UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Atividade peroxidásica em macrófagos ativados *in vivo* com
concanavalina A**

Maria Rita Rodrigues

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientadora:
Profa. Dra. Ana Campa

São Paulo
2001

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

Rodrigues, Maria Rita

R696a Atividade peroxidásica em macrófagos ativados *in vivo* com
concanavalina A / Maria Rita Rodrigues. -- São Paulo, 2001.
84p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Campa, Ana

1. Bioquímica clínica I. T. II. Campa, Ana, orientador.

616.0756 CDD

Maria Rita Rodrigues

**Atividade peroxidásica em macrófagos ativados *in vivo* com
concanavalina A**

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Prof^ª. Dra. Ana Campa
Orientador/Presidente

Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti
1º Examinador

Prof^ª. Dra. Eva Burger
2º Examinador

São Paulo, 29 de outubro de 2001

Agradecimentos

A Deus, por tudo.

À Profª Ana Campa pela orientação, amizade, confiança, incentivo e ajuda em todos os momentos.

Ao Tomaz, pela compreensão, incentivo e apoio incondicional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), pelo apoio financeiro.

A toda minha família pelo carinho e apoio.

Ao Profº Momtchilo Russo e Dúnia Rodriguez pela amizade e colaboração.

Aos amigos Valdecir e Sueli pelo companheirismo e pela valiosa ajuda.

Aos amigos do laboratório: Cristiane, Fernanda, Elaine, Cristiani, Sabrina e Boni pela amizade, apoio e por fazer do ambiente de trabalho nossa segunda casa.

Ao Profº Luiz Henrique Catalani, pela contribuição e apoio.

A todos os colegas do Programa de Pós-graduação pelo auxílio e agradável convívio.

Aos amigos Idelma e Alex por terem me acolhido com tanto carinho.

Às amigas Andréia, Fernanda, Roberta e Fátima pela amizade e pelos momentos agradáveis de convívio.

À Estela Bellini pela disposição e valiosa ajuda neste trabalho.

À Fernanda Knudsen pela grande ajuda nas análises no HPLC.

Às secretárias Sueli e Márcia pela disposição e pelo bom humor.

Aos Professores do Departamento de Análises Clínicas da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas pelo incentivo.

Finalmente, a todos os professores, técnicos e funcionários que de alguma maneira estiveram envolvidos neste projeto.

ÍNDICE

1. LISTA DE ABREVIATURAS	3
2. RESUMO	5
3. ABSTRACT	6
4. INTRODUÇÃO	7
4.1 SISTEMA MONONUCLEAR FAGOCÍTICO	8
4.2 IFN-γ	9
4.3 “BURST” OXIDATIVO	11
4.4 CATALASE E GLUTATIONA PEROXIDASE	13
4.5 MIELOPEROXIDASE	15
4.6 INDOLAMINA 2,3- DIOXIGENASE (IDO)	17
4.7 COMPOSTOS INDÓLICOS BIOLÓGICAMENTE RELEVANTES	20
4.7.1 TRIPTOFANO	20
4.7.2 MELATONINA	21
5. OBJETIVOS	23
OBJETIVO GERAL	23
OBJETIVO ESPECÍFICO	23
6. MATERIAL E MÉTODOS	24
6.1 MATERIAL	24
6.1.1 REAGENTES	24
6.1.2 EQUIPAMENTOS	25
6.2 MÉTODOS	26
6.2.1 PREPARO DE REAGENTES	26
6.2.1.1 Preparo de soluções	26
6.2.1.2 Soluções e corantes para eletroforese de proteínas (SDS-PAGE)	27
6.2.1.3 Solução utilizada na transferência de proteínas para membrana de nitrocelulose	30
6.2.1.4 Soluções utilizadas na reação de <i>immunoblotting</i>	30
6.2.2 MODELO ANIMAL	31
6.2.3 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DA CAVIDADE PERITONEAL	31
6.2.4 CONTAGEM DAS CÉLULAS OBTIDAS DO PERITÔNIO	31

6.2.5 ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS POR CONCAVALINA A	32
6.2.5.1 <i>In vivo</i>	32
6.2.5.2 <i>In vitro</i>	33
6.2.6 TRATAMENTO DOS ANIMAIS COM ANTICORPO ANTI-GRANULÓCITOS	34
6.2.7 CULTURA DE CÉLULAS – THP-1	34
6.2.8 CONGELAMENTO DE CÉLULAS THP-1	34
6.2.9 DESCONGELAMENTO DAS CÉLULAS THP-1	35
6.2.10 CULTIVO DAS CÉLULAS THP-1	35
6.2.11 PREPARO DO HOMOGENATO CELULAR (THP-1 E MACRÓFAGOS PERITONEAIS)	36
6.2.12 MEDIDAS DE EMISSÃO DE LUZ	36
6.2.13 IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTO	37
6.2.14 DOSAGEM DE PROTEÍNAS (PT)	37
6.2.15 DOSAGEM DE CATALASE (CAT)	38
6.2.16 DOSAGEM DE GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX)	38
6.2.17 DETERMINAÇÃO DO HOCL	39
6.2.18 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	40
6.2.19 REAÇÃO DE IMMUNOBLOTTING	41
6.2.20 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
7. RESULTADOS	42
8. DISCUSSÃO	60
9. CONCLUSÕES	66
10. BIBLIOGRAFIA	67

1. Lista de abreviaturas

AFMK: N^1 -acetil- N^2 -formil-5-metoxiquinuramina

BSA: albumina sérica bovina

CAT: catalase

CG-MS: cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
(*Cromatography gaseous mass spectrometry*)

Con A: concanavalina A

DMSO: dimetil sulfóxido

DTNB: 5,5'-ditiobis ácido 2-nitrobenzóico

ERN: espécie reativa de nitrogênio

ERO: espécie reativa de oxigênio

GKO: IFN- γ "knockout"

GM-CSF: fator estimulador de colônias grânulo-monocíticas

GPx: glutational peroxidase

GSH: glutational reduzida

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HOCl: ácido hipocloroso

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography*)

HRP: peroxidase de rábano

IDO: indolamina 2,3-dioxigenase

IFN- γ : interferon-gamma

IL-1: interleucina-1

IL-6: interleucina-6

IL-10: interleucina-10

LPS: lipopolissacarídeo

Luminol: 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4diona

M ϕ : macrófago

MPO: mieloperoxidase

MTrp: 1-metiltriptofano

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida

NF- κ B: fator de transcrição nuclear

NO: óxido nítrico

O₂⁻: ânion superóxido

ONOO⁻: Peróxinitrito

PBS: tampão fosfato salino

PMA: acetato de forbol miristato

SFB: soro fetal bovino

SOD: superóxido dismutase

TDO: triptofano 2,3-dioxigenase

THF: tetra hidro furano

TNB: ác. 5-tio-2-nitrobenzóico

Trp: triptofano

WT: Wild type

2. Resumo

Macrófagos recuperados de peritônio de camundongos 48 horas após administração de concanavalina A (Con A) são ativados e possuem um conteúdo maior de mieloperoxidase (MPO) do que macrófagos residentes. Este aumento pode ser observado por *immunoblotting* e pelo aumento da atividade peroxidásica. Esta atividade foi avaliada pela quimiluminescência desencadeada por homogenato de macrófagos e peróxido de hidrogênio, durante a oxidação de luminol e melatonina. Os macrófagos contendo MPO são capazes de gerar ácido hipocloroso quando estimulados com acetato de forbol miristato (PMA). O aumento do conteúdo de MPO em macrófagos é um processo que independe de interferon- γ (IFN- γ), uma vez que camundongos IFN- γ -“knockout” têm uma atividade ainda maior que camundongos “wild type”. O contato entre macrófagos e neutrófilos *in vivo*, não é necessário para o incremento observado, visto que macrófagos de camundongos tratados com anticorpo anti-granulócitos preservam a atividade peroxidásica. Este achado é uma evidência de que em algumas condições a ativação de macrófagos é acompanhada por um aumento da atividade peroxidásica. Dentre o amplo espectro de ação da MPO, este processo pode ter um papel especial na inflamação. Também é de especial interesse o fato de macrófagos serem capazes de oxidar melatonina, um hormônio com vários efeitos imunomodulatórios.

