}O_{2}$ (Figura 10). Esses

mecanismos podem ocorrer simultaneamente e a razão entre eles é altamente influenciada pelo sensibilizador, substrato e concentração de oxigênio (Foote, 1991).



Figura 10. Esquema de fotosensibilização mostrando os mecanismos tipo I e II. (S = substrato, ISC = cruzamento intersistema, sens = sensibilizador).

Reações de fotossensibilização, geralmente envolvendo ¹O₂, são importantes em diversas situações biológicas como em cloroplastos que contém clorofilas e alta concentração de oxigênio, ou em células da retina que possuem retinal e podem estar expostas as altas intensidades luz por um período prolongado. Nessas células, as clorofilas ou o retinal podem sofrer sensibilização e formar ¹O₂. Esse processo pode provocar a destruição desses compostos e danos aos lipídeos ao redor. Existem ainda situações patológicas em que as reações de fotossensibilização podem ocorrer, como em alguns tipos de porfirias, doenças causadas por defeitos na biossíntese do grupo heme que provoca o acúmulo de porfirinas na pele. Nesse caso, a exposição à luz pode causar danos devido à geração excessiva de ¹O₂ (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Outro exemplo é a terapia fotodinâmica usada para tratamento de tumores, a qual envolve a administração de um agente fotossensibilizador seguida pela ativação do agente pela luz de um comprimento de onda específico. Esta terapia envolvendo oxigênio molecular forma produtos de oxidação que podem ser prejudiciais às funções celulares e, desta forma, podem causar um dano irreversível ao tumor, levando à sua destruição (Doughert et al., 1998).

2. OBJETIVO

O estudo sobre o papel do ${}^{1}O_{2}$ em sistemas biológicos é importante tendo em vista suas características intrínsecas: apresenta alta reatividade frente a diferentes compostos orgânicos, sendo capaz de agir em diferentes compartimentos celulares com os mais variados ambientes químicos levando a respostas particulares frente a cada situação.

O principal foco deste trabalho foi avaliar se neutrófilos e células mononucleares geram ${}^{1}O_{2}$ e em quais condições.

Objetivos específicos:

- Estabelecer metodologia para acompanhar a formação de ¹O₂ por fagócitos humanos e de animais de experimentação. Para isso avaliamos três possibilidades:
- Verificar a quimiluminescência direta do ¹O₂ através do uso de equipamento ultrasensível para detecção de sua emissão na região do infravermelho.
- Dosar o 9,10-difenilantraceno endoperóxido (DPAO₂) formado pela oxidação do 9,10-difenilantraceno (DPA), um captador químico de ¹O₂.
- Obter imagens por microscopia confocal no acompanhamento da oxidação do DPA por ¹O₂ através do decréscimo da fluorescência deste antraceno.
 - 2. Definir padrões diferenciados de produção de ¹O₂ por diferentes tipos celulares.
- Comparar quantitativamente a produção de ¹O₂ por neutrófilos e células mononucleares de sangue periférico humano.
 - Avaliar o efeito do hormônio MLT, um conhecido imunomodulador, sobre a produção de ¹O₂.
 - Desenvolver um novo captador químico de ¹O₂, capaz de atuar como sonda lipofílica, susceptível a hidrólise enzimática, produzindo seu acúmulo no interior da célula.
- Síntetizar o éster 9,10-antracenil-3-bispropionato de etila (ABPE).
- Estabelecer as condições necessárias para sua utilização em fagócitos humanos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Células de sangue periférico humano

Neutrófilos (Polimorfonucleares) e células mononucleares de sangue periférico (PBMC) são obtidas a partir do isolamento de sangue periférico de doadores voluntários aparentemente saudáveis, recrutados entre os professores, funcionários e alunos do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (Comissão de Ética- Processo: 156).

Animais

Camundongos (Balb/c) com 4-8 semanas de idade, mantidos em condições livres de patógenos (Comissão de Ética- Processo: 156), foram fornecidos pelo biotério de camundongos isogênicos do Departamento de Imunologia, ICB-USP.

3.1.1 Reagentes

Todos os reagentes a seguir são de grau analítico.

<u>Millipore</u>: unidade filtrante gv millex em polietileno 0,22 U por 13mm, água utilizada foi deionizada em equipamento MilliQ[®].

<u>Merck</u> (Rio de Janeiro, Brasil): tetracloreto de carbono, tetrahidrofurano (THF), benzeno, ácido fosfórico, tolueno, ácido sulfúrico, acetona, azul de metileno, ácido fórmico, iodo, acetato de etila. (Darmstadt, Alemanha): etanol absoluto, éter etílico, éter dietílico, clorofórmio, metanol, ácido clorídrico, hipoclorito de sódio, sódio metálico, hexano, sílica gel para cromatografia em coluna aberta (63-200µm), placas de sílica para cromatografia em camada delgada (0,2 mm, com marcador de fluorescência em 254 nm), acetonitrila e metanol para cromatografia, azida sódica, fosfato de sódio, fosfato diácido de potássio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, cloreto de sódio, cloreto de amônio, metanol, líquido de Turk, sulfato de cobre, glicerina, antraquinona, ácido acético glacial, peróxido de hidrogênio, hidróxido de alumínio.

<u>Sigma</u> (Missouri, Estados Unidos): bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, cloreto de potássio, cloreto de sódio, dodecil sulfato de sódio, EDTA, formiato de amônio, bromo,raspas de magnésio, fosfato de sódio dibásico, hidróxido de sódio, isopropanol, sulfato de magnésio anidro, sulfato de sódio anidro, glicose, MLT, (EC 1.11.1.6, de fígado bovino), azul de trypan, dimetil sulfóxido (DMSO), acetato de forbol miristato (PMA), histopaque (d=1,077), dextran, HRP (EC1.11.1.7: tipo IV), ketamina, dimetil sulfóxido (DMSO), zimosan, eosina, azul de metileno segundo May Grunwlad-Giemsa (MGG), ovoalbumina (OVA) Grau II – Sigma Co, St Louis, USA)

Roche heparina

<u>Aldrich</u> (Wisconsin, Estados Unidos): éster malônico, trietilamina, água deuterada (99.9 %), clorofórmio deuterado (100 %), tubos para NMR (standard e gold).

<u>Supelco</u> (Estados Unidos): colunas para HPLC Supelcosil, LC-18 (250 x 4,6 mm e 150 x 4,6 mm e 250 x 2,1 mm; tamanho de partícula 5 µm).

<u>Phenomenex</u> (Califórnia, Estados Unidos): LC-18 Synergi (250 x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 μm).

<u>Hamilton</u> (Nevada, Estados Unidos): seringas para injeção manual em sistema de HPLC de 25, 50, 250 e 500 μL.

3.2 Equipamentos

_ Agitador *Thermomixer Confort* da *Eppendorf* (Hamburgo, Alemanha) modelo 5355.

_ Autoclave vertical da Fanem (Brasil) modelo 415.

_ Balanças da *Denver Instrument Company* (Estados Unidos) modelos XE-310 e AA-200.

_ Balança Analítica AG 204 Mettler Toledo

_ Banho-maria 37⁰ C com Agitador orbital – Gyratory Water Bath Shaker

modelo G76

_ Banho-maria 37⁰ C Lauda Brinkmann modelo Ecoline RE 106

_ Centrífuga Refrigerada Hitachic CR 20B2 Hitachi (Tóquio, Japão), rotor RPR20-2

- _ Centrífuga para eppendof, marca Beckman, modelo Allegra 21R
- _ Espectrofotômetro UV/VIS marca Shimadzu (Tóquio, Japão) Multispec-1501
- _ Espectrofotômetro da *Hitachi* (Tóquio, Japão) modelo U-3000.
- _ Espectrômetro de NMR 300 MHz da Varian (Califórnia, Estados Unidos)
- _ Estufa de esterelização FABBE Modelo 119
- _ Fluorímetro Spex modelo Fluorolog 1681
- _ Homogeinizador tipo Potter-Elvehjem
- _ Injetor manual da Rheodyne (Califórnia, EUA)

_ Liofilizador *E-C Micro Modulyo* e bomba da *Savant* (Nova Iorque, Estados Unidos) modelo VLP-20.

- _ Microscópio binocular marca Nikon modelo 81186
- _ Microscópio confocal marca Zeiss modelo LSM
- _ pHmetro da Corning (EUA) modelo 430.
- _ rota evaporator da Buchler modelo 50479
- _ Sonicador Branson Sonifier 450

_ *Speed Vac[®] Plus Savant* (Nova Iorque, EUA) e bomba da *Savant* (Nova Iorque, EUA) modelo VLP200.

_ Sistema de HPLC da *Shimadzu* (Tóquio, Japão): 2 bombas LC-10AD*VP*, injetor automático SIL-10AD*VP*, detector de absorbância UV SPD-10AV*VP*, detector de fluorescência RF-551, detector de fotodiodos em série SPD-M10AV*VP*, controlador de Sistema SCL-10A*VP* conectado a um computador e software CLASS-VP versão 5.03.

_ Sistema de HPLC da *Shimadzu* (Tóquio, Japão): 2 bombas LC-10AD, injetor manual, detector de absorbância UV SPD-10A, detector de fluorescência RF-535 conectado a um computador e software CLASS-LC10.

__ Sistema de MS composto por: espectrômetro de massas Quattro II da Micromass (Manchester, Reino Unido), software Masslynx versão 3.2, injetor *Rheodyne* (Califórnia, EUA).

_ Sistema para detecção de intensidade e espectro de emissão de luz do ¹O₂ na região do infravermelho, composto por um tubo fotomultiplicador (R5509 PMT, Hamamatsu Photoniks KK, Shizuoka, Japão), sistema de refrigeração por

nitrogênio líquido (S600 Photocool[™], PC176TSCE005 cooler, Products for Research Inc., MA), fonte de alta tensão (High Voltage DC Power Supply Model C3360, Hamamatsu Photoniks KK, Shizuoka, Japão) e monocromador (M300, Edinburgh Analytical Instruments, UK). Software F-900 v.6.22 (Edinburgh Analytical Instruments, Livingston, Reino Unido).

3.3 Métodos

3.3.1 Preparo dos Reagentes

_ Tampão fosfato Salino (PBS, phosphate buffer saline) 10mM, pH 7,4 filtrado em milipore de poro 0,22μm (Millipore-Sigma);

_ Soluções estoque de CaCl₂ 100mM, MgCl₂ 50mM, glicose 100 μ m, NaCl 0,9 e 2,7%, H₂O₂ 30mM, MLT 10mM;

_ Solução estoque padrão de DPA (33mM) foi solubilizado em diclorometano e diluída em acetonitrila.

3.3.1.1 Preparação dos estímulos:

a) Zimosan:

Obtido de paredes de leveduras do Sacharomyces cerevisiae.

A mistura é mantida em ebulição por uma hora sob agitação constante, após deixada esfriar e sonicada em quatro ciclos de 15 segundos a 70W de potência. Após este procedimento a suspensão é centrifugada a 500 rpm por 5 minutos, a 4°C, lavada 3 vezes com PBS (2000 rpm, 20 min, 4°C), ressuspendida em 50 mL de PBS (10 mg/mL) e estocada a –70°C.

Opsonização da suspensão de Zimosan:

A opsonização do zimosan é realizada misturando-se 6 mL de um "pool" de soro fresco com 2 mL de zimosan (10 mg/mL). A mistura de zimosan e soro é

incubada a 37°C por uma hora com agitação constante. Após este procedimento centrifuga-se a 2000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante é desprezado. O pellet é então lavado três vezes com tampão PBS, após a ultima lavagem, o pellet é re-suspendido em 1,0 mL de tampão PBS, as partículas são contadas e congeladas a –20°C por até uma semana.

b) PMA:

Estoque I: 1mg de PMA foi dissolvida em 1000 μ L de DMSO e congelado a -10° C e dessecado.

Estoque II: 100µg/mL, preparado a partir de 100µl do estoque I, diluído em 900µL de DMSO; congelado a –10°C e dessecado.

No momento do uso, 10µl do estoque II foi diluído em 900µL de PBS, gerando uma concentração de 5µg/mL.

3.4 Procedimentos experimentais

3.4.1 Isolamento de neutrófilos humanos de sangue periférico

O sangue é colhido em tubos plásticos heparinizados (10U/mL), e posteriormente diluído na proporção 1:1 com PBS 10mM, pH 7,4, filtrado em membrana de poro 0,22µm. A diluição é colocada sobre 10mL de Histopaque-R. O material então é submetido à centrifugação em 2500 rpm à temperatura ambiente por 20 minutos em centrífuga de bancada. Ao infranadante são adicionados 15mL de Dextram 5%, diluído em solução salina 0,9% estéril para sedimentação de eritrócitos. O material é mantido em banho de gelo (com inclinação de 45°) por 45 minutos, sendo o sobrenadante recolhido (volume completado para 30mL com PBS) e centrifugado a 2500 rpm à temperatura ambiente por 5 minutos em centrífuga de bancada.

O sobrenadante deve ser descartado e o infranadante submetido á hemólise em 10mL de água gelada (0°C – destilada e filtrada em filtro de poro 0,22µm) com agitação constante por um minuto. A isotonicidade é restabelecida com 5mL de NaCl 2.7% (filtrado em filtro de poro 0,22µm) e 15mL de PBS estéril.

O material restante é centrifugado em 2500 rpm à temperatura ambiente por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o infranadante re-suspendido em 1mL de PBS. A contagem de células totais será realizada em câmara de Newbauer e a viabilidade celular avaliada com Azul de Tripan 0,1% (Boyum, 1968a, 1968b). As células foram mantidas em banho de gelo até a realização dos ensaios.

3.4.1.2 Detecção indireta de ¹O₂ em células polimorfonucleares PMN através do captador DPA

Após os isolamentos e contagem dos neutrófilos (2,5x10⁶ cél/mL), houve incubação opsonizadas das partículas zimosam mesmas com as $(2,5x10^7 \text{partículas/mL})$, marcadas com sonda seqüestradora de $^{1}\text{O}_2$, o DPA na concentração final de 2,5mM. A incubação foi em meio aguoso (PBS) por 1 hora em banho-maria a 37°C. Para controle foi realizado um branco (células polimorfonucleares mais DPA). Após este período cada amostra foi extraída com clorofórmio e metanol (2:1), vortex por 1min e centrifugação 12.000g/30min em centrifuga 5840 R. A fase orgânica foi retirada e secada com gás nitrogênio, ressuspendido em 0,5mL de acetonitrila e posterior filtração em membrana filtrante Millipore 0,22µm de poro 13mm e posterior análise em HPLC.

As amostras foram analisadas por HPLC usando o equipamento de HPLC LC-10AD Shimazdu com detector de fluorescência programado em 330 nm de emissão e 470 nm excitação e detector UV programado para detecção em comprimento de onda de 210 nm. A coluna usada foi a LC-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) da *Phenomenex*. A separação e identificação do DPA e do seu endoperóxido (DPAO₂) foram realizadas com fluxo de 1,0 mL/min por um gradiente linear partindo de 65 % ACN em água, indo a 85 % ACN em 10 min, mantendo em 85 % ACN até 40 min e retorno para 65% ACN até 45 minutos.