3. Abstract

Macrophages recovered from mice peritoneum 48 after concanavalin-A (Con A) administration are primed and have a higher content of myeloperoxidase (MPO) than resident cells. The increase of MPO is accompanied by an increment in peroxidase activity, evaluated by the chemiluminescence during the oxidation of luminol and melatonin triggered by macrophages homogenates plus hydrogen peroxide. MPO present in macrophages are able to generate hypochlorous acid when macrophages are stimulated with phorbol myristate acetate. Interferon- γ (IFN- γ) does not participate in the process that lead macrophages to become enriched in MPO, since IFN- γ knockout mice have an even higher peroxidase activity compared to the wild type. The contact of macrophages with neutrophil in vivo seems to be not necessary for the observed increment in peroxidase since macrophages recovered from mice treated with antigranulocyte antibody preserves the peroxidase activity. These finding provides evidences that, at least in some conditions, macrophage activation is accompanied by an increment in peroxidase activity. Given the broad spectrum of action of MPO, this process might play a special role in inflammation. Also of special interest is the finding that macrophages are able to oxidize melatonin, a hormone with several immunomodulatory effects.

4. Introdução

Macrófagos e neutrófilos existem *in vivo* na forma residente e em diferentes níveis de ativação. A ativação inclui a expressão de diferentes tipos de proteínas como receptores de membrana, fatores solúveis e enzimas (1). Espécies reativas de oxigênio (ERO) parecem ser importantes em algumas vias de sinalização envolvendo ativação de fagócitos, por exemplo ativação de NF- κ B e produção de citocinas (2,3). Desta forma, é esperado que a concentração de enzimas antioxidantes e de enzimas que utilizam ERO como substrato exerçam um controle importante no estado de equilíbrio destas espécies, e consequentemente, na resposta imune. Catalase, glutathione peroxidase, indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) e peroxidases como a MPO são algumas destas enzimas. O composto I de MPO, é formado pela reação entre MPO e H_2O_2 , gerando HOCl, uma espécie altamente reativa na presença de cloreto (4). Fontes tradicionais de MPO incluem neutrófilos e monócitos do sangue, mas não macrófagos teciduais (5). Entretanto macrófagos expostos a MPO ou outras peroxidases resultam na produção de citocinas e aumento do *burst* oxidativo (6). Assim, fatores que influem na atividade peroxidásica de macrófagos são de particular interesse.

Neste trabalho nós usamos um modelo experimental no qual macrófagos são ativados *in vivo* pela administração intraperitoneal de Con A. Esta lectina é um ativador policlonal de célula T e mimetiza a ativação de macrófagos dependente de célula T. A ativação por Con A induz modificações morfológicas no macrófago, aumento da fagocitose (7) e aumento na quantidade de H_2O_2 produzido quando estimulados com PMA (8). Verificamos a quantidade de MPO presente em macrófagos residentes e macrófagos ativados com Con A, produção de HOCl por macrófagos estimulados por PMA e atividade peroxidásica de homogenatos de macrófagos. A atividade peroxidásica foi avaliada pela oxidação do luminol por homogenatos de macrófagos de peritônio de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 “knockout”-IFN- γ , e macrófagos tratados com anticorpo anti-granulócitos. Um outro objetivo deste estudo foi verificar se macrófagos residentes e macrófagos ativados com Con A eram capazes de oxidar melatonina. Sabe-se que melatonina é

oxidada por neutrófilos ativados e também pela IDO. Esta enzima está presente em linhagens monocíticas e é fortemente induzida por interferon- γ . Melatonina é um hormônio com várias ações imunomodulatórias e o papel da sua oxidação no processo inflamatório tem sido objeto de estudo do grupo.

4.1 Sistema mononuclear fagocítico

O sistema mononuclear fagocítico participa dos numerosos processos homeostáticos, imunológicos e inflamatórios. Em 1882, METCHNIKOFF (9), baseado nos seus estudos de patologia comparada da inflamação, chamou-os de “macrófagos” pela sua capacidade de ingerir grandes partículas. METCHNIKOFF, em 1905, foi o primeiro a propor que a resistência à infecção dependia do poder fagocítico e digestivo dos leucócitos. MACKANESS & BLANDEN (1967) (10) mostraram que o aumento da resistência no hospedeiro é exercido através dos macrófagos que se tornaram funcionalmente ativados.

As células do sistema mononuclear fagocítico, 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. Uma das vias de diferenciação vai dar origem às 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 (11). 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 média na circulação de aproximadamente 1 a 3 dias, passando depois aos tecidos onde se transforma em macrófago (12).

Durante o processo de maturação os macrófagos adquirem um conteúdo importante em vesículas lisossomais, além de microfibrilas e microtúbulos que dão grande motilidade e promovem a atividade fagocitária. Uma gama de enzimas está incluída nos grânulos lisossomais dos leucócitos, sendo liberadas mediante ativação destas células. Estas enzimas liberadas são capazes de degradar

macromoléculas complexas (13).

Em processos inflamatórios agudos, um número maior de polimorfonucleares migra através do endotélio vascular até alcançar os locais onde está acontecendo a reação inflamatória. Todo este processo de migração celular é controlado por moléculas de adesão, e estas por sua vez são reguladas por citocinas como, por exemplo, o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL) IL-8 e IL-1 (14).

Além disso, a produção de citocinas pelos macrófagos tem um papel importante nos processos inflamatórios, nas reações imunes e na fisiologia.

O mecanismo de ação microbida dos macrófagos não está completamente elucidado, mas sabe-se que a secreção de enzimas, mediadores lipídicos, espécies reativas de oxigênio e do nitrogênio (ERN), são importantes para o controle e eliminação de microorganismos (15).

Durante a maioria dos processos infecciosos, as células do sistema mononuclear fagocítico sofrem profundas alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais, que coletivamente distinguem o macrófago residente do ativado. LURIE (1964) (16) e posteriormente MACKANESS & BLANDEN (1967) (10) mostraram que a resistência adquirida a infecções como a brucelose, listeriose, salmonelose e tuberculose era devida à ativação dos macrófagos e que esta ativação era dependente de linfócito T. O IFN- γ produzido pelo linfócito T ativado, induz no macrófago a produção de ERO, o aumento da expressão de molécula de classe II do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) e atividade citotóxica (17).

4.2 IFN- γ

Os interferons constituem uma família de glicoproteínas sintetizadas por diferentes células em resposta à infecção viral, estimulação imunológica ou indutores químicos. O IFN- γ pode aumentar a atividade microbida do macrófago

contra toxoplasma, micobactérias e tripanosoma e também pode estimular o macrófago incrementando sua capacidade para produzir ERO (18), ERN (15), aumentar a expressão de moléculas de classe II do CPH e induzir a atividade tumoricida (19). O linfócito T é uma das células responsáveis pela produção do IFN- γ . Em camundongos foram descritos clones que podem caracterizar duas subpopulações de células T auxiliares (T "helper", Th) murinas, as quais secretam citocinas capazes de ativar macrófagos e induzir uma resposta humoral. Estas subpopulações foram denominadas respectivamente, de células do tipo Th1 e Th2, sendo que o IFN- γ é produzido por células do tipo Th1(20).

A membrana celular dos macrófagos possui vários receptores que facilitam suas funções e interações com outra célula.

Os macrófagos, assim como outras células, apresentam também carboidratos na sua superfície (21) que têm uma participação importante nas interações intercelulares e com os microorganismos como, por exemplo, a *Escherichia coli* que apresenta na sua membrana lectinas que se ligam aos carboidratos presentes na membrana de fagócitos, favorecendo a fagocitose. As lectinas apresentam uma estrutura glicoprotéica que se liga a estes carboidratos. Estas são comumente usadas em estudos imunológicos, pela sua afinidade por determinantes que estimulam células do sistema imune. Um dos efeitos mais dramáticos da interação das lectinas com células é a estimulação mitogênica, isto é, a indução de linfócitos quiescentes para um estado de crescimento e proliferação. A maioria das lectinas mitogênicas estimula apenas populações de linfócitos T, e são inativas ou inibitórias com relação à mitose de outras classes de linfócitos (22). O efeito mitogênico da Con A, lectina extraída da *Canavalia ensiformes* que se liga a glucose/manose em linfócitos T em cultura, está bem estudado (23), assim como seu efeito estimulador em culturas de fagócitos mononucleares (24). Rodriguez e Russo demonstraram que a injeção intraperitoneal de Con A resultou em um aumento da expressão de moléculas de classe II mostrando o envolvimento de IFN- γ neste modelo de estimulação de macrófagos (25).

O IFN- γ exerce um importante efeito imunomodulatório e antiproliferativo em

células tumorais e um efeito inibitório em patógenos intracelulares como *Leishmania spp.*, *T. gondii* e *T. cruzi*. (26,27,28). Este efeito é parcialmente atribuído a depleção do aminoácido essencial triptofano, através da indução da IDO (29). O aumento da expressão de IDO em células tumorais, foi proposto como um dos mecanismos de ação do efeito antitumoral do IFN- γ (30,31) através da diminuição da síntese protéica e crescimento celular (32).

4.3 “Burst” oxidativo

A geração de radicais livres por macrófagos, além do espriamento, é um parâmetro que pode ser utilizado como indicador do estado de ativação destas células.

A produção de radicais livres pode ser iniciada através de vários estímulos tais como, agentes pró-inflamatórios, microorganismos e outros estímulos à fagocitose, levando ao aumento do consumo de oxigênio. Esta reação é conhecida como “burst” oxidativo ou respiratório (33,34). Este aumento do consumo de oxigênio pode ser de duas a vinte vezes dependendo da célula e da natureza do estímulo (35), tendo como resultado a secreção do ânion superóxido (O_2^-) e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A produção de espécies reativas de oxigênio é um importante componente da ativação de macrófagos e é responsável pela atividade microbicida e tumoricida destas células. O “killing” intracelular é dependente na iniciação de um “burst” oxidativo e a subsequente geração de espécies reativas de oxigênio. Estas ERO além de destruir microorganismos, podem também causar danos às células, sendo responsáveis, por exemplo, pela destruição de tecidos associados a reações inflamatórias. Podemos citar como substâncias ativadoras que desencadeiam o processo do “burst” oxidativo bactérias, imunocomplexos, estímulos opsonizados (zymosan) e acetato de forbol miristato (PMA) (36). O PMA atua diretamente sobre a proteína C quinase que fosforila a proteína 47 kDa^{phox} e leva à organização do sistema NADPH oxidase (37,38) (Esquema1).

Esquema1. Via de estimulação do PMA para a produção de ânion superóxido em fagócitos.

O sistema NADPH oxidase produz ânion superóxido, e este por sua vez pode dismutar o peróxido de hidrogênio.

Da mesma maneira que os ERO, os ERN também são produzidos por linhagens monocíticas/ macrofágicas a partir de uma reação, catalisada pela óxido nítrico sintase, de oxidação da L-arginina formando L-citrulina e óxido nítrico. Existem duas isoformas de óxido nítrico sintase: a constitutiva e a induzida. Esta última é encontrada em fagócitos e pode ser induzida por uma variedade de endotoxinas e citocinas (39). Tem sido demonstrado que ânion superóxido reage com óxido nítrico formando peróxinitrito (ONOO^-) (40). Este pode se decompor dando origem a $\cdot\text{OH}$ e radical dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2\cdot$) (41).

A quantificação do “burst” oxidativo pode ser obtida através da

quimiluminescência na presença de luminol.

A quimiluminescência nativa que acompanha a ativação de fagócitos é decorrente da ativação de oxidases e formação de produtos de oxigenação de substratos biológicos.

A introdução de um substrato quimiluminescente, como o luminol, 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. Nesta reação é formado aminoftalato eletronicamente excitado que decai ao estado fundamental emitindo luz. A luminescência dessa reação, apesar de não poder ser utilizada para discriminar o tipo de ERO envolvido, tem sido freqüentemente usada para detecção do “pool” de ERO em sistemas biológicos, bem como a atividade peroxidásica em homogenatos celulares.

4.4 Catalase e Glutathione peroxidase

Células fagocíticas geram ERO durante o “burst” respiratório pelo sistema NADPH oxidase. (36,42). ERO causam danos não só aos fagócitos, mas também aos tecidos adjacentes, entretanto não possuem apenas este efeito, em níveis mais baixos podem agir como moléculas de sinalização, por exemplo, ativação de NF- κ B e produção de citocinas (2,3). O sistema de defesa antioxidante do organismo compreende uma gama variada de substâncias que atuam em diferentes níveis. O sistema de defesa primário é constituído por substâncias que impedem a geração de espécies reativas, ou seqüestram-nas impedindo sua interação com alvos celulares, entre elas estão as enzimas antioxidantes catalase e glutathione peroxidase. Estas enzimas têm um importante papel na resistência oxidante de células inflamatórias. Sabe-se que neutrófilos possuem atividade de catalase mais alta de todos os fagócitos, o que pode explicar, entre outros, o possível mecanismo de resistência oxidante destas células e que diferenciação de monócitos a macrófagos *in vitro* é acompanhada pela diminuição da catalase e glutathione peroxidase (43). O balanço entre a produção de oxidantes e a defesa

antioxidante pode ter um importante papel na função fagocítica e prevenção de danos oxidativos durante a fagocitose.

O sistema da Glutathione Peroxidase é assim chamado porque envolve mais de um sistema enzimático, a saber: a glutathione redutase, glicose 6-fosfato desidrogenase e a glutathione peroxidase. Essas três enzimas funcionam em conjunto para metabolizar o peróxido de hidrogênio e outros peróxidos derivados da oxidação de macromoléculas (44).

A reação catalisada pela glutathione peroxidase

é seguida de duas outras reações, onde se regenera o tripeptídeo glutathione (GSH) na sua forma reduzida e, se produz NADPH, pequena molécula que mantém o poder redutor celular.

O sistema da glutathione peroxidase está quase sempre no mesmo local celular que a superóxido dismutase (SOD), sugerindo que esta é a principal enzima que transforma o H_2O_2 , produzido pela Cu-SOD ou Zn-SOD no citosol, seja pela Mn-SOD na mitocôndria (44,45). A glutathione peroxidase é uma enzima que depende de selênio para exercer sua atividade.

A catalase é uma enzima que contém o grupo heme em seu sítio catalítico. Está presente nos peroxisomas das células dos mamíferos, e servem provavelmente, para destruir o peróxido de hidrogênio gerado pelas enzimas oxidativas localizadas dentro dessas organelas subcelulares (44-47).

A catalase tem grande capacidade de destruir o H_2O_2 : em termos de moléculas de H_2O_2 destruídas por minuto por molécula de enzima, ela é uma das mais ativas enzimas conhecidas. Porém, sua afinidade pelo H_2O_2 é baixa, sendo necessárias altas concentrações de H_2O_2 , para que ela possa trabalhar rápido. Por outro lado, a catalase transforma o H_2O_2 lentamente quando existem pequenas concentrações do mesmo (44,45).

4.5 Mieloperoxidase

MPO é uma hemoproteína tetramérica que possui 2 cadeias leves ($\cong 13.5$ kDa) e 2 cadeias pesadas ($\cong 55$ kDa) (6,48). Esta proteína representa 5% do peso seco de neutrófilos e está presente nos grânulos azurófilos citoplasmáticos (49, 50). Os monócitos contêm cerca de um terço do conteúdo de MPO quando comparados a neutrófilos. Quando monócito se diferencia a macrófago *in vivo* ou *in vitro* este conteúdo é perdido, entretanto trabalhos recentes sugerem que em algumas situações também podem estar presentes em macrófagos teciduais (51,52).

Alguns estudos sugerem que macrófagos podem adquirir atividade peroxidásica via fagocitose de neutrófilos durante o processo inflamatório (6,53,54). MPO é uma heme peroxidase clássica que na presença de íons cloreto e H_2O_2 forma um potente sistema microbicida, o HOCl. O HOCl é o principal e o mais potente oxidante microbicida produzido pelos neutrófilos. Cloraminas podem ser geradas indiretamente pela reação do HOCl com aminas (55) as quais também possuem uma ação microbicida (56).

Funções adicionais além da formação do microbicida citado foram descritas para esta enzima, tem sido sugerido que MPO pode catalisar a oxidação de uma variedade de compostos (4,57).

O mecanismo de reação da MPO envolve a reação da forma férrica (MP^{3+}) 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 o intermediário - composto I e composto II. Substratos pobres seqüestrariam o composto II e inibiriam a produção de ácido hipocloroso a não ser que O_2^- ou outra molécula do substrato esteja presente para reciclar a enzima (4). A oxidação de substratos orgânicos pode se dar também pelo envolvimento de MPO composto III ($MP^{2+}O_2$) (Esquema 2). Apesar da MPO catalisar a formação HOCl, 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 a proteína e aumento da fagocitose contrabalançariam a deficiência de MPO (58). MPO ainda parece ter um papel na nitração de proteínas, peroxidação lipídica (59) e em imunomodulação (6).