3.4.2 Isolamento de células mononucleares e monócitos humanos de sangue periférico

O sangue é separado por Ficoll-Histopaque como descrito na separação de neutrófilos (item 3.4.1). As células mononucleares passaram por alguns processos de lavagem com PBS, em diferentes rotações (1800, 1500, 1200 rpm). A camada de plaquetas que se deposita sobre o pellet é retirada com cuidado. Após, o sobrenadante ser desprezado e o pellet ressuspendido em 1 mL de PBS.

Para o isolamentodas células mononucleares, foi realizado com procedimento para a separação de monócitos: o pellet foi ressuspenso em 5 mL de RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (solução A); esta solução foi lentamente adicionada a 5 mL de solução B (5mL de RPMI + 4,75mL de Percoll + 0,325mL de PBS 10X). Esta mistura foi centrifugada por 30 minutos, 1500 rpm, 20°C, sem freio. Foi coletado o anel formado de monócitos e o pellet foi desprezado (linfócitos).

A contagem das células foi realizada em câmara de Newbauer, a viabilidade celular foi avaliada com Azul de Tripan 0,1% e uma lâmina corada pelo método de MGG modificado por Rosenfeld foram utilizada para avaliação da proporção entre linfócitos e monócitos (Boyum, 1968a, 1968c).

As células foram mantidas em banho de gelo até a realização dos ensaios.

3.4.2.1 Detecção indireta de ${}^{1}O_{2}$ em células mononucleares: PBMC através do captador DPA

O procedimento para células mononucleares foi o mesmo utilizado o item 3.4.1.2. A quantidade celular usada foi de $2,5x10^6$ cél/mL, houve incubação das mesmas com as partículas opsonizadas zimosam (2,5 $x10^7$ partículas/mL), marcadas com sonda seqüestradora de 1O_2 , o DPA na concentração final de 2,5mM. A incubação foi em meio aquoso (PBS) por 1 hora em banho-maria a 37°C. Para controle foi realizado um branco (células mononucleares mais DPA). Após este período cada amostra foi extraída com clorofórmio e metanol (2:1), vortex por 1min e centrifugação 12.000g/30min em centrifuga 5840 R. A fase

orgânica foi retirada e secada com gás nitrogênio, ressuspendido em 0,5mL de acetonitrila e posterior filtração em membrana filtrante Millipore 0,22µm de poro 13mm. E posterior análise em HPLC.

3.4.3 Obtenção de Eosinófilos de lavado bronco alveolar de Camundongos

Imunização e desafio com OVA

Os animais (camundongos Balb/c) para sensibilização com ovoalbumina (OVA), foram imunizados no dia 0 com a injeção de 4 μ g de OVA adsorvida em 1,6 mg de hidróxido de alumínio (Alum) pela via intraperitoneal (i.p.), e no dia 7 com 4 μ g de OVA/1,6 mg Alum pela via subcutânea (s.c.). Nos dias 14 e 21 os animais foram desafiados pela administração nasal de 50 μ l de uma solução contendo 10 μ g de OVA, com o auxílio de uma micro-pipeta Gilson.

Obtenção do lavado broncoalveolar (LBA)

Vinte e quatro horas após o segundo desafio com OVA, os animais foram injetados i.p. com uma dose letal de anestésico Ketamina 34mg/Kg, hidrato de cloral 10% 600mg/kg, tampão fosfato (PBS) 0,3(mL por animal). Em seguida a traquéia dos animais foi exposta, canulada e com o uso de uma seringa foram injetados 0,5 mL de PBS gelado no espaço bronco alveolar. Após aspiração do LBA, mais 1mL de PBS foi injetado e aspirado por três vezes.

O próximo passo foi perfundir os pulmãos com PBS e macerados em homogenizador de potter (Strath et al., 1985).

Contagem total das Células do LBA

Para determinar o número total de células no LBA, 90μ L da suspensão celular foram fixados e corados com 10μ L de uma solução de cristal violeta a 0,5% em ácido acético a 30% para contagem em hemocitômetro.

As células foram mantidas em banho de gelo até a realização dos ensaios.

3.4.4 Utilização do 9,10-difenilantraceno como captador químico de ¹O₂

O DPA foi usado como sonda no seqüestro de ${}^{1}O_{2}$ em fagócitos. O enfoque foi carregar estímulo opsonizado (ZO), marcado com DPA, para dentro da célula onde, na presença do ${}^{1}O_{2}$, forma o endoperóxido por cicloadição do tipo Diels-Alder (4+2) (Figura 11).

Para caracterização da sonda foi realizado o espectro de emissão e excitação da fluorescência do DPA (Figura 11-a). Já a determinação do tempo de retenção do padrão de DPA e do DPAO₂ por cromatografia líquida foi efetuada através do detector de fluorescência programado em 330 nm de emissão e 470 nm excitação e detector UV programado para detecção em comprimento de onda de 210 nm. A coluna usada foi a LC-18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) da *Phenomenex* (Figura 11-b). A separação e identificação do DPA e do seu endoperóxido (DPAO₂) foram realizadas com fluxo de 1,0 mL/min por um gradiente linear partindo de 65 % ACN em água, indo a 85 % ACN em 10 min, mantendo em 85 % ACN até 40 min e retorno para 65% ACN até 45 minutos.



Figura 11. Formação do DPAO₂



Figura 11-a Espectro de emissão e excitação do DPA em acetonitrila



Figura 11-b Cromatogramas do padrão de DPA e DPAO₂ após fotossensibilização

37

3.4.5 Obtenção de imagens por microscopia confocal

Após a separação dos neutrófilos e opsonização de partículas de zimosan adsorvidos em DPA (2,5mM), neutrófilos ($1x10^5$ cél/mL) foram incubados com ZO/DPA por um minuto ($1x10^5$ partículas/mL). Após este tempo as células foram depositadas sobre uma placa contendo uma resina de polilisina (por mais 1 min) para adesão. Depois deste período foram levados ao microscópio para visualização de imagens.

Estas imagens foram feitas a cada 30 segundos com tempo máximo de 20 minutos, para acompanhamento da oxidação do DPA por oxigênio singlete produzido por PMN através do decréscimo da fluorescência deste antraceno $(\lambda_{ex}=330$ nm; $\lambda_{em}=470$ nm).

3.4.6 Estudo da quimiluminescência do oxigênio singlete na região do infravermelho

O sistema de detecção de emissão de luz na região do infravermelho (1268nm) através da quimiluminescência direta do ${}^{1}O_{2}$ foi o S600 Photocool TM PC176TSCE005 equipado com fotomultiplicadora (R5509 PMT, Hamamatsu Photonics KK).

Para detecção de ${}^{1}O_{2}$ (emissão de luz) em fagócitos utilizamos: neutrófilos de sangue periférico humano (5x10⁵ – 5x10⁶ células/mL) e eosinófilos de lavado bronco alveolar (2x10⁶ – 5x10⁶ células/mL) de camundongos (Balb/c), instilados com ovoalbunima intranasal foram ativados *in vitro* com acetato de forbol miristado (PMA) (16ng/ensaio) ou zimosan opsonizadas (ZO) (5x10⁶ –5x10⁷ partículas/mL) em tampão fosfato (0,01M) ou meio deuterado.

Para controle do funcioamento do equipamento a reação química do H_2O_2 (0.3mM) e OCI⁻ (0.5mM) foi realizada (Kiryu, et al., 1998)

3.4.7 Avaliação do efeito da Melatonina em neutrófilos e células mononucleares sobre a produção de ¹O₂

Neutrófilos e células mononucleares de sangue periférico humano $(2,5x10^6)$ foram ativadas *in vitro* com partículas opsonizadas adsorvida em DPA e incubados com MLT nas seguintes concentrações finais 1nM, 100nM,1µM, 100µM e 1mM. Após este período cada amostra foi extraída com clorofórmio e metanol como descrito nos itens 3.4.1.2 e 3.4.2.1 e posterior análise em HPLC.

3.4.8 Síntese do ácido 9,10-antracenil-3-bispropiônico

O ácido 9,10-antracenil-3-bispropiônico (AABP) é um produto intermediário na síntese do éster 9,10-antracenil-3-bispropionato de etila (ABPE). A rota adotada foi uma adaptação de trabalhos anteriores que descrevem a síntese de derivados de naftalenos (Lock e Walter, 1942; Marvel e Wilson, 1958; Di Mascio e Sies, 1989; Pierlot *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2000). A figura 12 ilustra a rota e os principais reagentes envolvidos na síntese desses compostos. A descrição de cada etapa é feita a seguir.



Figura 12. Rota de síntese do ácido 9,10-antracenil-3-bispropiônico

3.4.8.1 Bromação radicalar do 9,10-dimetilantraceno

O 9,10-dimetilantraceno (DMA) apresenta duas regiões susceptíveis ao ataque do bromo: a parte aromática e a cadeia lateral. A halogenação da cadeia lateral é feita com bromo radicalar, o qual é gerado pela clivagem homolítica da ligação covalente do bromo (Br₂) pela luz ou por calor.

Em um balão de 100 mL de fundo redondo e três bocas, equipado com condensador de refluxo, funil de adição e agitador mecânico, foram colocados 50 mL de CCl₄ e 0,5 g de DMA (2,43 mmol). Em seguida, adicionaram-se 300 μ L de Br₂ (5,8 mmol). O sistema permaneceu em refluxo sob agitação e irradiação com luz branca fornecida por uma lâmpada de 500 W por 4h. Depois desta fase, permaneceu em repouso à temperatura ambiente por uma noite. A reação foi acompanhada pela medida de pH da reação e por cromatografia em camada delgada (TLC), usando placa de sílica com marcação fluorescente, fase móvel constituída de 80% de CHCl₃ e 20% de n-hexano.

Eliminou-se o solvente por roto-evaporação e procedeu-se uma recristalização do sólido obtido com CHCl_{3.} Depois de permanecer em repouso por 6h, o sólido referente ao 9,10-bisbromometilantraceno (BBMA) foi recuperado em funil de Büchner. O produto obtido foi analisado por RMN de ¹H.

3.4.8.2 Síntese malônica

Em um balão de 1L com três bocas, equipado com condensador de refluxo, agitador mecânico, funil de adição e tubo secante, foram colocados 250 mL de etanol absoluto seco e adicionados lentamente 1,5 g de sódio metálico (0,0625 mol). Quando todo o sódio havia reagido, 20 mL de éster malônico redestilado (0,132 mol) foram adicionados gota a gota na solução sob agitação por 2h. Durante esta etapa, manteve-se o sistema aquecido (~50 °C) para prevenir a precipitação do éster de sódio malônico.

Depois da adição do éster, adicionaram-se 350 mL de benzeno seco para facilitar a dissolução do BBMA, que foi adicionado na forma sólida (0,55 g; 1,51 mmol). O sistema permaneceu em refluxo por 4 h e sob temperatura ambiente

durante uma noite. A mistura resultante foi neutralizada com 100 mL de água e 100 mL de uma solução aquosa de HCI a 20 %. Houve separação das fases orgânica e aquosa, sendo que esta última foi lavada com éter etílico. As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com solução 5 % de NaHCO₃ e água, sendo que no final a mistura foi seca sob Na₂SO₄ anidro. Os solventes e excesso de éster malônico foram removidos por roto-evaporação à pressão reduzida.

3.4.8.2.1 Tratamento de solventes e do éster malônico

<u>Etanol seco</u>: Em um balão de 1L foram colocados 500 mL de etanol absoluto e foram adicionados 2,5 g de magnésio metálico e 0,5 g de iodo ressublimado. O sistema permaneceu em refluxo por 2 h e em seguida o etanol foi recuperado por destilação.

<u>Benzeno seco</u>: Em um balão de 1 L foram colocados 600 mL de benzeno e 3 g de sódio metálico na forma de fio, o sistema permaneceu em refluxo por 1 h e o benzeno foi recuperado por destilação. Essa operação foi repetida mais uma vez. <u>Éster Malônico</u>: Em um balão de 250 mL foram colocados 150 mL de éster malônico, que foi destilado à pressão reduzida.

3.4.8.3 Hidrólise e descarboxilação

Em um balão de 500 mL, equipado com condensador de refluxo, o líquido resultante da etapa anterior foi dissolvido em 100 mL de solução 6 M de NaOH, 100 mL de metanol e 5 mL de CHCl₃. O sistema foi aquecido sob refluxo por 3 h com agitação. Foi realizada uma filtração a quente e acrescentou-se ao filtrado HCl até que a solução apresentasse pH \sim 1 e houvesse a formação de um precipitado. Após essa etapa, o sistema permaneceu em geladeira por uma noite.

O sólido, obtido por filtração em funil de Büchner, foi analisado por HPLC-MS usando o equipamento de HPLC com o detector UV programado para detecção em comprimento de onda de 260 nm. A coluna usada foi a LC-18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) da *Supelco*. A separação foi feita com fluxo de 0,6 mL/min por um gradiente linear partindo de 15 % ACN em água, indo a 30 % ACN em 10 min, permanecendo a 80 % ACN até 15 min, permanecendo em 80 % por mais 5 min, retorno para 15 % ACN até 25 min. A análise por espectrometria de massas no modo de ionização *eletrospray* negativa (ESI-), com as seguintes especificações: fluxo de gás de secagem e de nebulização (ambos nitrogênio) eram 300L/h e 30 L/h, temperatura da fonte de 120°C, os potenciais do capilar e do eletrodo HV eram 3,5 e 0,5 kV respectivamente. O potencial do cone foi fixado em 25 V e foram adquiridos espectros no primeiro analisador na faixa de 100 a 500 *m/z*.

O produto foi mantido em estufa a temperatura de 120°C durante cerca de 50 dias até descarboxilação total, verificada pela estabilização da massa do produto. O produto foi analisado por espectrometria de massas conforme descrito anteriormente.

3.4.9 Síntese do éster 9,10-antracenil-3-bispropionato de etila

A etapa de esterificação (figura 13) foi realizada como descrito em Vogel (1989) com algumas modificações. Para 1g do sólido obtido na etapa anterior, do qual estima-se que cerca de 150 mg sejam do AABP e o restante, contaminação de ácido malônico, foram utilizadas as seguintes quantidades de reagentes: em um balão de 50 mL equipado com condensador de refluxo, foram adicionados 23 mL de álcool etílico absoluto seco e 0,1 mL de ácido sulfúrico concentrado. Adicionaram-se 6 mL de tolueno e o extrator *Dean-Stark* foi acoplado ao sistema e teve sua parte lateral preenchida com tolueno.



Figura 13. Síntese do éster 9,10-antracenil-3-bispropionato de etila.