Esquema 2. Ciclos aceitos para a mieloperoxidase (4).

4.6 Indolamina 2,3- dioxigenase (IDO)

A indolamina 2,3-dioxigenase é uma heme proteína monomérica de 45 kDa localizada no citosol de monócitos/macrófagos (60-62) e encontra-se distribuída na maior parte dos órgãos de mamíferos, incluindo intestino, placenta, pulmões e sistema nervoso central (63) . Esta enzima catalisa a clivagem oxidativa do anel pirrólico de vários derivados indólicos (31,64) pela inserção de dois átomos de oxigênio (Esquema 3) (29,65). Estudos sugerem o seu envolvimento na regulação dos níveis de serotonina no cérebro e intestino delgado (64) e na degradação da melatonina (66). Para a sua máxima atividade *in vitro* requer azul de metileno e ascorbato como cofatores (sistema gerador de ânion superóxido) (67).

Esquema 3. Clivagem oxidativa do anel pirrólico de compostos indólicos catalisada pela IDO

Desde o seu descobrimento por Hayaishi (68) várias propostas de mecanismo foram feitas para a ação da IDO.

A utilização de ânion superóxido foi sugerida em base a estudos que mostram que a atividade da enzima purificada só é observada na presença de O_2^- , ou reações que geram O_2^- , e é abolida na presença de superóxido dismutase. Esses achados levaram a consideração que no primeiro passo a enzima nativa (forma férrica) se ligaria ao O_2^- formando a forma oxigenada $Fe^{3+}O_2^-$ que reagiria com o substrato formando o produto da reação (64,69). Estudos espectroscópicos subseqüentes apontaram para a reação da enzima (forma ferrosa) ao Trp (65,70) e que esta reação seria mais rápida num meio protonado (Esquema 4) (71).

Esquema 4. Efeito do pH na constante de velocidade de reação da IDO.

Diversos estudos *in vitro* caracterizaram a IDO como uma hemeoxigenase única, uma vez que a forma férrica apresenta uma alta reatividade com O_2^- (65). Se *in vivo* O_2^- é fundamental para a atividade da IDO, é ainda uma questão a ser definida (67). Incerto também é o significado biológico desta enzima. Sugestões de que ela seria importante na remoção de O_2^- *in vivo* têm sido feitas. Entretanto, experimentos *in vivo* não apóiam a hipótese de que a principal função da IDO esteja associada com sua atividade antioxidante (71,72), uma vez que, apesar da constante de velocidade de IDO com O_2^- ser maior que para outras hemeproteínas, ela é muito menor daquela observada para SOD (Tabela 1).

Tabela 1. Constante de velocidade de reação com O_2^- de algumas enzimas

Constante de segunda ordem em pH neutro
IDO = $8.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
MPO = $2.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
HRP = $7.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
CAT = $2.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
SOD = $2.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Em alguns estudos realizados com inibidores de IDO foi evidenciado que o 1-metiltryptofano (MTrp) é capaz de ligar-se ao sítio da dioxigenase de maneira similar ou idêntica ao Trp. Portanto, a substituição de hidrogênio por um grupo metil não impede a ligação do sítio da enzima ao substrato, mas sua presença interfere na oxigenação do Trp pela enzima. Alguns estudos com derivados indólicos mostraram que é necessário o nitrogênio indólico livre para a dioxigenação catalítica (73).

A indução de IDO tem um importante papel na tolerância imunológica entre mãe e feto (29). A síntese desta enzima é fortemente induzida por lipopolissacarídeos (LPS) e $IFN-\gamma$ (29-32). *In vivo*, $IFN-\gamma$ é produzido como resposta do hospedeiro a uma série de estímulos como por exemplo, a infecção.

A oxidação de compostos indólicos catalisada pela IDO, leva a formação de produtos do tipo quinurenina. Tryptofano e melatonina são exemplos de compostos indólicos de importância biológica.

A associação entre infecção, síntese de $IFN-\gamma$, aumento da expressão de IDO e aumento dos níveis de quinureninas, parece operar em processos infecciosos (74-78) e durante a ativação imune (79).

4.7 Compostos indólicos biologicamente relevantes

4.7.1 Triptofano

São relatados na literatura quatro diferentes caminhos pelos quais ocorre o metabolismo de triptofano (Trp) em mamíferos. O mais conhecido é a via serotoninérgica, ativa em plaquetas e neurônios, que converte o Trp em 5-hidroxitriptofano e em seguida, serotonina. As outras três rotas responsáveis, pelo consumo de cerca de 95% do Trp disponível, são iniciadas pela reação catalisada pela indoleamina 2,3-dioxigenase ou pela triptofano dioxigenase, que leva à metabolitos derivados de quinurenina gerando um número de compostos biologicamente ativos. O catabolismo do triptofano é controlado de maneira diferente durante a homeostasia e doença por duas enzimas distintas: TDO (triptofano 2,3-dioxigenase) e IDO (27). A primeira é exclusiva do tecido hepático e é controlada por hormônios glicocorticóides e glucagon enquanto a segunda é amplamente distribuída em diversos tecidos e tipos celulares e é fortemente induzida por IFN- γ e LPS (29,31,80). O decréscimo da atividade da TDO ocorre concomitantemente com a indução de IDO resultando em uma mudança coordenada do sítio de degradação de triptofano do fígado para os tecidos extra-hepáticos durante a resposta imune. O significado fisiológico desta dicotomia TDO/IDO no metabolismo do triptofano não está bem esclarecido (27). Apesar de ambas catalisarem a formação de produtos de abertura de anel a partir do triptofano, elas apresentam diferenças no peso molecular, possuem diferentes indutores *in vivo* e o mecanismo de reação para elas é distinto. A TDO tem especificidade pelo substrato triptofano, enquanto que a IDO atua sobre vários indóis (26,81-83). No SNC, vários dos metabólitos da via das quinureninas são neuroativos e podem ter um papel nas doenças neurológicas de origem inflamatória. Estudos recentes demonstraram que a concentração de ácido quinolínico (potente neurotoxina) e quinureninas aumentam no fluido cerebrospinal com o aumento da severidade neurológica causada por um amplo espectro de condições inflamatórias induzidas por infecções autoimunes e

processos inflamatórios (84). Como exemplo temos o quadro de demência que acompanha a AIDS (75) e malária cerebral humana (79,85). Este mesmo caminho parece operar na inibição de crescimento tumoral (65) e supressão da atividade de células T por células do trofoblasto impedindo assim a rejeição fetal durante a gravidez normal em mamíferos (86).

4.7.2 Melatonina

A melatonina, principal produto da glândula pineal, é um composto indólico que exerce influências regulatórias importantes nos vertebrados. Este hormônio é altamente lipofílico, sítios de ligação para melatonina têm sido descritos em vários tecidos periféricos de diferentes espécies (87). Seu efeito parece não depender somente da sua concentração, mas também do tempo de exposição aos tecidos e da sensibilidade dos seus receptores, a qual parece variar em função da hora do dia (88). Este hormônio é importante em várias funções fisiológicas essenciais associadas com ritmo circadiano e sazonal (89). Não existem evidências que melatonina seja estocada na glândula pineal, ou seja, é liberada diretamente na corrente sanguínea. Aproximadamente 50-70% da melatonina circula na corrente sanguínea ligada a albumina e o significado biológico desta ligação é desconhecido. A inativação da melatonina ocorre no fígado, onde é convertida em 6-hidroximelatonina pelo sistema citocromo P-450. A maior parte da 6-hidroximelatonina é excretada na urina e nas fezes. Uma parte da melatonina também pode ser convertida a *N*-acetil-5-metoxiquinurenamina no sistema nervoso central (88).

Estudos têm demonstrado que fetos e recém nascidos não produzem melatonina, porém recebem este hormônio via placenta e via leite materno. A produção de melatonina aumenta rapidamente durante o primeiro ano de vida e alcança o maior nível de concentração sérica por volta do terceiro ano, ocorrendo uma diminuição na idade adulta. Vários fatores podem explicar o declínio da concentração sérica de melatonina, dentre eles o aumento da massa corpórea e a

calcificação da glândula pineal. Podem, também, ocorrer variações nos níveis séricos de melatonina resultantes da predisposição genética (88).

Estudos dos possíveis papéis fisiológicos da melatonina ainda relatam o seu efeito sobre a maturação das gônadas (pode ter um papel no controle da reprodução no homem), além de parecer atuar sobre o sono nos seres humanos (90). Algumas células e fluidos corpóreos contêm níveis muito mais altos que no sangue, por exemplo, as células da medula óssea, bile e fluido cerebrospinal (91,92). Várias pesquisas apontam para o envolvimento deste indol na modulação da resposta imune. A influência da melatonina sobre as células do sistema imune não é conhecida, mas a presença de receptores para este hormônio em membranas de neutrófilos e monócitos foi bem caracterizada (87,93). Assim melatonina poderia ter um papel em processos inflamatórios, na verdade vários efeitos sobre a ativação de leucócitos, e produção de óxido nítrico foram observados (94-96). Além disto melatonina pode ser oxidada pela IDO, enzima envolvida na metabolização de indóis, presente em macrófagos e fortemente induzida por interferon- γ (97). Melatonina também parece influenciar o sistema imune de outras formas (98-101). Em monócitos, a melatonina induz a secreção de IL-1, IL-6, IL-10, ativa a formação de intermediários reativos de oxigênio e a citotoxicidade contra células tumorais (93,96). É descrito ainda que a síntese extrapineal de melatonina pode ocorrer em monócitos em condições inflamatórias (102). Uma das propostas para alguns dos efeitos da melatonina poderia estar associado a sua forte capacidade em sequestrar radicais livres (103,104) visto que ela é um bom doador de elétrons e reage eficientemente com radicais hidroxila (105) e peroxinitrito (106,107). A melatonina ainda estimula a expressão gênica das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx (108,109). O aminoácido L-triptofano é o precursor da melatonina. Este aminoácido é convertido a serotonina através de duas reações catalisadas respectivamente pelas enzimas triptofano hidroxilase e 5-hidroxitriptofano descarboxilase presentes na glândula pineal. A seguir, *N*-acetilação, catalisada pela enzima *N*-acetiltransferase e a posterior metilação pela hidroxindol-o-metiltransferase, produzem melatonina. Em linfócitos e monócitos este processo é marcadamente estimulado por IFN- γ (89).

5. Objetivos

Objetivo geral

O objetivo deste estudo é avaliar o potencial peroxidásico de macrófagos residentes e macrófagos ativados com Con A e se estas células são capazes de oxidar indóis como ocorre com neutrófilos ativados.

Objetivo específico

1. Avaliar a modificação no conteúdo de MPO durante a ativação de macrófagos;
2. Avaliar qual a contribuição de neutrófilos na modificação do conteúdo de MPO em macrófagos;
3. Determinar o potencial peroxidásico de macrófagos através da oxidação de luminol e melatonina;
4. Verificar se IFN- γ influencia na modificação do conteúdo de MPO em macrófagos.

6. Material e Métodos

6.1 Material

6.1.1 Reagentes

Todos os reagentes a seguir são de grau analítico:

_ Melatonina, triptofano, 1-metil triptofano, catalase (EC 1.11.1.6, de fígado bovino), glutathione redutase (EC 1.6.4.2), tert-butil hidroperóxido (TBH), azul de trypan, NADPH, 5,5'-ditiobis ácido 2-nitrobenzóico (DTNB), taurina, glutathione reduzida (GSH), dimetil sulfoxido (DMSO), acetato de forbol miristato (PMA), concanavalina A (Con A), diaminobenzidina (DAB), 2-mercaptoetanol, persulfato de amônio, *N,N,N',N'*- tetrametiletilenediamina (TEMED), albumina sérica bovina (BSA), meio de cultura RPMI 1640 (R-4130) suplementado com L-glutamina (2mM), estreptomicina (0,1 mg/mL), penicilina (100 U/mL), fluoreto de metilfenilsulfonil (PMSF), azul de coomassie G-250, azul de bromofenol, ponceau S foram obtidos da Sigma Chemical Co;

_ Azida sódica, fosfato de sódio, fosfato diácido de potássio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, cloreto de sódio, etanol, metanol, acetonitrila, tetrahidrofurano (THF), bicarbonato de sódio, reagente de Folin, sulfato de cobre, $C_4H_4KNaO_6$, ácido tricloroacético, ácido ortofosfórico, glicerina, ácido acético glacial, tween 20 foram obtidos da Merck S.A.;

_ Anticorpo policlonal anti-MPO Humana (coelho) e anti-IgG (coelho) conjugado com peroxidase - Calbiochem-Novabiochem Corporation (La Jolla - USA);

_ Anticorpo monoclonal anti-granulócitos (hibridoma RB6-8C5 produtor de IgG 2b de rato e específico para o antígeno Gr-1 de granulócitos maduros de

camundongos) e anticorpo inespecífico IgG de rato (IgG 2b) foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Momtchilo Russo – ICB – USP;

_ Soro Fetal Bovino foi obtido da Gibco BRL – Life Technologies;

_ Glicina – Ajinomoto do Brasil;

_ Acrilamida, bis-acrilamida, TRIS-base e Padrão de proteínas de baixo peso molecular (97, 66, 45, 30, 20.1 e 14.4 kDa) – Amersham Pharmacia Biotech (USA)

_ Peróxido de hidrogênio 60% foi obtido da INTEROX;

_ Lauril sulfato de sódio (SDS), membrana de nitrocelulose (poros de 0,45 µm de diâmetro) foram obtidos do BIORAD Laboratories;

_ 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4 diona (luminol) foi obtido da Aldrich Chem. Co.;

_ A água utilizada foi deionizada em equipamento MilliQ[®] (Millipore).

6.1.2 Equipamentos

a- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – HPLC Shimadzu LC-10 com detectores UV-VIS SPD-10A e Fluorescência RF535.

_ Coluna de fase reversa Sílica ZORBAZTM – Supercosil 25 cm x 4,6 mm, 5µm

_ Coluna de fase reversa C₁₈ LUNA[™] – Supercosil 25 cm x 4,6 mm, 5µm

b- Homoginizador tipo Potter-Elvehjem

c- Espectrofotômetro UV/VIS marca Hitachi modelo CR20B2

d- Espectrofotômetro UV/VIS marca Beckman modelo DU 640

e- Espectrofotômetro UV/VIS marca Shimadzu Multispec-1501

f- Luminômetro EG & G Berthold LB 96V de microplacas

- g- Balança Analítica AG 204 Mettler Toledo
- h- pHmetro Micronal B374
- i- Centrífuga de bancada, Incibrás, modelo PIN IV, rotor swing
- j- Centrífuga Refrigerada Himac CR 20B2 Hitachi, rotor RPR20-2
- k- Sped Vac Plus, modelo SC110, Savant
- l- Fluxo laminar VECO
- m- Estufa incubadora de CO₂ marca Harris , modelo CNW300A
- n- Banho –maria 37⁰ C com Agitador orbital – Gyrotory Water Bath Shaker Modelo G76
- o- Banho-maria 56⁰ C
- p- Centrífuga para eppendof, marca Beckman , modelo Allegra 21R
- q- Estufa de esterelização FABBE – Modelo 119
- r- Microscópio Invertido marca Nikon
- s- Freezer –20° C e –80° C
- t- Cilindro para Nitrogênio líquido
- u- Sonicador Branson Sonifier 450
- v- Microscópio binocular marca Nikon
- w- Cuba para eletroforese vertical (BIORAD)
- x- Placa de grafite (sistema de transferência semi-seco) – Pharmacia LKB Multiphor II)

6.2 Métodos

6.2.1 Preparo de Reagentes

6.2.1.1 Preparo de soluções

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

-Solução estoque de PMA foi solubilizada em DMSO (100µm/mL) e estocada a – 20°C. A solução de trabalho foi diluída em PBS no momento do ensaio;

-Solução estoque de catalase foi preparada em salina 0,9% na concentração de 1 mg/mL;

- Foram preparadas soluções aquosas de CaCl_2 100mM, MgCl_2 50mM, NaCl 0,9%, azida 1mM, azida sódica 1 mM, tampão TRIS-HCl 0,5 M pH 6.8, tampão TRIS-HCl 1,5 M pH 8.8, NaCl 0.9%, TBH 12 mM, reativo de Folin, CuSO_4 0.1%, $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$, SDS 4% e 10%, e H_2O_2 10mM. A melatonina 10mM foi preparada em solução etanólica 10% . Solução estoque de luminol 1mM foi obtida pela dissolução em água; a adição de NaOH foi necessária para solubilização.