Depois de 4 h de aquecimento foi realizado uma roto-evaporação para reduzir o volume pela metade. Foi realizada uma extração com 20 mL de uma solução 20 % de cloreto de sódio e para uma melhor separação foi acrescentado 20 mL de éter etílico. A fase apolar foi lavada com 20 mL de solução 5% de bicarbonato de sódio e seca sob Na₂SO₄ anidro. Após filtração, o filtrado foi roto-evaporado para retirar o resíduo de tolueno e o éter etílico.

Uma amostra do produto do éster 9,10-antracenil-3-bispropionato de etila foi analisada por HPLC-MS no modo de ionização *electrospray* positiva (ESI+) e demais condições de análise conforme descrito em materiais e métodos.

3.4.10 Síntese do 9,10-dimetilantraceno

O 9,10-dimetilantraceno (DMA) reagente de partida dos captadores de ${}^{1}O_{2}$ pode ser obtido comercialmente. Tendo em vista a recente dificuldade de importação de materiais, foi testada a síntese desse composto partindo-se da antraquinona, um reagente disponível em grande quantidade no laboratório. A rota adotada foi a descrita por Tanaka (Tanaka et al., 2001) e esquematizada na figura 14.



Figura 14. Rota de síntese do 9,10-dimetilantraceno

3.4.10.1 Preparação do 9,10-dihidroxi-9,10-dimetilantraceno

Em um balão de 3 bocas de 250 mL equipado com agitador mecânico, condensador e funil de adição, sob atmosfera de argônio, colocar 15 mL de éter dietílico seco, adicionar 1,7g de Mg^{+2} (0,072 mol) e dois cristais de l₂. No funil de adição colocar 10,33g de CH₃I (0,072 mol) dissolvidos cerca de 50 mL de éter dietílico secos. Sob agitação constante adicionar a solução de CH₃I lentamente.

Quando todo Mg⁺² tiver sido consumido, acrescentar 3,7g de antraquinona (0,0178 mol) e mais 150 mL de éter dietílico seco. Após 4h de refluxo, foi adicionado uma solução de cloreto de amônio. A mistura resultante foi extraída com solução de NaCl saturada, seca sob Na₂SO₄, filtrada e roto-evaporada.

Foi realizada uma TLC em placa de sílica com indicador fluorescente e fase móvel constituída por *n*-hexano e acetato de etila (5:1). Nessas condições, o produto, 9,10-dihidroxi-9,10-dimetilantraceno (DHDMA), não elui, enquanto que os demais contaminantes eluem. O ponto contendo o composto foi raspado da placa, extraído com CH₂Cl₂, filtrado e seco.

A amostra foi dissolvida em uma mistura de acetonitrila e água (1:1) contendo 0,5% de ácido fórmico e uma alíquota foi analisada por espectrometria de massas no modo de ionização *eletrospray* positiva (ESI+), com as seguintes especificações: fase móvel constituída de uma mistura de acetonitrila e água (1:1) contendo 0,5% de ácido fórmico com fluxo de 0,05 mL/min, fluxo de gás de secagem e de nebulização (ambos nitrogênio) eram 300L/h e 30 L/h, temperatura da fonte de 120°C, os potenciais do capilar e do eletrodo HV eram 3,5 e 0,5 kV respectivamente. O potencial do cone foi fixado em 10 V e foram adquiridos espectros no primeiro analisador na faixa de 50 a 350 *m/z*.

3.4.10.2 Preparação do 9,10-dimetilantraceno partindo do 9,10-dihidroxi-9,10dimetilantraceno

Em um balão de 3 bocas de 250 mL equipado com agitador mecânico, condensador e funil de adição, sob atmosfera de argônio, colocar 39,63 g de $SnCl_2$ (8,4 mmol) e 2,02g do DHDMA (8,4 mmol). No funil de adição colocar 37 mL de HCI (8,4 mmol) e 86,7 mL de ácido acético (8,4 mmol). Sob agitação constante adicionar a solução de ácidos lentamente. Após 2h de refluxo, adiciona-se 300mL de água. O precipitado formado foi filtrado e analisado por HPLC-MS usando o equipamento de HPLC com o detector UV programado para detecção em comprimento de onda de 260 nm. A coluna usada foi a LC-18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m) da *Supelco*. A separação foi feita com fluxo de 0,8 mL/min por um gradiente

linear partindo de 50 % ACN em água, indo a 80 % ACN em 15 min, mantendo em 80 % ACN até 20 min e retorno para 50 % ACN até 25 min.

A análise por espectrometria de massas foi executada no modo de ionização química de pressão atmosférica positiva (APCI⁺), com as seguintes especificações: fluxo de gás de secagem e de nebulização (ambos nitrogênio) eram 300L/h e 30 L/h, temperatura da fonte de 120° C, temperatura do probe 400°C, os potenciais do capilar e do eletrodo HV eram 3,5 e 0,5 kV, respectivamente. O potencial do cone foi fixado em 25 V e foram adquiridos espectros no primeiro analisador na faixa de 50 a 350 *m/z*.

3.4.11 Preparação dos endoperóxidos do ABPE e do AABP

O éster 9,10-antracenil-3-bispropionato de etila (ABPE) presente no sistema fagocitário, na presença do ${}^{1}O_{2}$, forma o endoperóxido por cicloadiçao do tipo Diels-Alder (4+2) e também sobre hidrólise por esterases inespecíficas formando o ácido 9,10-antracenil-3-bispropiônico (AABP) que também é passível de reação com o ${}^{1}O_{2}$ formando seu respectivo endoperóxido (Figura 15).

Para preparação dos endoperóxidos do ABPE e AABP foi realizada uma fotossensibilização utilizando o método fotoquímico convencional. Em 3mL de isopropanol foram dissolvidos 10mg do AABP e um outro tubo 10mg do ABPE. As reações se processaram em tubos de ensaio com constante borbulho de oxigênio, exatamente por 30 minutos, onde a soluções foram irradiadas com uma lâmpada de 500W.

Em seguisa a este processo foi realizada a análise dos endoperóxidos $AABPO_2 e ABPEO_2 e$ seus respectivos materiais de partida. Também foi realizada a análise do $AABPEO_2$, que é um endoperóxido subproduto da hidrólise parcial do ABPE por HPLC com detector UV programado para detecção em 230 nm. A coluna usada foi a LC-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) da *Phenomenex* realizada com fluxo de 1,0 mL/min por um gradiente com fase móvel constituída de 65 % ACN em água, indo a 85 % ACN em 5 min, mantendo em 85 % ACN até 25 min e retorno para 65% ACN até 30 minutos.

Após o detector de UV, uma parte do fluxo ($0,20\mu$ L/min) era desviada para o espectrômetro de massas para análise no modo de ionização química de pressão atmosférica (APCI⁺ e APCI⁻), com as seguintes especificações: fluxo de gás de secagem e de nebulização (ambos nitrogênio) eram 300L/h e 30 L/h, temperatura da fonte de 100°C, temperatura do probe 300°C. O potencial do cone foi fixado em 15V, com diferentes potenciais do cone na faixa de 15V, 30V, 50V, e 70V. Foram adquiridos espectros no primeiro analisador na faixa de 100 a 600 *m/z*.



Figura 15. Rota de formação dos endoperóxidos ABPEO₂, AABPEO₂ e AABPO₂.

3.5 Detecção indireta de ¹O₂ em fagócitos: células mononucleares e neutrófilos através do captador químico ABPE

Após os isolamentos e contagem dos neutrófilos e células mononucleares $(2,5x10^6 \text{ células/mL})$, houve incubação das mesmas com a sonda ABPE na concentração final de (0.5mM) por uma hora em banho maria a 37°C em meio aquoso (PBS) em pH 7,4. Em seguida a este procedimento as células foram novamente incubadas com partículas opsonizadas zimosam $(2,5x10^7 \text{partículas/mL})$, por mais 1 hora em banho maria. Também foi utilizado éster de forbol (PMA) para estimulação celular na concentração de 16ng/mL.

Depois deste período as amostras sofreram ajuste de pH para 2,5 para melhor estabilidade do produto. Para fins de comparação foi feito um branco (células mononucleares e neutrófilos e tampão PBS mais sonda ABPE sem estimulação). Depois cada amostra foi extraída com clorofórmio e metanol (2:1), vortex por 1min e centrifugação 12.000g/30min em centrifuga 5840 R. A fase orgânica foi retirada e secada com gás nitrogênio, ressuspendido em 0,5mL de acetonitrila e posterior filtração em membrana filtrante Millipore 0,22µm de poro 13mm e posterior análise em HPLC.

As amostras foram analisadas por HPLC usando o equipamento de HPLC LC-10AD Shimazdu com detector UV programado para detecção em comprimento de onda de 230 nm. A coluna usada foi a LC-18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) da *Phenomenex*. A separação e identificação do AABP e do seu endoperóxido (AABPO₂) e do AABPEO₂ foi realizada com fluxo de 1,0mL/min por um gradiente partindo de 65 % de ACN em água, indo a 75 % ACN em 5 min, depois 85% ACN em 7 min, mantendo em 85 % ACN até 25 min e retorno para 65% ACN até 30 minutos.

3.6 Análise Estatística

Para a comparação entre os parâmetros bioquímicos, foi aplicado a Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Dunett (teste paramétrico). O nível de significância foi de 95%, onde * equivale a $p \le 0.05$, ** a $p \le 0.01$ e *** a $p \le 0.001$, através do programa Instat.

A análise estatística utilizada para a comparação da oxidação do ABPE por ${}^{1}O_{2}$ em PMN e PMBC ativados por PMA e ZO foi a Análise de Variância (ANOVA). As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando o valor de p $\leq 0,05$ (5%).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Detecção de ¹O₂ gerado em sistema celular através do captador químico 9,10-difenilantraceno (DPA)

4.1.1 Detecção indireta de ¹O₂ em células mononucleares: PBMC

O *burst* respiratório reflete a ativação do sistema NADPH oxidase e, conseqüentemente, a formação de ânion superóxido, (Babior, 2002; Steinbeck et al., 1993) este último é uma espécie primária que leva à formação de outras ERO. Durante ativação do sistema NADPH oxidase também ocorre a degranulação de MPO que catalisa a formação de HOCI; este quando associado ao H₂O₂, forma ${}^{1}O_{2}$ (para revisão ver Klebanoff, 2005). Steinbeck e seus colaboradores evidenciaram a formação de ${}^{1}O_{2}$ em neutrófilos e macrófagos advindo do sistema MPO-H₂O₂-HOCI, usando o 9,10-difenilantraceno. Este atua como captador de ${}^{1}O_{2}$ formando endoperóxido, DPAO₂ (Steinbeck et al., 1993; Steinbeck et al.,1991; para revisão ver Klebanoff 2005).

Nos experimentos feitos por Steinbeck, a sonda DPA foi adsorvida em partículas de vidro, *beads*, e a formação de ${}^{1}O_{2}$ foi monitorada após ativação pelo estímulo solúvel PMA. Em nosso trabalho, incorporamos a sonda DPA em partículas de zimosan opsonizadas, que atuam diretamente como estímulo dos leucócitos.

Imaginando que ¹O₂ é formado principalmente no fagolisossomo; a associação do DPA ao estímulo opsonizado traria vantagens para a detecção de ¹O₂ intracelular.

Depois do isolamento e contagem das células mononucleares humanas (item 3.4.2) $(2,5x10^6$ células/mL) incubamos as mesmas com partículas opsonizadas de zimosan $(2,5x10^7 \text{partículas/mL})$, marcadas com sonda seqüestradora de ${}^{1}\text{O}_{2}$, o DPA, na concentração final de 2,5mM, seguido de posterior análise por HPLC (Figura 16). No controle, célula mais sonda, observamos a formação, ainda que baixa, do DPAO₂, que ocorre possivelmente,

originado da auto-oxidação da sonda, (com produção basal de ERO pelas células).

4.1.2 Detecção indireta de ${}^{1}O_{2}$ em células polimorfonucleares: neutrófilos (PMN)

O procedimento adotado para neutrófilos foi o mesmo utilizado no item 4.1.1. Do mesmo modo que observamos com PBMC, a estimulação de neutrófilos também propicia a produção de DPAO₂ (Figura 16 B). A Figura 17 compara as áreas do sinal de DPAO₂ em PBMC e PMN, sendo evidenciado, nas condições experimentais utilizadas. A formação de ${}^{1}O_{2}$, em neutrofilos é maior do que em PBMC (*p≤ 0,05).





Cromatograma representativo de 8 experimentos nos quais foi avaliada a formação do $DPAO_2$, monitorada por HPLC, após incubação por 60 minutos de células mononucleares, **(A)** (2,5x10⁶cel/mL) e neutrófilos **(B)** (2,5x10⁶cel/mL) com partículas sólidas opsonizadas (2,5x10⁷partículas/mL) adsorvidas com DPA (2,5mM) em negro. O cromatograma tracejado se refere ao controle. O meio de reação foi PBS 0,01M em pH 7,4 temperatura 37 °C, num volume final de 300µL.





A fagocitose ocorre após o reconhecimento de patógenos através de receptores específicos presentes na membrana dos fagócitos. Portanto, a metodologia utilizada neste trabalho parece ser mais adequada, quando comparada aos trabalhos anteriores de Steinbeck.

A utilização de DPA adsorvido ao ZO é um método mais refinado, visto que, o caminho para introduzir o DPA dentro da célula é diferente (via receptores de opsoninas) daqueles adotados em outros trabalhos (via receptores independentes). Os fagócitos se ligam ao zimosan opsonizado por receptores como FCR ou CR (Ehlers, 2000). O CR3 (Mac 1 ou CD 11b/CD 18) é um importante receptor envolvido na ligação de ZO com o C3b de fagócitos (Ehlers, 2000), isto nos permite a comparação de formação de ${}^{1}O_{2}$ monitorada nesses dois tipos celulares (PMN e PBMC).

O estudo aqui realizado, que visou determinar a formação de ¹O₂ em neutrófilos e população de PBMC, que é composta de linfócitos e monócitos, é importante para a avaliação destas células no foco inflamatório.

Neutrófilos são as primeiras células a responder à ação de patógenos no foco infeccioso, seguidas de monócitos que respondem aos microorganismos quase tão rapidamente quanto os neutrófilos, porém persistem por muito mais tempo nos sítios da inflamação. Por este motivo, os monócitos/macrófagos são as células efetoras dominantes nos estágios mais tardios da resposta imune inata, cerca de 1 a 2 dias após a infecção (Abbas et al., 2000). Eles são ainda responsáveis pela secreção de citocinas, mediadores inflamatórios e fatores do complemento que potencializam а ação microbicida dos monócitos. desencadeando ainda respostas linfocitárias específicas (Beutler, 2004).

A descrição de novas sondas ou, então, a introdução de sondas préutilizadas numa condição optimizada se justifica pela importância que ERO tem em diferentes eventos celulares.

A possibilidade de que estados excitados sejam formados *in vivo*, podendo ser capazes de modular algumas respostas biológicas, tem despertado grande interesse, uma vez que de ¹O₂ parece ser um importante sinalizador no processo inflamatório. Especialmente importantes são as propostas de que ¹O₂ participe da ativação de fator de transcrição NF-κB, assim como da ativação de quinases e outras enzimas (Schereck et al., 1992; para revisão ver Klotz, 2002).