6.2.1.2 Soluções e corantes para eletroforese de proteínas (SDS-PAGE)

- Solução de Acrilamida/Bis acrilamida

acrilamida	30,0 g
bis-acrilamida	0,8 g
H_2O bidestilada q.s.p.	100 ml

Os componentes foram misturados, filtrados em filtro de 0,45 µm e conservados em frasco escuro a 4°C.

- Tampão da amostra

Tris-HCl 0,5M pH6,8	2,5 ml
SDS 10 %	4,0 ml
glicerina	2,0 ml
2 mercaptoetanol	0,2 ml
azul de bromofenol a 1 %	0,01 g
H ₂ O bidestilada q.s.p.	10,0 ml

Estocado a -20°C. No momento do uso, as amostras foram diluídas com o tampão da amostra (1:2) e fervidas por 10 min.

- Tampão de corrida, pH 8,3

Tris base	30 g
glicina	144 g
SDS	10 g
H ₂ O bidestilada q.s.p.	1000 ml

Estocado à 4°C. No momento do uso, 100 ml da solução [10x] foi diluído em 900 ml de H₂O bidestilada e 1 g de SDS foi adicionado.

- Gel de empilhamento – 5 %

	2,5 ml	5 ml
H ₂ O bidestilada	1,75 ml	3,5 ml
Tris 6,8 - 0,5M	0,325 ml	0,65 ml
SDS a 10 %	50 µl	100 µl
Acrilamida/Bis	0,425 ml	0,85 ml
Persulfato de amônio 10%	25 µl	50 µl
TEMED	5 µl	10 µl

- Gel de separação – 15%

	5 ml	10 ml
H ₂ O bidestilada	1,25 ml	2,5 ml
Tris 8,8 - 1,5M	1,25 ml	2,5 ml
SDS a 10 %	50 µl	100 µl
Acrilamida/Bis	2,5 ml	5,0 ml
Persulfato de amônio 10%	25 µl	50 µl
TEMED	2,5 µl	5 µl

- Solução descorante de *Coomassie blue*

Ácido Acético Glacial	7,5 ml
Metanol	5,0 ml
H ₂ O destilada	87,5 ml

6.2.1.3 Solução utilizada na transferência de proteínas para membrana de nitrocelulose

- Tampão de transferência, pH 8,0-8,5

Tris (Hidroximetilaminometano)	3,03 g
Glicina	14,41g
Metanol	200 ml
H ₂ O bidestilada	1000 ml

6.2.1.4 Soluções utilizadas na reação de *immunoblotting*

- Solução bloqueadora

Leite desnatado (Molico)	5,0 g
PBS, pH 7,2	100 ml

- Solução diluidora do soro e do conjugado

Leite desnatado (Molico)	1,0 g
PBS, pH 7,2	100 ml

- Solução de lavagem PBS - Tween 20

Tween 20	50 µl
PBS, pH 7,2	100 ml

- Solução de revelador/substrato

Diaminobenzidine (DAB)	0,5 mg/ml de PBS, pH 7,2
H ₂ O ₂ a 30 %	1,0 µl/ml de PBS, pH 7,2

6.2.2 Modelo animal

Foram usados camundongos da linhagem C57 BL/6 (WT) e C57 BL/6 IFN- γ “knockout” (GKO) com 6-10 semanas de idade fornecidos pelo Biotério de camundongos isogênicos do Departamento de Imunologia do Instituto de Biomédicas da USP.

6.2.3 Obtenção das células da cavidade peritoneal

Os animais foram sacrificados com éter etílico e tiveram a sua cavidade peritoneal lavada com 5 mL de PBS estéril. A suspensão celular obtida por aspiração com seringa e agulha foi colocada em tubo de polipropileno de fundo curvo. O “pool” de células de ambos os grupos (residentes e ativados) foi contado e mantidos em banho de gelo até a realização dos ensaios.

6.2.4 Contagem das células obtidas do peritônio

Para a contagem das células do peritônio, foram utilizadas 9 partes da suspensão celular e 1 parte de cristal violeta a 0.05% em ac. acético a 30% . As células foram contadas em Câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada com Azul de Tripán 0.1%. Uma lâmina corada pelo método MGG modificado por Rosenfeld foi utilizada para avaliação da morfologia celular.

6.2.5 Ativação de macrófagos peritoneais por concanavalina A

6.2.5.1 *In vivo*

Os animais receberam via intraperitoneal 10 μ g de Con A / animal (diluída 200 μ L de PBS estéril). O grupo controle (M ϕ residentes) recebeu via i.p. 200 μ L de PBS estéril.

Os animais tiveram livre acesso à água e ração e foram sacrificados 48h após o estímulo. O "pool" de células (3-5 animais por grupo) foi lavado em PBS, contado e a viabilidade celular foi estimada. Foram usados homogenatos e células íntegras.

Esquema 5. Modelo de ativação de macrófagos peritoneais *in vivo* por ConA.

6.2.5.2 *In vitro*

Os animais foram sacrificados e as células obtidas do lavado peritoneal foram lavadas em PBS, contadas e mantidas em cultura com RPMI 1640- hepes modificado (suplementado com 2 mM de L-glutamina, 10% de soro fetal bovino, estreptomicina 0,1mg/mL, penicilina 100UI/mL e 2- mercaptoethanol 20 μ M) em placas de 6 poços em presença ou ausência de ConA (5 μ g/mL). As placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após 48h as células não aderentes foram removidas por lavagem da placa com PBS. As células aderentes foram removidas com auxílio de *scrapers* e lavadas em PBS.

Esquema 6. Modelo de ativação de macrófagos peritoneais *in vitro* por ConA.

6.2.6 Tratamento dos animais com anticorpo anti-granulócitos

Os animais (camundongos da linhagem C57BL/6) receberam 0,25 mg de anticorpo anti-granulócitos (RB6-8C5) ou anticorpo inespecífico (IgG 2b de rato) via intravenosa, 36 e 2 horas antes de receberem injeção intraperitoneal de Con A (10 µg) ou PBS estéril (grupo controle). 48 horas após a administração de Con A (ou PBS) os animais foram sacrificados e o lavado peritoneal recolhido. Foi feita uma contagem total e diferencial nas células coletadas. O homogenato celular foi utilizado para observar a oxidação do luminol e da melatonina na presença de H₂O₂.

OBS.: Alguns animais, injetados com anti-granulócitos e com Con A, receberam glicogênio 5% via i.p. 4 horas antes de serem sacrificados. Foi feita uma contagem diferencial neste grupo, onde foi obtido 100% de células mononucleares, mostrando a eficácia do tratamento com o anticorpo anti-granulócitos.

6.2.7 Cultura de células – THP-1

_ THP-1: linhagem monocítica humana (leucemia monocítica aguda) – gentilmente cedida pelo Dr. Hugo P. Monteiro do Hemocentro – Faculdade de Medicina -USP

6.2.8 Congelamento de células THP-1

Meio de congelamento

- 45% de SFB
- 10% de DMSO
- 45% de RPMI

Foram congeladas 1×10^6 cél / mL em criotubos (Nalgene[®]). Os criotubos foram levados ao freezer -20°C por 1 hora e 24 horas em freezer – 80°C. Após este período foram armazenadas em nitrogênio líquido.

6.2.9 Descongelamento das células THP-1

Todo o procedimento foi feito em ambiente estéril. Foram levados para o fluxo: meio de cultura (RPMI 1640) a 37°C, tubos cônicos estéreis, pipetas estéreis, gases, tubo para descarte, pipetador automático, garrafas para cultura e tubos cônicos. As células foram retiradas do nitrogênio líquido e levadas ao B.M. 37°C até descongelamento. Após descongelamento foram lavadas três vezes com o meio de cultura para retirar todo o meio de congelamento. Foram transferidas para as garrafas de cultura com meio de cultivo RPMI 1640 e incubadas em estufa 37°C, com 5% de CO₂.