A rota possível para a formação de ${}^{1}O_{2}$ em fagócitos, é o caminho que envolve uma primeira etapa catalisada pelo composto I (forma cataliticamente ativa da enzima MPO) que gera HOCI (Kettle e Winterbourn, 2001). Este reage com H₂O₂ formando ${}^{1}O_{2}$ (reações 1-3).

Apesar de MPO ser reconhecida principalmente como enzima que catalisa a formação de HOCI (reação 2), atuamente é reconhecido que o espectro de atuação desta enzima seja mais amplo. Sabe-se que MPO tem um papel importante na imunomodulação (Lefkowitz et al., 1992; para revisão ver Klebanoff, 2005) e que MPO catalisa a oxidação de substratos endógenos (reação 4 -6).

> Composto I + RH \rightarrow Composto II + R [·] (reação 4) Composto II + RH \rightarrow MPO + R [·] (reação 5) Composto II + O₂ [·] \rightarrow O₂ + MPO + O₂ (reação 6)

Trabalhos anteriores do grupo mostraram que MLT é eficientemente oxidada por MPO (Silva et al., 2000; Silva et al., 2004): a seguir avaliamos seu efeito na oxidação de fagócitos durante a formação de ${}^{1}O_{2}$.

4.1.3 Avaliação do efeito da melatonina sobre a produção de ${}^{1}O_{2}$ de neutrófilos e células mononucleares

Visando ampliar os estudos do papel da MLT no processo inflamatório, avaliamos o efeito deste composto sobre a produção de ¹O₂ em fagócitos. Na presença de MLT, um substrato de mieloperoxidase, há uma forte inibição de HOCI e, conseqüentemente, diminuição da formação de ¹O₂. Na concentração de 1nM, MLT inibe totalmente a formação de DPAO₂ em neutrófilos (Figura 18 A). Entretanto, em PBMC (Figura 18 B), a inibição de formação de DPAO₂ foi apenas parcial, mesmo em concentrações maiores (Figura 18).



Figura 18. Efeito da melatonina na produção de DPAO₂ por neutrófilos e células mononucleares.

Efeito da MLT (0,001- 1000 μ M) sobre a formação do DPAO₂ monitorado por HPLC após incubação, por 60 minutos de neutrófilos (A) (2,5x10⁶cél/mL) e células mononucleares (B) (2,5x10⁶cél/mL) com partículas sólidas opsonizadas (2,5x10⁷part/mL) com DPA (2,5mM). Estes dados representam a média \pm erro padrão de 5 experimentos. O meio de reação foi PBS 0,01M em pH 7,4 temperatura 37 °C, num volume final de 300 μ L, ** p≤ 0,01 para comparação de experimentos sem adição de MLT.

Os resultados de inibição de ${}^{1}O_{2}$ na presença de MLT eram esperados, visto que esta reage com composto I da MPO iniciando um ciclo peroxidásico clássico, reações 4 a 6 que competem com as reações 1 a 3. Entretanto, observamos que a intensidade de inibição de ${}^{1}O_{2}$ por MLT é diferente em neutrófilos quando comparado a PBMC.

A inibição de formação de ${}^{1}O_{2}$ por MLT pode ser devido a diferente compartimentalização da enzima nestes dois tipos celulares. Em monócitos, a MPO está dispersa no citosol principalmente na região perinuclear, enquanto que, em neutrófilos encontra-se compartimentalizada nos grânulos azurófilos. Assim, a localização de MPO define a localização de geração de HOCI e ${}^{1}O_{2}$ e deve definir atividades biológicas distintas nestas células.

Por exemplo, além de microbicida, o ${}^{1}O_{2}$ participa na ativação da cascata de sinalização celular. Sabe-se que o ${}^{1}O_{2}$ atua como oxidante indutor de sinalização na ativação do NF- κ B, que é um importante fator na secreção de várias citocinas pró-inflamatórias (Baggiolini et al., 1997), na ativação de AP-2 (Grether-Beck et al., 2000), e também na ativação da AP-1 (Djavaheri-Mergny et al., 1996; Wenk et al., 1999).

Associado à importância que ${}^{1}O_{2}$ pode ter no processo inflamatório, este trabalho relata a ação inibitória da MLT sobre a produção de ${}^{1}O_{2}$. De qualquer forma, a influência de MLT no controle do *pool* de ${}^{1}O_{2}$ dependerá de sua concentração no foco inflamatório. Cabe lembrar que MLT é sintetizada também em células do sistema imune (Finocchiaro et al., 1991; Carrilo-Vico et al., 2004). Esta síntese extrapineal poderia levar a uma concentração alta de MLT no foco inflamatório. Esta concentração poderia ser suficiente para inibir a formação de ${}^{1}O_{2}$ e, assim, representar uma das formas de controle da produção de ${}^{1}O_{2}$. Desta forma, MLT poderia ser considerada uma substância imunomodulatória tendo papel no cenário de desativação de leucócitos.

A inibição de HOCI e ${}^{1}O_{2}$ explicaria a inibição de ativação do NF- κ B, que levaria a inibição de expressão de iNOS e COX2 por MLT (Mohan et al., 1995 Haslett, 1997). Vale acrescentar ainda que MLT estimula a expressão gênica de algumas enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase, glutationa redutase e peroxidase (Antolin et al., 1996; Rodriguez et al., 2004).

4.1.4 Detecção indireta de ¹O₂ em monócitos e células mononucleares

Para discriminar a participação ou interferência que os linfócitos poderiam ter na formação de ${}^{1}O_{2}$, isolamos monócitos da população mista de células mononucleares (PBMC) (item 3.4.2). Monócitos purificados foram mais eficientes em promover a produção de ${}^{1}O_{2}$ do que PBMC (Figura 19).


Figura 19. Formação de DPAO₂ por monócitos e células mononucleares. Valores de média \pm erro padrão da área integrada da formação do DPAO₂ através da monitoração por HPLC de células mononucleares (2,5x10⁶cél/mL) e monócitos (2,5x10⁶cél/mL) com partículas sólidas opsonizadas (2,5x10⁷partículas/mL) adsorvidas em DPA (2,5mM), após incubação por 60 minutos. O meio de reação foi PBS 0,01M em pH 7,4 temperatura 37 °C, num volume final de 300µL, para n=2. *p≤0,05 para comparação com células mononucleares.

Esses resultados confirmam a hipótese de que nos sistemas onde somente se observa a presença de monócitos estimulados, há maior contribuição de formação de ¹O₂ do que PBMC. Se considerarmos que monócitos representam aproximadamente 10% da população mista de PBMC, e que somente monócitos possuem MPO, conclui-se que estas células produzem concentrações de ¹O₂ maiores.

4.1.5 Detecção indireta de ¹O₂ em eosinófilos de lavado bronco alveolar de Balb/c

Eosinófilos também produzem ácido halogenado, especialmente HOBr, durante o *burst* oxidativo, mediado pela enzima eosinofilperoxidase (EPO) abundante nessas células (Thomas et al., 1995; Aldridge et al., 2002). A seqüência de reações catalisadas pela EPO (reações 7-9) é bastante similar àquelas catalisadas pela MPO (reações 1-3).

$$EPO + H_2O_2 \rightarrow Composto I + H_2O \qquad (reação 7)$$

$$Composto I + Br^- \rightarrow EPO + HOBr \leftrightarrow OBr^- + H^+ (reação 8)$$

$$2 HOBr + H_2O_2 \rightarrow {}^{1}O_2({}^{1}\Delta_q) + 2 Br^- + 2H_2O \qquad (reação 9)$$

Como descrito para PMN e PBMC ativados por ZO/DPA, eosinófiflos de lavado bronco alveolar de Balb/c estimulados com ZO/DPA (item 3.4.3) também formam ${}^{1}O_{2}$ (Figura 20 A). O sinal de DPAO₂ em eosinófilos foi intensificado pela adição de íons brometo (Figura 20 B).



Figura 20. Cromatograma de formação de DPAO₂ por eosinófilos (A), efeito da adição de íons brometo na formação de DPAO₂ por eosinófilos (B).
(A).Cromatograma representativo de 4 experimentos nos quais foi avaliada a formação do DPAO₂ monitorada por HPLC, após incubação, por 60 minutos de eosinófilos de lavado

bronco alveolar (1x10⁶ cél/mL) com partículas sólidas opsonizadas (1x10⁷ cél/mL) adsorvidas em DPA (2,5mM) em negro. O cromatograma tracejado refere-se ao controle. Os dados são valores de média \pm erro padrão da área integrada **(B)**. O meio da reação foi PBS 0,01M pH 7,4 temperatura 37 °C, num volume final de 300µL. *** p≤ 0,001 para comparação de experimentos sem adição de íons brometo.

A quantidade de brometo, utilizado neste trabalho reflete a concentração do íon no sangue, em condições fisiológicas (Holzbecher e Ryan, 1980).

Confirmamos que HOBr produzido pela reação catalisada por EPO, gera ${}^{1}O_{2}$ em eosinófilos e concluímos que a quantidade de ${}^{1}O_{2}$ produzida pode ser mesurada pela sonda DPA.

Aparentimente, eosinófilos seriam mais eficientes na produção de ${}^{1}O_{2}$ que neutrófilos, uma vez que, parte do HOCI formado pelos neutrófilos, esta sendo utilizado em outros alvos biológicos (Kanofsky et al., 1988). Alguns autores descrevem que a reação do H₂O₂ com HOBr é significativamente mais rápida, que a reação com HOCI (Held et al., 1978; Bray e Livingston, 1928) para geração de ${}^{1}O_{2}$. Essse autores postularam que eosinófilos potencializam a produção de ${}^{1}O_{2}$ como parte do repertório microbicida, principalmente em indivíduos hipereosinofílicos (Aldridge et al., 2002).

4.1.6 Avaliação do efeito da Melatonina sobre a produção de ¹O₂ em eosinófilos de lavado bronco alveolar

Com o objetivo de melhor compreendermos os efeitos de melatonina na inflamação, avaliamos sua ação também em eosinófilos. Podemos observar que MLT (1 -1000 μ M) também inibe a formação de ${}^{1}O_{2}$ em eosinófilos é, mas esta inibição é parcial como em células mononucleares. Do mesmo modo que descritos em PMN e PBMC, essa inibição pode ter um importante papel imunomodulatório.



Figura 21. Efeito da melatonina sobre a formação de DPAO₂ por eosinófilos. Efeito da MLT (1- 1000 μ M) sobre a formação do DPAO₂ monitorado por HPLC após incubação por 60 minutos de eosinófilos (1x10⁶ cél/mL) de Balb/c com partículas sólidas opsonizadas (1x10⁷ partícula/mL) adsorvidas em DPA (2,5 mM). Estes dados representam a média ± erro padrão de 4 experimentos. O meio de reação foi PBS 0,01M em pH 7,4 temperatura 37 °C, num volume final de 300 μ L.* p≤ 0,05 para comparação de experimentos na ausência de MLT.

Mecanismos regulatórios são necessários para a desativação do processo inflamatório e contenção da injúria tecidual. No caso de eosinófilos este processo é especialmente relevante na doença asmática , uma vez que, a presença de ERO e HOBr nessa patologia, provoca uma maior deterioração da função pulmomar quando comparado a indivíduos sádios (Aldridge et al., 2002).

Um dado adicional que suporta o papel da melatonina na imunoregulação é o, aumento da produção de citocinas do padrão Th 2 em camundongos, como IL-4, IL-10, (Maestroni, 1995; Raghavendra et al., 2001). Estas citocinas estão envolvidas com a produção de algumas classes de anticorpos e induzem a produção e ativação de eosinófilos no cenário da inflamação (Baggiolini et al., 1997; Borish e Steinke, 2003). Uma provável explicação para esta especificidade celular de resposta diferenciada de inibição de ${}^{1}O_{2}$ por MLT, ocorra devido ao efeito oxidante/antioxidante na ativação/desativação de fatores transcricionais varie de células para células (Michiels et al., 2002). Provavelmente neutrófilos sejam um alvo inicial para os efeitos de MLT, uma vez que, nos primeiros momentos da inflamação, a migração de PMN é superior à de monócitos e eosinófilos.

4.1.7 Detecção de ¹O₂ utilizando a sonda DPA através de microscopia Confocal

Seguindo os estudos de utilização do captador químico DPA, avaliamos o processo de fagocitose de neutrófilos ativados *in vitro* com partículas opsonizadas marcadas com DPA, utilizando microscopia confocal.

O processo foi acompanhado como descrito na seção de Materiais e Métodos (item 3.4.5). Para fins de comparação, foram feitas em microscópio confocal, somente imagens das partículas opsonizadas adsorvidas em DPA, sem células, o qual funciona como um controle (quadro de imagens A), versus imagens dos neutrófilos estimulados com ZO adsorvido em DPA (quadro de imagnes B).



(A)

(A1)

(A2)

(A3)



Figura 22. Oxidação de DPA por neutrófilos monitorada por microscopia confocal. Oxidação do DPA por neutrófilos acompanhada por microscopia confocal. Medida da fluorescência do DPA: λ_{ex} = 330nm e λ_{em} = 470nm. Imagens A a A3: controle utilizando partículas opsonizadas adsorvidas em DPA. Imagens B a B3: início e fim da fagocitose de partículas sólidas adsorvidas em DPA por neutrófilos. O meio de reação foi PBS 0,01M em pH 7,4 temperatura 37 °C, num volume final de 300µL.

Após o período de incubação, de 30 minutos, as imagens A (controle) não se apagam com o tempo. Já os neutrófilos estimulados com partículas adsorvidas ao DPA, fagocitam as mesmas levando a perda da fluorescência do DPA (imagens B). O enfraquecimento da fluorescência de DPA está relacionado à formação de DPAO₂ pelo ¹O₂.

A padronização de utilização de DPA como sonda para confocal parece prover um método de imagem útil para acompanhanto de formação de ${}^{1}O_{2}$ e da fagocitose.

4.2 Detecção direta de oxigênio singlete gerado por leucócitos por quimiluminescência na região do infravermelho

Outro parâmetro avaliado neste trabalho foi à detecção direta de ${}^{1}O_{2}$, através de quimiluminescência. A quantidade de ${}^{1}O_{2}$ formada depende da produção de EROs, assim como a atividade peroxidásica do sistema analisado, ou seja, respectivamente do sistema NADPH oxidase e das enzimas MPO e EPO.

Foram realizadas medidas de quimiluminescência no infravermelho relativas à transição monomolecular (${}^{1}\Delta_{g} \rightarrow {}^{3}\Sigma_{g}$) do ${}^{1}O_{2}$ em 1270 nm para verificar sua formação, quando o mesmo é gerado durante a ativação celular. Para medidas da intensidade de emissão na região do infravermelho, utilizou-se uma fotomultiplicadora especialmente projetada para realizar leituras de emissão nessa região.

Nas figuras 23 e 24 observamos sinal quimiluminescente do controle e também podemos observar que neutrófilos e eosinófilos ($5x10^5$, $2x10^6$, $5x10^6$ cél/mL) ativados com estímulo opsonizado ou solúvel não geram CL. O sistema hipoclorito e H₂O₂ foi usado como controle positivo de formação de ¹O₂, que foi detectado no equipamento em questão (Figura 23 e 24).









Figura 24. Quimiluminescência do ${}^{1}O_{2}$ em λ = 1270 em eosinófilos.

Medida de quimiluminescência do ${}^{1}O_{2}$ em λ = 1270 nm quando eosinófilos (lavado bronco alveolar de camundongos Balb/c), na concentração de 2x10⁶ e 5x10⁶ foram ativados in vitro com PMA (16ng/mL) ou partículas opsonizada (2x10⁶; 5x10⁶ part/mL). Em tracejado está o controle, que se refere à reação química do H₂O₂ (0.3mM) com OCI⁻ (0.5mM). O número de experimentos é equivalente a 3. O meio de reação foi PBS 0,01M em pH 7,4 temperatura 37°C, num volume final de 300µL.

Há algumas células e tecidos capazes de gerar CL de ultra baixa intensidade, invisível a olho nu, mas detectável por equipamentos sensíveis. Esta CL reflete reações oxidativas que ocorrem no interior das células. Foi observada CL, *in situ*, em fígado de rato (Campbell, 1988). Esta CL também foi verificada em plaquetas (originária de síntese de prostaglandinas) e fagócitos (ativação de células) (Campbell, 1988).

Os dois principais produtos responsáveis pelas emissões celulares são carbonilas triplete e oxigênio singlete. As carbonilas triplete podem ser formadas a

partir de reações de oxidação de substratos orgânicos com formação de intermediários dioxetânicos ou outras estruturas altamente instáveis que, ao se clivarem, podem formar espécies excitadas.

O ${}^{1}O_{2}$ pode ser formado tanto por reações orgânicas como inorgânicas. Foi observada produção de ${}^{1}O_{2}$ por CL, em condições fisiológicas, advindo do sistema $H_{2}O_{2}/CI^{-}$ na presença de MPO purificada (Kiryu et al., 1998). Entretanto, a formação de ${}^{1}O_{2}$ em leucócitos estimulados, em quantidades detectáveis por CL direta, continua questionável.

Apesar das várias tentativas feitas para a detecção direta de ${}^{1}O_{2}$ por quimiluminescência durante a fagocitose, não obtivemos sinal quimiluminescente quando, PMN ou eosinófilos foram ativados *in vitro* por dois diferentes caminhos: independente ou dependente de receptores. A detecção não foi possível mesmo após adição de 1mM de íons cloreto ou brometo (no caso específico de eosinófilos) e em meio deuterado (Figura 23 e 24).

Temos que considerar a possibilidade de que a sensibilidade do equipamento não esteja adequada para evidenciar a presença de ${}^{1}O_{2}$ gerado durante o processo fagocítico. Kanofsky em 1988, já relatava que a produção de ${}^{1}O_{2}$ durante a fagocitose não poderia ser detectada por emissão direta de luz na região do infravermelho, por um problema de transparência, uma vez que, a produção de ${}^{1}O_{2}$ intrafagossomal pode ser opticamente bloqueada por membranas ou pelas partículas no meio (Kanofsky et al., 1988; Steinbeck et al., 1993). É possível, também, que o ${}^{1}O_{2}$ formado durante *killing* de patógenos não esteja em quantidade suficientes para ser detectado por emissão de luz, pois se trata de um meio rico em alvos celulares, podendo resultar na supressão imediata de grande fração de ${}^{1}O_{2}$, com isso reduzindo o sinal de emissão de CL a níveis não detectáveis.

4.3 Desenvolvimento de uma nova sonda para detecção de ¹O₂ intracelular 4.3.1 Síntese do 9,10-dimetilantraceno

Foi executada a síntese do DMA, por ser reagente de partida para a síntese do éster 9,10-antracenil-3-bispropionato de etila (ABPE). Para tal adotamos a rota sintética a seguir (Figura 25).



Figura 25. Rota de síntese do ácido 9,10-antracenil-3-bispropiônico



Figura 26. Espectro de massas do DHDMA obtido no modo ESI+.

Partindo-se de 3,7 g de antraquinona (17,8 mmol), obteve-se 2,02g de DHDMA (8,4 mmol), resultando em um rendimento de 47%. O espectro de massas no modo ESI+ exibe um pico majoritário correspondente à molécula protonada $[M+H]^+$ em m/z = 241 (Figura 26).

Partindo-se de 2,02 g de DHDMA (8,4 mmol), obteve-se 0,64 g de DMA (3,1 mmol), resultando em um rendimento de 37%. O cromatograma adquirido por detecção da absorção em 260 nm ou pela seleção do íon m/z = 207 mostrou a presença de um sinal majoritário com tempo de retenção coincidente pelos dois métodos de detecção (Figura 27 A e B). O espectro de massas no modo APCI+ exibe um pico correspondente à molécula protonada [M+H]⁺ em m/z = 207 (Figura 26 C).



Figura 27. (A) Cromatograma obtido com detecção UV em λ = 260 nm. (B) Cromatograma obtido selecionando o íon em m/z = 207 correspondente ao DMA. (C) Espectro de massas do DMA obtido no modo APCI+.

4.4 Síntese do ácido 9,10-antracenil-3-bispropiônico

Em busca de uma sonda captadora de ${}^{1}O_{2}$, que pudesse reagir em diferentes sítios intracelulares, realizamos a síntese do ácido 9,10-antracenil-3bispropiônico e, subseqüentemente, do éster 9,10-antracenil-3-bispropionato de etila. Esta nova sonda despertou nosso interesse, uma vez que sua estrutura tem características lipofílica e, portanto, passível de entrar no meio intracelular. Uma vez dentro da célula, esta poderia sofrer hidrólise enzimática, produzindo um derivado aniônico resultando em acúmulo do mesmo na célula, onde a reação com ${}^{1}O_{2}$ poderá ocorrer em diferentes níveis.

Partindo-se de 0,5 g de DMA (2,43 mmol), obteve-se 0,63 g (1,71 mmol) de 9,10-bis(bromometil)antraceno (BBMA), totalizando um rendimento de 71%. O espectro de RMN de ¹H do BBMA mostrou os sinais característicos esperados e a integração confirmou a proporção de prótons na molécula. A Tabela 1 mostra as constantes de acoplamento dos prótons a e b.

1.1	tipo de sinal	J (Hz)
а	Duplo dublete	J _{ab} (orto) =6,9; J _{ab} (meso) = 3,3
b	Duplo dublete	J _{ba} (orto) =6,9; J _{ba} (meso) = 3,3

Tabela1. Constantes de acoplamento para o BBMA.



Figura 28. Espectro de RMN de ¹H do BBMA em CDCl₃.

A rota adotada para o AABP foi baseada nos trabalhos de Lock e Walter (1942) e Marvel e Wilson (1958), sendo que o primeiro passo foi modificado. A diferença de reatividade da parte aromática e da cadeia lateral do DMA permite direcionar o ataque do bromo na posição desejada. Portanto, foi possível a utilização de bromo e luz ao invés de *N*-bromosuccinamida.

O espectro de RMN de ¹H do produto obtido (Figura 28) mostrou que a molécula é simétrica e não houve bromação no anel aromático, pois os sinais obtidos correspondem exatamente à estrutura esperada. Não se observa, também, a presença de sinais que mostrariam a formação desses possíveis subprodutos ou reagente residual (ausência do sinal do grupo metil). A recristalização em clorofórmio foi, eficiente como processo de purificação do produto.

Partindo-se de 0,55g do BBMA (1,51 mmol), obteve-se cerca de 2,4 g de sólido, o qual não corresponderia a massa esperada de produto tetrácido (0,62g para 100% de rendimento). O excesso de massa foi atribuído à presença de ácido malônico resultante da hidrólise do éster malônico residual. Logo, não foi possível determinar o rendimento dessa etapa. O espectro de massas obtido no modo ESI-mostra o pico correspondente ao íon molecular ([M-H]⁻) em m/z = 409 e as

respectivas perdas de CO₂ que ocorreram no processo de ionização gerando os íons em m/z = 365, 321, 277 (Figura 29).

A análise do ácido 9,10-antracenil-3-bispropiônico por HPLC mostrou um deslocamento no tempo de retenção em relação ao intermediário de síntese tetrácido (Figura 30). O espectro do AABP obtido pela análise por HPLC-MS no modo ESI- mostra o pico correspondente ao íon molecular ([M-H]⁻) em m/z = 321 e a perda de CO₂ que ocorre no processo de ionização, gerando o íon em m/z = 277 (Figura 31). As análises confirmaram a estrutura esperada e a ausência de sub-produtos.



Figura 29. Espectro de massas do tetrácido obtido no modo ESI-.



Figura 30. Cromatogramas do tetrácido e do AABP obtidos pela seleção dos íons no modo ESI- de m/z = 409 e 321.



Figura 31. Espectro de massas do AABP obtido no modo ESI-.

4.5 Síntese do éster 9,10-antracenil-3-bispropionato de etila

A análise do éster 9,10-antracenil-3-bispropionato de etila por HPLC mostrou um deslocamento no tempo de retenção em relação ao AABP (comparar

Figura 30 com Figura 32 A e 32 B). O espectro obtido pela análise HPLC-MS no modo ESI+ mostra o pico correspondente ao íon molecular ($[M+H]^+$) em m/z = 379 e o aduto com sódio em ($[M+Na]^+$) m/z = 396 (Figura 32 C).



Figura 32. Análise cromatográfica do ABPE

(A) Cromatograma obtido com detecção UV em λ = 260 nm. (B) Cromatograma obtido selecionando o íon em m/z = 379 correspondente ao ABPE. (C) Espectro de massas do ABPE obtido no modo ESI+.

A síntese do ABPE foi realizada com sucesso, e se torna mais interessante do que de outros captadores de ${}^{1}O_{2}$ descritos, gerando novas espectativas de utilização. Parte-se da premissa que esta sonda, sendo lipossolúvel em seu estado original, terá livre acesso ao interior das células. Aos moldes de outros marcadores e indicadores intracelulares hoje em uso, esta sonda seria hidrolisada por esterases inespecíficas presentes no citosol, produzindo o 9,10-antracenil-3bispropionato negativamente carregado no pH citosólico. Isto impediria sua saída, produzindo um acúmulo da sonda no interior da célula.

4.6 Detecção e separação por HPLC/MS/MS dos padrões de ABPE, AABP e seus respectivos endoperóxidos

Após fotossensibilização dos padrões do ABPE e AABP gerando seus produtos, estes foram analisados por HPLC-MS. As análises mostraram que AABP elui em 4,4 min (Figura 33.1A), enquanto o AABPO₂ e AABPEO₂ exibem um tempo de retenção de 21,9 min (Figura 33.1A).



Figura 33.1 Análise cromatográfica dos padrões de AABP, AABPO₂ e AABPEO₂. (A) Cromatograma dos padrões de AABP, AABPO₂ e AABPEO₂ com detecção UV em λ = 230 nm. (B) Cromatograma obtido selecioando a massa de íon com m/z= 321 correspondente ao AABP. (C) Cromatograma obtido selecionando o íon com m/z = 355

correspondente ao AABPO₂. **(D)** Cromatograma obtido selecionando m/z = 383 correnpondente ao AABPEO₂.





(E) Espectro de massa referente ao sinal em 21,9 min dos cromatogramas C e D. (F) Espectro de massa referente ao sinal em 4,4 min do cromatograma B. Obtidos no modo APCI-.

Para as análises do ABPE, utilizamos a método da injeção direta do padrão. As análises foram realizadas por MS/MS no modo de ionização APCI⁺ com voltagem do cone de 30V (Figura 33.3).



Figura 33.3 Espectro de massa do padrão de ABPE obtido do modo APCI⁺

O espectro do ABPE obtido pela análise por HPLC-MS mostra o pico correspondente ao íon molecular aduto com sódio ($[ABPE+Na^{\dagger}]^{\dagger}$) em m/z = 401 (Figura 33.3). As análises confirmaram a estrutura esperada e a ausência de sub-produtos.

4.7 Detecção de ${}^{1}O_{2}$ gerado em sistema celular através da sonda ABPE 4.7.1 Detecção indireta de ${}^{1}O_{2}$ em células mononucleares e neutrófilos

O ABPE foi utilizado como sonda no seqüestro de ${}^{1}O_{2}$ em fagócitos. Esse captador foi usado como modelo de sonda lipofílica capaz de atravessar a membrana celular, ser susceptível à hidrólise enzimática e produzir um acúmulo da sonda AABP carregada negativamente no interior da célula, onde poderá reagir com ${}^{1}O_{2}$ formando seu respectivo endoperóxido AABPO₂ (Figura 34). Também poderá ocorrer a hidrólise parcial do ABPE no interior celular, gerando assim os endoperóxidos ABPEO₂ e AABPEO₂ (Figura 33 e Figura 33.1 e 33.2).



Figura 34. Ilustração de formação dos endoperóxidos de ABPE no meio intracelular.

Imaginando que ocorre formação de ¹O₂ em outros sítios celulares, que não o fagolisossomo durante o *burst* oxidativo, utilizamos o captador ABPE para esta avaliação em leucócitos. Para tal, ativamos as células por estímulo solúvel (PMA), sem a intermediação de receptores de superfície celular. Assim não ocorre formação do vacúolo fagocitário.

Após o isolamento e contagem de PBMC e PMN (item 3.4.2) $(2,5x10^{6} \text{ células/mL})$, incubamos os mesmos com a sonda seqüestradora de ${}^{1}O_{2}$, o ABPE $(0,5\mu\text{M})$, seguido da ativação celular por PMA (16ng/mL), e posterior análise por HPLC/MS (Figura 35.1 e 35.2).



Figura 35.1 Análise cromatográfica da oxidação de AABP em fagócitos no modo negativo

(A) Cromatograma de AABP, AABPO₂ e AABPEO₂ com detecção UV em λ = 230 nm, após incubação de neutrófilos (2,5x10⁶cel/mL), tratados com ABPE (0.5mM) e ativados com PMA (16ng/mL). O meio de reação foi PBS 0,01M em pH 7,4 temperatura 37 °C, com n=4, num volume final de 300µL. (B) Cromatograma obtido selecioando a massa de íon com m/z = 321 correspondente ao AABP. (C) Cromatograma obtido selecionando o íon com m/z = 355 correspondente ao AABPO₂. (D) Cromatograma obtido selecionando m/z = 366 correspondente ao AABPEO₂ com perda de uma molécula de água. (E) Cromatograma obtido selecionando m/z = 383 correspondente ao AABPEO₂.



Figura 35.2 Espectros de massas AABP, AABPO₂ e AABPEO₂ no modo APCI- em fagócitos.