6.2.10 Cultivo das células THP-1

As células da linhagem THP-1 foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 contendo Hepes (suplementado com 2 mM de L-glutamina, 10% de soro fetal bovino, estreptomicina 0,1mg/mL, penicilina 100UI/mL e 2- mercaptoethanol 20μM) em garrafas Nunc® de 75 cm³ e 25 cm³. Foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e o meio foi substituído a cada 2 dias. As células foram lavadas com PBS (centrifugadas a 200g por 10 min a 4° C) para a retirada do meio de cultura, o "pellet" foi ressuspenso em 1 mL de PBS e contadas em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi feita com azul de tripan 0.1%. Foram utilizadas células íntegras e homogenatos.

Esquema 7. Modelo experimental usando a linhagem monocítica THP-1.

6.2.11 Preparo do homogenato celular (THP-1 e macrófagos peritoneais)

As células foram centrifugadas a 200g por 10 min a 4°C e ressuspensas em 1 mL de PBS, contadas e homogeneizadas com o auxílio de um Homogeneizador tipo Potter- Elvehjem por 1.5 min em velocidade máxima em banho de gelo. Após a homogeneização das células a viabilidade celular foi conferida novamente para avaliar a eficiência do processo. Este procedimento rompe cerca de 100% das células.

6.2.12 Medidas de Emissão de Luz

A intensidade de quimiluminescência foi acompanhada em luminômetro EG &G Berthold LB 96V de microplacas num volume final de 0,3 mL. A reação com células intactas foi iniciada com PMA (16 ng/ensaio) e com homogenatos celulares foi iniciada com H₂O₂ (0,5 mM). Os substratos (melatonina, triptofano e luminol) foram usados na concentração de 1 mM. Azida sódica também foi usada nesta

concentração. Todas as reações foram feitas em PBS, pH 7,4, 37°C e foram acompanhadas por 30 minutos.

6.2.13 Identificação de produto

A formação de produtos foi monitorada por HPLC. As amostras com melatonina foram liofilizadas e ressuspensas em 100 μ L de THF e alíquotas de 30 μ L foram injetadas em coluna de sílica, a fase móvel usada foi acetonitrila e THF na proporção 1:1. O fluxo usado foi de 0.4 mL /min, a absorbância foi medida em 254 nm e a fluorescência com excitação em $\lambda = 340$ nm e emissão em $\lambda = 450$ nm (110). Foram usados padrões de melatonina e AFMK para comparar o tempo de retenção. As amostras com triptofano foram injetadas em coluna C₁₈, neste caso a fase móvel foi tampão fosfato 0.001 M, pH 4.0 (95%): acetonitrila (5%). O fluxo usado foi de 1,0 mL/min, a absorbância foi medida em 254 nm e a fluorescência com excitação em $\lambda = 325$ nm e emissão em $\lambda = 435$ nm. Foi utilizado padrão de triptofano e quinurenina para comparar o tempo de retenção.

Obs.: No homogenato de macrófagos peritoneais (obtido dos grupos controle e ativados *in vivo* com conA) foram feitas dosagens de proteínas, catalase e glutationala peroxidase, nestes casos o homogenato foi centrifugado a 2.500 rpm por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi usado.

6.2.14 Dosagem de Proteínas (Pt)

As proteínas foram dosadas no sobrenadante de homogenatos do lavado peritoneal dos animais dos grupos ativados e controle através do método de LOWRY *et al.* (111) usando albumina bovina como padrão.

6.2.15 Dosagem de Catalase (Cat)

A catalase foi determinada de acordo com o método descrito por Ernest Beutler (112).

Branco: Tris HCl 1 M ,EDTA 5mM ,pH 8.0 50 μ L + 930 μ L H₂O

Teste: Tris HCl 1 M ,EDTA 5mM ,pH 8.0 50 μ L + 30 μ L H₂O + 900 μ L H₂O₂ 10mM

Após 10 minutos de incubação a 37°C adicionar 20 μ L de amostra (homogenato celular) no branco e no teste. Usando cubetas de quartzo fazer a leitura do tubo Teste contra o Branco em 230 nm em lâmpada de deutério. Monitorar o consumo de H₂O₂ por 4 (quatro) min .

6.2.16 Dosagem de Glutathione Peroxidase (GPx)

A GPx foi determinada de acordo com o método descrito por Albrecht Wendel (113).

Em uma cubeta de Quartzo foi adicionar respectivamente:

- 100 μ L de Tampão fosfato de potássio 0.25 M, pH 7.0, contendo 2.5 mM Na₂EDTA e 2.5 mM de azida sódica
- 100 μ L de glutathione redutase em PBS 0.1 M (atividade/mL: 6 μ mol/min a 25°C)
- 100 μ L de glutathione reduzida 10 mM (solução aquosa)
- 100 μ L de NADPH 2.5 mM em solução 0.1% de NaHCO₃
- 500 μ L de solução teste

Incubar 10 min a 37° C. Iniciar a reação com 100 μ L de t-BOOH 12 mM

Volume final 1 mL

Ler em 366nm por 6 (seis) minutos o decréscimo de NADPH

Obs.: Deve-se avaliar o decaimento espontâneo da reação no controle sem homogenato. Este valor será subtraído do tubo contendo enzima.

6.2.17 Determinação do HOCl

A formação de HOCl foi acompanhada por espectrofotometria baseada na formação de taurina-cloramina resultante da reação de ácido hipocloroso com taurina. M ϕ ativados *in vivo* com ConA e M ϕ residentes (grupo controle) (2.10⁶ células/mL) foram incubados com taurina (15 mM) e PMA (100 ng/mL) a 37°C sob suave agitação. Após 30 minutos a formação de taurina-cloramina será estimada pela oxidação do ác. 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) a 5,5'-ditiobis ácido 2-nitrobenzoico (DTNB) pela taurina - cloramina (114).

Figura 1. Oxidação do ác. 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) a 5,5'-ditiobis ácido 2-nitrobenzoico (DTNB) pela taurina- cloramina

6.2.18 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os Mφ peritoneais foram lisados em tampão Tris-HCL pH 8,0 contendo 150 mM de NaCl, 0,02% NaN_3 , 0,1% de SDS e 100 mg/mL de fluoreto de metilfenilsulfonil (PMSF). Após centrifugação, a concentração de proteínas das amostras foi dosada de acordo com o método de Bradford (115) (microensaio).

A eletroforese de proteínas foi realizada em gel de separação de 15 %, sob o gel de empilhamento a 5 % de acrilamida. As amostras contendo 200 μg de proteínas foram desnaturadas por fervura em banho-maria em tampão de amostra por 10 minutos. A eletroforese foi realizada em cuba vertical a 120V. Foi utilizado um padrão de baixo peso molecular (97, 66, 45, 30, 20.1 e 14.4 kDa). Os géis foram corados com *Coomassie blue* e descorados até completa visualização das bandas protéicas ou submetidos à transferência para membrana de nitrocelulose.

6.2.19 Reação de immunoblotting

As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (com poros de 0,45 μm de diâmetro). As membranas e os papéis de filtro ficaram imersos no tampão de transferência até serem montados na placa de grafite do sistema de transferência semi-seco (Pharmacia LKB Multiphor II). A transferência foi conduzida por 1 hora e 30 minutos a uma amperagem constante de 1 mA/cm^2 de membrana. Após a transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau a 0,5 % por aproximadamente 5 minutos (até o aparecimento das bandas protéicas). As membranas foram descoradas com água destilada e bloqueadas com leite desnatado a 5 % por toda a noite em geladeira, sob agitação leve e constante.

Após o bloqueio, as membranas foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo específico anti-MPO (diluído 1:800 em leite desnatado a 1 % em PBS) por 1 hora e 30 minutos à 37°C. Em seguida, foram lavadas 2 vezes com PBS-Tween 20 e uma vez com PBS sem Tween (10 minutos cada lavagem). A identificação do anticorpo que reagiu com as proteínas na membrana foi feita pela adição de um antissoro anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (diluído 1:2000 em leite desnatado a 1 % em PBS). Após 1 hora e 30 minutos à 37°C, membranas foram lavadas novamente, como descrito acima, e a reação foi revelada com uma mistura de diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio a 30 %. A reação foi bloqueada com água destilada.

6.2.20 Análise estatística

A análise estatística utilizada foi a Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey-Kramer Multiple Comparisons. O nível de significância foi de 95%, onde * equivale a $p \leq 0.05$, ** a $p \leq 0.005$ e *** a $p \leq 0.001$.