(F) Espectro de massa referente ao sinal do cromatograma B em 15V. (G) Espectro de massa referente ao sinal do cromatograma C, D e E em 30V. (H) Espectro de massa referente ao sinal do cromatograma C,D e E em 50V. Obtidos no modo APCI⁻.

Os cromatogramas e os espectros de massas das figuras 35.1 e 35.2, correspondentes à incubação dos fagócitos com ABPE estimulados com PMA, demonstram semelhança aos dos padrões das figuras 33.1 e 33.2. Foi observada a presença de um (i) ion com m/z = 366, correspondente à molécula de AABPEO₂. A hidrólise parcial do ABPE forma o AABPE que, na presença de ¹O₂ formará o endoperóxido correspondente. Esse ion foi detectado na função de perda da fragmentação neutra de 18 u.m.a. Foi possível observar o monitoramento do (ii) ion de m/z = 321 ([AABP-H])⁻ de seu (iii) endoperóxido de m/z = 355 ([AABPO₂-H])⁻ e também do (iv) ion m/z = 383 ([AABPEO₂-H])⁻.

Para a deteção do ABPE e seu endoperóxido nas células (PMN), foi necessário realizar as análises no modo positivo (Figura 35.3 e 35.4).



Figura 35.3 Análise cromatográfica da oxidação de ABPE e ABPEO₂ por fagócitos no modo positivo.

(A) Cromatograma de ABPE e ABPEO₂ com detecção UV em λ = 230 nm, após incubação de neutrófilos (2,5x10⁶cel/mL), tratados com ABPE (0.3mM) e ativados com PMA (16ng/ensaio). O meio de reação foi PBS 0,01M em pH 7,4 temperatura 37 °C, com n=4, num volume final de 300µL. (B) Cromatograma obtido selecioando a massa de íon com m/z= 435 correspondente ao ABPEO₂ formado na reação do ABPE com ¹O₂ durante a fagocitose. (C) Cromatograma obtido selecionando o íon com m/z = 420 correspondente ao ABPEO₂. (D) Cromatograma obtido selecionando m/z = 401 correspondente ao ABPE.



Figura 35.4 Espectros de massas do ABPE e $ABPEO_2$ em fagócitos. (E) Espectro de massa referente ao sinal do cromatograma B (figura 35.3) selecionando ion de m/z = 435 em 30V. (F) Espectro de massa referente ao sinal do cromatograma C (Figura 35.3) selecionando m/z = 420 em 50V. (G) Espectro de massa referente ao sinal do cromatograma D (Figura 35.3) selecionando m/z = 378 em 15V. Obtidos no modo APCI+.

A análise por HPLC-MS do éster 9,10-antracenil-3-bispropionato de etila e da formação de seu endoperóxido durante a fagocitose mostrou, no espectro obtido no modo APCI+, picos correspondentes ao (i) íon molecular do aduto com sódio ($[ABPE+Na]^+$) em m/z = 401, (ii) de seu endoperóxido aduto com sódio em ($[ABPEO_2+Na]^+$) em m/z = 435 e (iii) também do endoperóxido aduto com sódio e perda de grupo metil ($[ABPEO_2+Na-CH_3]$)⁺ (Figura 35.3 e 35.4).

Estes resultados demostram que a sonda é eficiente na captação de ¹O₂ formado por leucócitos, durante o processo de fagocitose e torna possível, a ativação celular via independente de receptor para o monitoramento de ¹O₂.

4.7.2 Avaliação do ABPE em neutrófilos e células mononucleares ativados por via receptor dependente e independente

A produção de ERO tem uma importante função na ativação de leucócitos e na destruição de patógenos (Babior, 2000). Buscando, melhor compreensão do papel do ¹O₂ em fagócitos, durante a estimulação celular, utilizamos para tal a sonda ABPE.

Uma vez comprovada a eficácia da sonda como captador de ¹O₂ intracelular, podemos agora utilizar esta técnica para uma comparação das metodologias de ativação. Enquanto a tecnologia anterior (DPA), estava restrita a ativação via zimosan, o uso do ABPE pode ser um método para ambos os casos: via receptor dependente (ZO) ou via receptor independente (PMA). A metodologia adotada foi a descrita em materiais e métodos (item 3.5), as análises foram executadas em HPLC (Figura 36).



Figura 36. Formação de AABPO₂ por neutrófilos e células mononucleares ativadas por PMA e ZO.

Valores da média \pm erro padrão da área integrada de quatro experimentos do AABPO₂ obtida, quando neutrófilos (2,5x10⁶ células/mL) e células mononucleares (2,5x10⁶ células/mL) foram estimulados com PMA (16ng/mL) e ZO (2,5x10⁷ partículas/mL) em presença do captador químico ABPE (0,5µM). O meio da reação foi PBS 0,01M, pH 7,4 temperatura 37 °C, num volume final de 300µL, para n=3. [#]p= 0,9866 e ^{##}p= 0,9293 para comparação com PMN, sugere diferença não significativa.

Podemos observar a formação diferenciada de oxigênio singlete através do AABPO₂ quando neutrófilos e PBMC foram estimulados via receptor de opsoninas (ZO) e via independente de receptor (PMA) indicando que a produção é maior quando os fagócitos são estimulados com PMA (Figura 36). A menor produção de endoperóxido nas células ativadas com ZO ocorre possivelmente por uma somatória de fatores: (i) a sonda teria que atravessar a membrana celular e também a membrana do fagolisossomo, dificultando seu acúmulo nesta região; (ii) também devemos considerar que o fagolisossomo pode possuir menos esterases que o citosol; (iii) ou talvez isto se deva ao fato de que esterases inespecíficas sejam igualmente presentes em ambos os compartimentos, e neste caso a diferença de volume de dispersão da sonda possa explicar a maior quantidade de endoperóxido fora do fagolisossomo.

A similaridade da concentração do endoperóxido, quando se usa PMN e PBMC indica produção equivalente de ¹O₂ nestas populações (não houve diferença estatística significativa entre as células) (Figura 36) visto que, PBMC é uma população heterogênea: linfócitos e monócitos. Novamente devemos considerar que monócitos representam aproximadamente 10% da população mista de PBMC, e que somente monócitos possuem MPO, portanto conclui-se que estas células produzem concentrações de ¹O₂ maiores que PMN. Com isso podemos sugerir que monócitos são os principais responsáveis pela formação de ¹O₂ durante a ativação de leucócitos. Ou talvez ¹O₂ possua outro papel nestas células além da atividade microbicida, ou que ele próprio funcione em outras vias de sinalização celular importantes na inflamação.

Novamente cabe a sugestão de que a compartimentalização da MPO é importante: em PBMC, ela está dispersa no citosol, principalmente na região perinuclear, enquanto que, em PMN, está localizada em grânulos.

4.7.3 Detecção de ${}^{1}O_{2}$ em PMN para fins de comparação entre as sondas DPA e ABPE

O papel do ${}^{1}O_{2}$ no foco infeccioso é importante uma vez que; apresenta alta reatividade frente a diferentes compostos orgânicos, é capaz de agir em diferentes compartimentos celulares com os mais variados ambientes, levando a respostas particulares frente a cada situação.

Comparando o potencial da sonda ABPE em relação ao captador DPA, pode-se verificar que não ocorre produção de DPAO₂ em PMN estimulados com PMA, utilizando o captador DPA (Figura 35). Quando utilizamos o éster ABPE verificamos que ocorre a fagocitose, com produção de endoperóxidos do ABPE, através do ¹O₂.



Figura 37. Formação de DPAO₂ e AABPO₂ por neutrófilos ativados por PMA.

Valores da média \pm erro padrão da área integrada da formação do AABPO₂ através da monitoração por HPLC, quando neutrófilos 2,5x106 células/(mL) foram estimuladas com PMA (16ng/mL) em presença dos captadores químicos ABPE (0,5mM) e DPA (2,5mM), após incubação por 60 minutos. O número de experimentos foi igual a 4. O meio da reação foi PBS 0,01M pH 7,4, temperatura 37 °C, num volume final de 300µL. *p ≤ 0,05 para comparação com DPA.

A razão para tal observação deve estar ligada à hidrofobicidade acentuada do DPA, que impede sua homogeneização e contato com as células ou, quando muito, promove seu acúmulo nas membranas, longe da ação do ¹O₂ formado durante o *burst* oxidativo.

Nossos resultados em relação a este novo captador químico o éster 9,10antracenil-3-bispropionato de etila (ABPE) demonstram que a sonda consegue atravessar a membrana celular dos leucócitos e reagir com oxigênio singlete em sítios extra fagossomo. Também abre um leque de perspectivas em relação à utilização desta sonda para pesquisa de formação de ¹O₂ em fagócitos e outros tipos celulares.

5. Conclusões

O objetivo inicial de desenvolvimento de uma metodologia adequada para mensuar à produção intracelular de ${}^{1}O_{2}$ em células do sistema imune foi alcançado pela utilização de DPA. O método de inclusão de captadores químicos de ${}^{1}O_{2}$ através da adsorção em partículas opsonizadas (zimosan) mostrou-se adequado para detecção de ${}^{1}O_{2}$ em neutrófilos e células mononucleares e eosinófilos.

A quantidade de ${}^{1}O_{2}$ detectado em fagócitos não representa todo o ${}^{1}O_{2}$ produzido por estas células, desde não se sabe a quantidade de ${}^{1}O_{2}$ que reage com componentes celulares ou ainda, a concentração de ${}^{1}O_{2}$ dentro do fagolissosomo que não é captada por DPA.

As análises preliminares dos resultados com a microscopia confocal confirmam nossos resultados de que ¹O₂ está sendo realmente formado no fagolissosomo, quando as células são ativadas por partículas opsonizadas. A padronização desta metodologia de imagens abre novas possibilidades de sua utilização.

A produção de ${}^{1}O_{2}$ em fagócitos é distinta. As diferenças observadas, na formação de ${}^{1}O_{2}$, para neutrófilos e mononucleares podem ser devido a diferentes formas de compartimentalização da enzima nestes dois tipos celulares. É possível que isto tenha uma função biológica específica, uma vez que, ${}^{1}O_{2}$ parece ser um importante sinalizador no processo inflamatório.

MLT como esperado inibe a formação de ${}^{1}O_{2}$, uma vez que reage com composto I da MPO, iniciando um ciclo peroxidásico clássico. Entretanto, observamos que o grau de inibição de ${}^{1}O_{2}$ por MLT é diferente para neutrófilos e células mononucleares amparando nossa proposta de que ${}^{1}O_{2}$ pode ser gerado em sítios específicos e desencadear atividades distintas nestas células, podendo servir como sinalizador celular.

Eosinófilos também produzem oxigênio singlete e esta produção é intensificada na presença de íons brometo, substrato de EPO. MLT também inibe

a formação parcial de ¹O₂ nessas células, como em monócitos e diferentemente em neutrófilos. Parece existir uma especificidade celular de resposta diferenciada de inibição de ¹O₂ por MLT, que parece variar de célula para célula. Neutrófilos, provavelmente, sejam um alvo inicial para os efeitos de MLT, uma vez que, nos primeiros momentos da inflamação, a migração de PMN é superior à de monócitos e eosinófilos.

Não obtivemos detecção direta de ¹O₂ por quimiluminescência, durante a fagocitose, quando PMN ou eosinófilos foram ativados *in vitro* por dois diferentes caminhos: independente ou dependente de receptores. Possivelmente porque a sensibilidade do equipamento não esteja adequada para evidenciar a presença de ¹O₂, também pela dificuldade de reação de transparência, ou talvez a supressão do ¹O₂ ocorra rapidamente, uma vez que, o meio é rico em alvos celulares, com isso reduzindo o sinal de emissão de CL a níveis não detectáveis.

Os resultados das análises com ABPE demostram que a formação de ¹O₂ é mais intensa quando fagócitos são estimulados com PMA comparados ao ZO. A menor produção de endoperóxido nas células ativadas com ZO ocorre possivelmente por uma somatória de fatores: (i) a sonda teria que atravessar a membrana celular e também a membrana do fagolisossomo, dificultando seu acúmulo nesta região; (ii) também devemos considerar que o fagolisossomo pode possuir menos esterases que o citosol; (iii) ou talvez isto se deva ao fato de que inespecíficas sejam esterases igualmente presentes em ambos os compartimentos, e neste caso a diferença de volume de dispersão da sonda possa explicar a maior quantidade de endoperóxido fora do fagolisossomo.

Observamos que a produção equivalente de ¹O₂ nestas populações (PMN e PBMC), quando utilizamos ABPE, indicam que PBMC por ser uma população heterogênia (linfócitos e monócitos), produz mais ¹O₂, pois, somente monócitos que representam, em média 10% dessa população, possuem MPO. Podemos sugerir que, monócitos são os principais responsáveis pela formação de ¹O₂ durante a ativação de leucócitos, ou talvez ¹O₂ possua outro papel nestas células além da atividade microbicida, ou que ele próprio funcione em outras vias de sinalização celular importantes na inflamação.

Nossos resultados em relação a este novo captador químico o éster 9,10antracenil-3-bispropionato de etila (ABPE) demonstram que a sonda consegue atravessar a membrana celular dos fagócitos e reagir com oxigênio singlete em sítios extra fagossomo quando comparados ao DPA, após ativação com PMA. A utilização desta sonda para pesquisa de formação de ¹O₂ em fagócitos e outros tipos celulares abre novas perspectivas.

6. Referências Bibliográficas

- Abbas, A.K, Lichtman, A.H, Pober, J.S (2004) em <u>Cellular and Molecular</u> <u>Immunology</u>, W.B. Sauders Company, Fourth edition, Philadelphia, USA.
- Aldridge, R.E., Chan, T., Van Dalen, C.J., Senthilmohan, R., Winn, M., Venge, P., Kettle, A.J. (2002). "Eosinophil peroxidase produces hypobromous acid in the airways of stable asthmatics." *Free Radical Biol. Med.*, 33, 847.
- Allen, R.C. (1984). Analytical Applications of Bioluminescence and chemiluminescence, eds.:Kricka, LJ, Stanley, PE, Thorpe, GHG & Whitehead, TP, Academic Press, London.
- Allen, R.C. (1975). "Halide dependence of the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system of the polymorphonuclear leucocytes in the phenomenon of eletronic excitation." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**, 675.
- Antolin, I., Rodriguez, C., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Uria, H., Kotler, M.L., Rodriguez-Colunga, M.J., Tolivia, D., Menendez-Pelaez, A. (1996).
 "Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes". *Faseb J.*, **10**, 882.
- Angeli, A., Gatti, G., Sartori, M. L., Del Ponte, D., Cerignola, R. (1988). "Effect of exogenous melatonin on human natural killer (NK) cell activity. An approach to the immunomodulatory role of the pineal gland. In The pineal gland and cancer, 145-156 (gupta A, Attanasio A, Reiter RJ, eds) Muller and Bass, Tubingen.
- Aubry, J.M., Rigaudy, J., Cuong N.K. (1981). "A water-soluble rubrene derivate: synthesis, properties and trapping of ¹O₂ in aqueous solution." *Photochem. Photobiol.*, **33**, 149.
- Babior, B.M. (1978). "Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes." N. Engl. *J.Med.*,**289**, 659.
- Babior, B.M. (1999)."NADPH oxidase: na update." Blood., 93, 1464.
- Babior, B.M. (2000)."Phagocytes and oxidative stress." American J. Med., 109, 33.
- Babior, B.M.; Lamberth, J.D.; Naussef, W. (2002). "The neutrophil NADPH oxidase." *Arc. Biochem. Biophys*, **397**, 342.

- Baeuerle, P.A. & Henklet, T. (1994). "Function and activation of NF-κB in the immune system." *Annu. Rev. Immunol.*, **12**, 141.
- Baeuerle, P.A. & Baltimore, D. (1988). "IKB: a specific inhibitor of the NF-κB transcription factor." *Science.*, **242**, 540.
- Baggiolini, M., Dewald, B., Bernhard, B. (1997). "Human chemokines: an update." *Annu. Rev. Immunol.*, **15**, 675.
- Bainton, D.F. (1995). "Morphology ig neutrophils, eosinophils and basophils." In:Willians, W., Beutler, E., Marshall, A.L., Barrys, S. C., Thomas, J.K.Hematology 5.ed, 753.
- Bainton, D.F., Ullyot, J.L., Farquhar, M.G. (1971). "The development of neutrophilic polymorphonuclear leucocytes in human bone marrow." *J. Exp. Med.*, **134**, 907.
- Barjavel, M.J., Mamdouh, Z., Raghbate, N., Bakouche, O. (1998). "Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes." *J. Immunol.*, **160**, 1191.
- Basu-Modak, S., Tyrrell, R.M. (1993). "Singlet oxygen: a primary effector in the ultraviolet A/near-visible light induction of the human heme oxygenase gene." *Cancer Res.*, **53**, 4505.
- Beutler. B. (2004). "Innate immunity: an overview." *Molecular Immunology.*, **40**, 845.
- Bokoch, G.M., e Knaus, U. G. (2003). "NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore." *Trends. Bichem. Sci.*, **28**, 502.
- Borish, L.C., Steinke, J.W. (2003). "Cytokines and chemokines." *J. of Allergy and Clinical Immunology.*, **111** (2, Suppl. 2).
- Borregaard, N., Tauber, A.I. (1984). "Subcellular localization of the human neutrophil NADPH oxidase b cytochrome and associated flavoprotein." *J. Biol. Chem.*, **259**, 47.
- Botsivali, M., Evans, D.F. (1979). "New trap for singlet oxygen in aqueous solution." *J.Chem. Soc. Chem. Comm.*, **24**, 1114.
- Böyum, A. (1968a). "Isolation of leukocytes from human blood. Paper II." *Scand J.Clin. Lab. Invest. Suppl.*, **97**, 31.

- Böyum, A. (1968b). "A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. Paper III." Scand J.Clin. Lab. Invest. Suppl., 97, 51.
- Böyum, A. (1968c). "Isolation of mononuclear cells and granulocyts from human blood. Paper IV." *Scand J.Clin. Lab. Invest. Suppl.*, **97**, 77.
- Breton-Gorius, J. (1991). Ultrastructure of the leukemic cell. In: Catovsky, D. *The Leukemic Cell.* 2. ed. London: Churchill Livingstone. Chap. 4, p. 91-126.
- Brown, K., Gerstberg, S. Carlson, L., Franzoso, G., Siebenlist, U. (1995). "Control of IκB-α proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science.*, 267, 1485.
- Browne, R.J., Ogryslo, E.A. (1964). "Chemiluminescence from reaction of chlorine with aqueous hydrogen peroxide." *P. Chem. Soc.*, **117**.
- Calvo, J.R., Rafii-el-Idrissi, M., Pozo, D., Guerrero, J.M. (1995). "Immunomodulatory role of melatonin: specific binding sites in human and rodent lymphoid cells." *J. Pineal Res.*, **18**, 119.
- Campbell, A.K., (1988) em <u>Chemiluminescence: Principles and Applications in</u> <u>Biology and Medicine</u>. Ellis Horwood: Chichester.
- Carrillo-Vico, A., Calvo, J.R., Abreu, P., Lardone, P.J., Garcia-Maurino, S., Reiter, R.J., Guerrero, J.M. (2004). "Evidence of melatonin synthessis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance." *Faseb J.*, **18**, 537.
- Chan, W.H., Yu, J.S., Yang, S.D. (2000). "Apoptotic signalling cascate in photosensitized human epidermal carcinoma A431 cells: involvement of singlet oxygen, c-Jun N-terminal Kinase, caspase-3 and p21-activated Kinase 2." *Biochem. J.*, **351**, 221.
- Conn, P.M., Melmed, S. (1997). Endocrinology: Basic and Clinical Principles. The Pineal Hormone-Melatonin Irina V. Zhdanova MD and Richard J Wurtman Cap 18, p. 279-290 *Humana Press Inc*. Totowa, NJ
- Corey, E.J., Taylor, W.C. (1964). "A study of the peroxidation of organic compounds by externally generated singlet oxygen molecules." *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 3881.

- Costantino, G., Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Caputi, A.P. (1998). "Protective effects of melatonin in zymosan-activated plasma-induced paw inflammation." *Eur. J. Pharmacol.*, **363**, 57.
- Cotran, R. S., Kumar, V., Robbins, S. L. (1996). Inflamação e reparação. In: <u>Patologia Estrutural e Funcional</u>. Editora Guanabara Koogan S.^a, Rio de Janeiro, R.J. 5 ed p. 45-83.
- Cuzzocrea, S., Zingarelli, B., Gilad, E., Hake, P., Salzman, A.L., Szabo, C. (1997). "Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity." *J. Pineal Res.*, **23**, 106.
- Cuzzocrea, S., Reiter, R.J. (2001). "Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury." *Eur. J. Pharmacol.*, **426**, 1.
- Dewald, B., Baggiolini, M. (1986). "Methods for assessing exocytosis by neutrophil leukocytes." *Methods Enzymol.*, **132**, 267.
- Di Mascio, P., Sies, H. (1989). "Quantification of singlet oxygen generated by thermolysis of 3,3-(1,4-Naphthylidene) dipropionate. Monomol and dimol photoemission and the effects of 1,4-diazabicyclo (2.2.2)octan.", J. Am. Chem. Soc., 111, 2909.
- Di Mascio, P., Medeiros, M.H.G., Bechara, E.J.H., Catalani, L.H. (1995). "Singlet molecular oxygen: Generation, reactivity, identification and biological effects." Ciência and Cultura., 74, 297.
- Djavaheri-Mergny, M., Mergny, J.L., Bertrand, F., Santus, R., Maziere, C., Dubertret, L., Maziere, J.C. (1996). "Ultraviolet-A induces activation of AP-1 in cultured human keratinocytes." *FEBS Lett.*, **384**, 92.
- Djeu, J.Y., Serbousek, D., Blanchard, D.K. (1990). "Release of tumor necrosis factor by human polymorphonuclear leukocytes." *Blood.*, **76**, 1405.
- Dougherty, T.J., Gomer, C.J., Henderson, B.W., Jori, G., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Peng, Q. (1998). "Photodymanic Therapy." *J. Natl. Canc. Inst.*, **90**, 889.
- Ehlers, M.R. (2000). "CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity." *Microbes and infection / Institut Pasteur.*, **2**, 289.
- EL-Hag, A., Clark, R.A. (1987). "Immunossupresion by activated human neutrophils-dependence of myeloperoxidase system." *J. Immunol.*, **139**, 2406.
- Foote, C.S., Wexler, S. (1964a). "Olefin oxidations with excited singlet molecular oxygen." *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 3879.
- Foote, C.S., Wexler, S. (1964b). "Singlet Oxygen. A probable intermediate in photosensitized autooxidation." *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 3880.
- Foote, C.S. (1991). "Definition of type I and type II photosensitized oxidation." *Photochem. Photobiol.*, **54**, 659
- Foote, C.S., Clennan, E.L (1995). In Active oxygen in chemistry, Properties and reactions of singlet dioxygen, Foote, C.S.; Valentine, J.S.; Greenberg, A. and Liebman J.F.; Eds., Vol. 2, 105.
- Foote, C.S. (1988). Detection and characterization of singlet oxygen. In PHotosensitization, Molecular, Cellular and Medical Aspects." Moreno, G., Pottier, R. & Truscott, T.G., eds), p. 125-144. Nato Asi Series, Springer-Verlag, Berlin.
- Frimer, A.A., ed. (1985). "Singlet Oxygen." CRC Press, Boca Raton, FL.
- Garcia-Maurino, S., Gonzalez-Haba, M.G., Calvo, J.R., Goberna, R., Guerrero, J.M. 1998). "Involvement of nuclear binding sites for melatonin in the regulation of IL-2 and IL-6 production by human blood mononuclear cells." *J. Neuroimmunol.*, **92**, 76.
- Gordon, S., Crocker, P.R., Lee, S.H., Morris,L., Rabinowitz, S. (1986). "Trophic and defense function of murine macrophages. In: Host-Resistance Mechanisms to Infectious Agents, Tumor and Allografts." (ed. R. S. Steinman & R. J. North), p. 121-137. New York: Rockefeller University Press.
- Grether-Beck, S., Olaizola-Horn, S., Schmitt, H., Grewe, M., Jahnke, A., Johnson, J.P., Briviba, K., Sies, H., Krutmann, J. (1996). "Activation of transcription factor AP-2 mediates UVA radiotion and singlet oxygen-induced expression of

the human intercellular adhesion molecule 1 gene." *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 14586.

- Grether-Beck, S., Bonizzi, G., Schmit. H., Felsner, I., Timmer, A., Sies, H., Johnson, J.P., Piette, J. (2000). "Non-enzymatic triggering of the ceramides signaling cascate by solar UVA radiation." *EMBO J.*, **19**, 5793.
- Grisham, M.B., Jefferson, M.M., Melton, D.F., Thomas, E.L. (1984). "Chlorination ef endogenous amines by isolated neutrophils. Ammonia-dependent bactericidal, cytotoxic, and cytolutic activities of the chloramines." *J Biol Chem.*, **259**, 10404.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1999). "Free Radicals in Biology and Medicine." 3rd ed., Oxford University *Press, Inc.*, New York.
- Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. (1998). "Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase and Bacterial Killing." *Blood.*, **92**, 3007.
- Hardeland. R., Balze, I., Poeggeler, B., Furhberg, B., Behrmann, G., Wolf, R., Meyer, T.J., Reiter, R.J. (1995). "On the primary functions of melatonin in evolution: Mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation, and scavenging of free radicals." *J. Pineal Res.*, 18, 104.
- Haslett, C. (1997). "Granulocyte apoptosis and inflammatory disease." *Br. Med. Bull.*, **53**, 669.
- Hasting, J.W., Wilson, T. (1976). "Bioluminescence and chemiluminescence." *Photochemistry and Photobiology* ., **23**, 461.
- Hazen, S. L., Zhang, R., Shen, Z., Wi, W., Podrez, E. A., MacPherson, J. C., Schimitt, D., Mitra, S. N., Mukhopadhyay, C., Chen, Y., Cohen, P. A., Hoff, H.
 F., and Abu-Sond, H. M. (1999). "Formation of nitric oxide-derived oxidants by myeloperoxidase in monocytes." *Cir. Res.*, 85, 950.
- Henderson, L.M., Moule, S.K., Chappell, J.B. (1993). "The immediate activador of the NADPH oxidase is arachidonate not phosphorylation." *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.*, **264**, 157.
- Hirata, F., Hayaishi, O., Tokuyama, T., Senoh, S. (1974). "In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin." *J. Biol. Chem.*, **249**, 1311.

- Inoue, K., Minami, Y., Taoka, Y., Ikata, T., Fukuzawa, K. (1994). "Phagocytosis and superoxide generation in human polymorphonuclear leukocytes from synovial fuid of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis, in Frontiers of Reactive Oxigen in Biology and Medicine" (eds Asaka, K. and Yoshikawa, T.) CRC Press: New York, 459-461.
- Jaworek, J., Leja-Szpak, A., Bonior, J., Nawrot, K., Tomaszewska, R., Stachura, J., Sendur, R., Pawlik, W., Brzozowski, T., Konturek, S.J. (2003). "Protective effect of melatonin and its precursor L-tryptophan on acute pancreatitis induced by caerulein overstimulation or ischemia/reperfusion." *J. Pineal Res.*, 34, 40.
- Kanofsky, J.R. (1989). "Singlet oxygen production by biological systems." *Chem. Biol. Interactions.*, **70**, 1.
- Kanofsky, J.R., Hoogland, H., Wever, R., Weiss, S.J. (1988). "Singlet oxygen production by human eosinophils." *J. of Biological Chemistry.*, **263**, 20.
- Kautsky, H. (1939). "Quenching of luminescence by oxygen." *Trans. Fraday Soc.*, **35**, 216.
- Kelly, R.W., Amato, F. (1984). "N-acetyl-5-methoxykynurenamine, a brain metabolite of melatonin, is a potent inhibitor of prostaglandin biosynthesis." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 121, 372.
- Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. (1994). "Superoxide-dependent hydroxylation by myeloperoxidase." *J. Biol. Chem.*, **269**, 17146.
- Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. (2001). "A Kinetic analysis of the catalase activity of myeloperoxidase." *Biochemistry.*, **40**, 10204.
- Khan, U.A. (1976). "Singlet molecular oxygen. A new Kind of oxygen." *J.Phys. Chem.*, **80**, 2219.
- Khan, U.A., Wilson, T. (1995). "Reactive oxygen species as cellular messengers." *Chemistry & Biology.*, **2**, 437.
- Kiryu, C., Makiuchi, M. Miyazaki, J., Fujinaga, T., kakinuma, K. (1998).
 "Physiological production of singlet molecular oxygen in the myeloperoxidase-H₂O₂-choride system." *FEBS Letters.*, **443**, 154.

- Klebanoff, S.J. (1970)."In: Biochemistry of the Phagocytes Process." (Schultz, J., Ed.) pp. 89-110, North-holland, Amsterdam.
- Klebanoff, S.J. (1991). "Myeloperoxidase: Occurrence and Biological Function in Peroxidases in Chemistry and Biology" vol. I, (eds. Everse, J., Everse, K. E., Grisham, M. B.), CRC Press, Inc., Florida, pp 1-35.
- Klebanoff, S.J. (2005). "Myeloperoxidase: Friend and Foe." *J. Leukocytes Biology.*, **77**, 1189.
- Klotz, L.O. (2002). "Oxidant-Induced Signaling: Effects of Peroxynitrite and Singlet Oxygen." *Biol. Chem.*, **483**, 443.
- Klotz, L.O., Pellieux, C., Briviba, K., Pierlot, C., Aubry, J.M., Sies, H. (1999). "Mitogen-activated protein Kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA." *Eur. J. Biochem.*, 260, 917.
- Klotz, L.O., Briviba, K., Sies, H. (1997). "Singlet oxygen mediates the activation of JNK by UVA radiation in human skin fibroblasts." *FEBS Lett.*, **408**, 289.
- Klotz, L.O., Briviba, K., Sies, H. (2000). "Mitogen-activated protein kinase activation by singlet oxygen and ultraviolet A." *Methods Enzymol.*, **319**, 130.
- Kochevar, I.E., Redmond, R.W. (2000). "Photosensitized production of singlet oxygen." *Methods Enzymol.*, **319**, 20.
- Kreitner, M., Ebermann, R., Alth, G. (1996). "Quantitative determonation of singlet oxygen. Production by porphyrins." *J. Photochem. Photobiol.*, B **36**, 109.
- Kuna, P., Reddigari, S.R., Schall, T.J., Rucinski, D., Sadick, M.,Kaplan, A.P. (1993). "Characterization of the human basophil response to cytokines, growth factors, and histamine releasing factors of the intercrine/chemokine family." *J. Immunol.*, **150**, 1932.
- Kvetnoy, I., Sandvik, A.K., Waldum, H.L. (1997). "The diffuse neuroendocrine system and extrapineal melatonin." *J. Mol. Endocrinol.*, **18**, 1.
- Lefkowitz, D.L., Mills, K., Morgan, D., Lefkowitz, S.S. (1992). "Macrophage activation and immunomodulation by myeloperoxidase." *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **199**, 204.

- Lock, G., Walter, E. (1942). Über die chlormethylierung des naphthalins und die verwendung des 1,5-di-chlormethylanaphthalins zur synthese polycyclischer ringsysteme, I. Mitteilung. *Chem. Ber.*, **75B**, 1158.
- Lopez-Gonzalez, M.A., Calvo, J.R., Segura, J.J., Guerreiro, J.M., (1993). "Characterization of melatonin binding sites in human peripheral blood neutrophils." *Biotechnol Ther.*, **4**, 253.
- Mackaness, G.B., Blander, R.V. (1967). "Cellular Immunity." Prog. Allerg., 11, 89.
- Maestroni, G.J.M. (1993). "The immunonuroendocrine role of melatonin." *J. Pineal Res.*, 14, 1.
- Maestroni, G.J. (1995). "T-helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin." *J. Pineal Res.*, **18**, 84.
- Marvel, C.S., Wilson, B.D. (1958). "Synthetic studies in the dihydropyrene series." *J. Org. Chem.*, **54**, 726.
- Massol, P., Montcourrier, P., Guillemont, J.C., Chavrier, P. (1998). "Fc receptormediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1." *Embo Journal.*, 17, 6219.
- Martinez, G.R., Ravanat; J-L., Medeiros, M.H.G., Cadet, J., Di Mascio, P. (2000) "Synthesis of a napHthalene endoperoxide as a source of ¹⁸O-labeled singlet oxygen for mechanistic studies."*J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 10212.
- Matthews, N., Neale, M.L., Jackson, S.K., Stark, J.M. (1987). "Tumor cell killing by tumour necrosis factor: inhibition by anaerobic conditions, free-radical scavengers and inhibitors of arachidonate metabolism." *Immunology.*, 62, 153.
- Matuszak, Z., Reszka, K. J., Chignell, C. F. (1997). "Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radicals: EPR and spin trapping investigations." *Free Radical Biol. & Med.*, 23, 367.

Metchnikiff, E. "Immunity in infective diseases." University Press, Cambridge, 1905

McCall, D.B., (1984). "Sodium 9,10-Bis(2-Ethylene)Anthracene Disulfate: a new water-soluble singlet oxygen trap for biological systems and polymerimmobilized naphthalene endoperoxides: a new convenient singlet oxygen generator." Tese da Wayne State University

- McCormick, M.L., Roeder, T.L, Railsback, M.A., Britigan, B.E. (1994). "Eosinophil peroxidase-dependent hydroxyl radical generation by human eosinophils." *J. Biol. Chem.*, **269**, 279.
- Michiels, C., Minet, E., Mottet, D., Raes, M. (2002). "Regulation of gene expression by oxygen: NF-κB and HIF-1, two extremes." *Free Radical Biology & Medicine.*, **33**, 1231.
- Mohan, N., Sadeghi, K., Reiter, R.J., Meltz, M.L. (1995). "The neurohormone melatonin inhibits cytokine, mitogen and ionizing radiation induced NF-Kappa B." *Biochem. Mol. Bio.I Int.*, **37**, 1063.
- Moore, P.L., Bank, H.L., Brissie, N.T., Spicer, S.S. (1978). "Phagocytosis of bacteria by polymorphonuclear leucocytes: a freeze-fracture, scanning eletron microscope, and thin section investigation of membrane struture." *J. Cell. Biol.*, **76**, 158.
- Morey, K.M., Mclachlan, J.A., Serkin, C.D., Bakouche, O. (1994). "Ativation of human monocytes by the pineal hormone melatonin." *J. Immunol.*, **153**, 2671.
- O'Brien, M., Catovsky, D., Costllo, C. (1980). "Ultrastructural cytochemistry of leukaemic cells: characterizztion of the early small endócrin of monoblasts." *British J. Hematology.*, **45**, 201.
- Ohno, Y., Seligmann, B.E., Gallin, J.I. (1985). "Cytochrome b translocation to human neutrophil plasma membranes and superoxide releae. Differential effects of *N*-formylmethionylleucylphenylalanine, phorbol myristate acetate, and A 2318." *J. Biol. Chem.*, **260**, 2409.
- Pekoe, G., Measurement, M. (1987). "Using luminol-enhanced chemiluminescence of an antioxidant radical scavenging anti-inflammatory mechanism for nonsteroidal anti-inflammatory drugs against cytotoxic neutrophil myeloperoxidase, vol III, (eds. K Van Dyke, V Castranova) CRC Press Inc, Florida, 168.
- Pierlot, C., Aubry, J.M.; Briviba, K., Sies, H., Di Mascio, P. (2000) "Naphtalene endoperoxides as generators of singlet oxygen in biological media." *Methods Enzymol.*, **319**, 3.

- Raghavendra, V., Singh, V., Kulkarni, S.K., Agrewala J.N. (2001). "Melatonin enhances Th2 cell mediated immune responses: lack of sensitivity to reversal by naltrexone or benzodiazepine receptor antagonists." *Molecular and Cellular Biochemistry.*, **221**, 1.
- Reeves, E.P., Lu, H., Jacobs, N.L., Messina, Carlo G. M., Bolsover, S., Gabella, G., Potma, E.O., Warley, A., Roes, J., Segal, A.W. (2002). "Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K + flux." *Nature.*, **416**, 291.
- Reiter, R.J. (1991). "Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and its physiological interactios." *Endocr. Rev.*, **12**, 151.
- Reiter, R.J. (1991). "Melatonin: The chemical expression of darkness." *Molec. Cell. Endocrino.*, **79**, 153.
- Reiter, R.J. Tan, D.X., Cabrera, J., D'Arpa, D., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Ramos, S. (1999). "The Oxidant/Antioxidant Network: Role of Melatonin." *Biol. Signals and Recept.*, **8**, 56.
- Reiter. R.J., Tan, D.X., Acuna-Castroviejo, D. (2000). "Melatonin: Mechanisms and actions as an antioxidant." *Curr Topics Biophys.*, **24**, 171.
- Reiter. R.J., Tan, D.X. Manchester, Lucien C.; Qi, Wenbo. (2001). "Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence." *Cell. Biochem. BiopHys.*, **34**, 237.
- Remick, D.G., Villarete, I. (1996). "Regulation of cytokine gene expression by reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates." *J. Leukoc. Biol.*, **59**, 471.
- Reppet, S.M., Weaver, D.R., Ebisawa, T. (1994). "Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses." *Neuron.*, **13**, 1177.
- Ressmeyer, A.R., Mayo, J.C., Zelosko, V., Sainz, R.M., Tan, D.X., Poeggeler, B., Antolin, I., Zsizsik, B.K., Reiter, R.J., Hardeland, R. (2003). "Antioxidant properties of the melatonin metabolite n1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction." *Redox Rep.*, **8**, 205.

- Rodrigues, M.R., Rodriguez, D., Russo, M., Campa, A. (2002). "Macrophage activation includes high intracelular myeloperoxidase activity." *Biochem. BiopHys. Res. Commun.*, **292**, 869.
- Rodriguez, C., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Antolin, I., Herrera, F., Martin, V., Reiter,
 R.J. (2004). "Regulation of antioxidant enymes: a significant role for melatonin." *J. Pineal Res.*, 36, 1.
- Roos, D., van Bruggen, R., Meischl, C. (2003). "Oxidative killing of microbes by neutrophils." *Microbes Infect.*, **5**, 1307.
- Ryter, S.W., Tyrell, R.M. (1998). "Singlet molecular oxygen: A possible effector of eukaryotic gene expression." *Free Radical Biology and Medicine.*, **24**, 1520.
- Schreck, R., Albermann, K., Baeuerle, P.A. (1992). "Nuclear factor Kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review)." *Free Radic Res. Commum.*, **17**, 221.
- Segal, A.W. (1988). "The molecular and cellular pathology of chronic granulomatous disease." *Eur. J. Clin. Invest.*, **18**, 433.
- Sewerynek, E., Reiter, R.J., Melchiorri, D. (1996). "Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: Protection by melatonin. *Hepatogastroenterology.*, **43**, 898.
- Shepherd, V.L., Hoidal, J.R. (1990). "Clearance of neutrophil-derived myeloperoxidase by macrophage mannose receptor." *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **2**, 335.
- Silva, S.O., Ximenes, V.F., Catalani, L.H., Campa, A. (2000). "Myeloperoxidasecatalyzed oxidation of melatonin by activated neutrophils." *Biochem. Biophys Res. Commun.*, **279**, 657.
- Silva, S.O., Rodrigues, M.R., Carvalho, S.R., Catalani, L.H., Campa, A., Ximenes, V.F. (2004). "Oxidation of melatonin and its catabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine and N1-acetyl-5-methoxykynuramine, by activated leukocytes." *J. of Pineal Research.*, **37**, 171.
- Spessotto, P., Dri Pietro, B.R., Zabucchi, G., Patriarca, P. (1995). "Human eosinophil peroxidase enhances tumor necrosis factor and hydrogen

peroxidase release by humam monocyte-derided macrophages." *Eur. J. Immunol.*, **25**, 1366.

- Steinbeck, M., Khan, A., Karnovsky, M. (1991). "Intracellular single oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap." *The Journal of Biological Chemistry.*, **267**, 13425.
- Steinbeck, M., Khan, A., Karnovsky, M. (1993). "Extracellular Production of Single Oxygen by Stimulated Macrophages Quantified using 9,10Diphenylanthracene and perylene in a Polystyrene Film." *The Journal of Biological Chemistry.*, 268, 15649.
- Strath, M., Warren, D.J., Sanderson, C.J. (1985). "Detection of Eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophils differentiation factors." *Journal of Immunological Methods.*, **83**, 209.
- Tan, D.X., Manchester, L.C., Burkhardt, S., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Kohen, R.M., Shohami, E., Huo, Y., Hardeland, R., Reiter, R.J. (2001). "N1-acetyl-N2formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant." *Faseb J.*, **15**, 2294.
- Tan, D.X., Manchester, L.C., Reiter, R.J., Plummer, B.F., Limson, J., Weintraub, S.T. (2000). "Melatonin directly scavenges hydrogen peroxidase: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation." *Free Radic Biol. Med.*, 29, 1177.
- Tan, D.X., Manchester, L.C., Hardeland, R., Lopez-Burillo, S., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Reiter, R.J. (2003). "Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid and antioxidant vitamin." *J. Pineal Res.*, **34**, 75.
- Tanaka, K., Miura, T., Umezawa, N., Urano, Yasuteru., Kikuchi, K., Higuchi, T., Nagano, T. (2001). "Rational design of fluorescein-based fluorescence probes. Mechanism-based desing of a maximum fluorescence probe of singlet oxygen." J. Am. Chem. Soc., **123**, 2530.
- Thomas, E.L., Bozeman, P.M., Jefferson, M.M., King, C.C. (1995). "Oxidation of bromide by the huamn leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinopHil peroxidase." *The J. Biol. Chem.*, **270**, 2906.

- Vogel, A.i. (1989) in Vogel's <u>textbook of pratical organic chemistry</u>, resivado por Furniss, B.S., Hannaford, A.J., Smith, P.W.G., Tatchell, A.R., John Wiley & Sins, Inc.
- Wasserman, S.I., Mediadores da inflamação. In: Siites, D.P., Terr, A .I., eds. Imunologia Básica. Rio de Janeiro: Prentice-Hall do Brasil, 1992. pp. 119-124.
- Wenk, J., Brenneisen, P., Wlaschek, M., Poswig, A., Briviba, k., Oberley, T.D., Scharffetter-kochanek, K. (1999). "Stable overexpression of manganese superoxide as a major oxidant in the AP-1 mediated induction of matrixdegrading metalloprotease-1." *J. Biol. Chem.*, **274**, 25869.
- Wlaschek, M., Wenk, J., Brenneisen, P., Briviba, K., Chawarz, A., Sies, H., Scharffetter-kochanek, k. (1997). "Singlet oxygen is an early intermediate in cytokine-dependent ultraviolet-A induction of interstitial collagenase in human dermal fibroblasts in vitro." *FEBS Lett.*, **413**, 239.
- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., Halbwachs-Mecarelli, L. (2000). "Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects." *Lab. Invest.*, 80(5); 617-653, 2000.
- Van Furth, R. (1985) ed. Mononuclear phagocytes: Characteristics, physiology and function. Dordrecht, the Netherlands: Martinicus Nijhoff.
- Viajayalaxim, T.C.R. Jr., Reiter, R.J. Herman, T.S. (2002). "Melatonin: From Basic Research to Cancer Treatment Clinics." *Journal of Clinical Oncology.*, **20**, 2575.
- Ying, S.W., Niles, L.P., Crocker, C. (1993). "Human malignant melanoma cells express high affinity receptors for melatonin: Antirproliferative effects of melatonin and 6-choromelatonin." *Eur. J. Pharmacol.*, **246**, 89.
- Zhang, H., Squadrito, G.L., and Pryor, W.A. (1998). "The reaction of melatonin with peroxynitrite: formation of melatonin radical cation and absence of stable nitrated products." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **251**, 83.
- Zhang, H., Squadrito, G. L., Uppu, R., Pryor, W. (1999). "Reaction of peroxynitrite with melatonin: a mechanistic study." *Chem. Res. Toxicol.*, **12**, 526.

Zhdanova, I.V. & Wurtmam, R.J. (1997). "The Pineal Hormone-Melatatonin." In: Conn, P.M. and Melmed, S. *Endocrinology: Basic and Clinical Principles*. Cap18, 279-290. Humana Press Inc. Totowa, NJ.

.

1