7. Resultados

Oxidação do luminol por homogenatos de macrófagos residentes e macrófagos ativados com Con A

A Figura 2 mostra que homogenatos de macrófagos residentes e macrófagos ativados com Con A catalisam eficientemente a oxidação do luminol em presença de H_2O_2 . Esta oxidação foi avaliada por quimiluminescência e a intensidade da luminescência foi devido à atividade peroxidásica. Nenhum dos controles da reação, ou seja, homogenato/ H_2O_2 , luminol/ H_2O_2 ou homogenato/ luminol, foram capazes de desencadear quimiluminescência nas mesmas condições de ensaio. Nestes resultados pode ser observada uma quimiluminescência cerca de 20 vezes maior para as células originadas de camundongos tratados com Con A.

Figura 2. Cinéticas de emissão de luz obtidas quando homogenatos de macrófagos peritoneais (1×10^6 células/ensaio) de C57BL/6 foram incubados com luminol (1mM) e H_2O_2 (0.5 mM). Foram utilizadas células ativadas (vermelho) ou não (azul) *in vivo* por Con A. O meio da reação foi PBS 0.01M pH 7.4, temperatura 37°C num volume final de 300 μ L. Representativo de 10 experimentos.

A origem da atividade peroxidásica encontrada nos macrófagos ativados com Con A pode ser devido a MPO, IDO e outras enzimas como catalase e glutathione peroxidase. O aumento de atividade de catalase e glutathione peroxidase, como sendo responsáveis pelo incremento na atividade peroxidásica destas células foi excluído, visto que a atividade de ambas foi essencialmente a mesma para macrófagos residentes e macrófagos ativados com Con A (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade de Glutathione peroxidase e catalase em macrófagos residentes e macrófagos ativados in vivo com Con A (1.10^6 células) de peritônio de camundongos WT. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 6 experimentos

	Mϕ residentes	Mϕ ativados com ConA
Glutathione peroxidase (U)	0.94 ± 0.19	0.99 ± 0.08
Catalase (U)	10.42 ± 5.77	9.22 ± 4.36

A atividade peroxidásica encontrada nos macrófagos ativados com Con A foi fortemente inibida pela adição de azida (Figura 3). Apesar de azida não ser um inibidor específico, possui um forte efeito inibitório sobre a atividade de mieloperoxidase (4).

Figura 3. Efeito de azida sobre homogenato de MO peritoneais ativados ou não com Con A e tratados com H_2O_2 e luminol. Valores da média $\pm$ erro padrão da área integrada de emissão de luz obtida quando macrófagos peritoneais (1×10^6 células/ensaio) de C57BL/6 foram incubados com luminol (1mM) e H_2O_2 (0.5 mM) na ausência (barra azul; n=10) e presença (barra hachurada; n=7) de azida (1mM). O meio da reação foi PBS 0.01M pH 7.4, temperatura $37^\circ C$ num volume final de $300 \mu L$. *** $p \leq 0,001$ para diferente de residente e ### $p \leq 0,001$ para diferente da reação sem azida.

Quantidade relativa e atividade de MPO em macrófagos residentes e macrófagos ativados in vivo com Con A

O *immunoblotting* com anticorpo anti-MPO (Figura 4) mostra claramente que o conteúdo da proteína MPO em macrófagos ativados com Con A é maior do que o encontrado em macrófagos residentes. Apesar do anticorpo usado ser de origem humana, ele reage eficientemente com MPO de camundongos (48). Para verificar se a mieloperoxidase encontrada nos macrófagos residentes e ativados com Con A apresentavam atividade de cloração, a produção de HOCl em macrófagos estimulados com PMA, foi avaliada. A produção de HOCl depende da conversão da MPO nativa em MPO-composto I promovida pelo H_2O_2 . A produção de H_2O_2

por macrófagos ativados com Con A foi previamente descrita (8,25) e como mostrado na Figura 5 macrófagos ativados respondem eficientemente ao PMA, produzindo HOCl.

Figura 4. Níveis de MPO em macrófagos residentes e macrófagos ativados com Con A. As amostras (200 μ g de proteínas) foram separadas por eletroforese em gel de acrilamida 15% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Para o *immunoblotting* foi usado anticorpo IgG (coelho) anti-MPO humana (diluído 1:800) para cadeia pesada ($\cong$ 59 kDa). Como anticorpo secundário foi utilizado anticorpo anti-IgG (coelho) conjugado com peroxidase (diluído 1:2000). A imunoreatividade foi detectada com uma mistura de DAB (0.5 mg/dL) e H_2O_2 30% (1 μ L/mL). n = 3.

Figura 5. Produção de HOCl por macrófagos residentes e macrófagos ativados com Con A ($2 \cdot 10^6$ células/mL) estimulados com PMA (100 ng/mL) medidos pela formação de taurina-cloramina. A taurina-cloramina foi medida pela oxidação de TNB. O gráfico de barras mostra os valores de média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos. *** $p < 0.001$ para diferença entre macrófagos residentes e macrófagos ativados com Con A.

Quimiluminescência amplificada por luminol em macrófagos estimulados com PMA

A Figura 6 compara a quimiluminescência amplificada por luminol de macrófagos residentes e macrófagos ativados com Con A. Como esperado, a partir de dados obtidos pela produção de H_2O_2 (8,25) e da atividade peroxidásica (Figura1), a quimiluminescência amplificada por luminol desencadeada por PMA foi aproximadamente 7 vezes maior em macrófagos ativados com Con A quando comparadas com macrófagos residentes. Nenhum dos controles da reação, macrófagos/ PMA, luminol/ PMA ou macrófagos/ luminol, foram capazes de desencadear quimiluminescência nas mesmas condições de ensaio. Curiosamente, porém não obrigatoriamente, a maioria dos experimentos com

macrófagos ativados com Con A, mostrou um perfil cinético bifásico. Este tipo de perfil normalmente é encontrado quando fagócitos são estimulados com material particulado, mas não com estímulos solúveis. Esta cinética bifásica pode estar representando peroxidases de compartimentos diferentes. A contribuição da MPO na quimiluminescência amplificada por luminol é evidenciada pela inibição produzida pela adição de azida. Visto que a quimiluminescência amplificada por luminol reflete tanto a produção de ERO quanto à atividade peroxidásica, não pode ser usada para avaliar separadamente nenhum destes parâmetros. Este é um ponto importante e mostra que o ensaio de quimiluminescência amplificada por luminol, normalmente usado para estimar o “burst” oxidativo, não pode ser usado com esta finalidade quando populações celulares com diferentes conteúdos de peroxidase são comparados.

Figura 6. Cinéticas de emissão de luz obtidas quando macrófagos peritoneais de C57BL/6 (1×10^6 células/ensaio) foram incubados com luminol (1mM) e PMA (16ng/ensaio). Foram utilizadas células ativadas (vermelho) ou não (azul) *in vivo* por Con A. O meio da reação foi PBS 0.01M pH 7.4, temperatura 37°C num volume final de 300 μ L. Representativo de 9 experimentos.

Oxidação do luminol por homogenatos de macrófagos residentes e macrófagos ativados in vivo com Con A de camundongos tratados com anticorpo anti-granulócitos

A participação de neutrófilos no incremento de MPO observado em macrófagos ativados com Con A foi verificada através de experimentos com camundongos tratados com anticorpo monoclonal anti-granulócitos antes da administração de Con A. A administração do anticorpo anti-granulócitos inibiu completamente a migração de neutrófilos que antecede a migração de macrófagos (vide Material e Métodos). Os macrófagos migrados em resposta a injeção intraperitoneal de Con A, não tiveram contato com neutrófilos nem com MPO liberada de neutrófilos no foco inflamatório. Esta é a condição aceita para macrófagos ficarem enriquecidos com MPO. Como mostra a Figura 7, homogenatos de macrófagos ativados com Con A de camundongos previamente tratados com anticorpo anti-granulócitos, oxidam luminol com uma magnitude comparável aos camundongos não tratados.

Figura 7. Cinéticas de emissão de luz obtidas quando homogenatos de macrófagos peritoneais (1×10^6 células/ensaio) de C57BL/6 tratados com anticorpo anti-granulócitos foram incubados com luminol (1mM) e H_2O_2 (0.5 mM). Foram utilizadas células ativadas (rosa) ou não (azul) *in vivo* por Con A. O meio da reação foi PBS 0.01M pH 7.4, temperatura $37^\circ C$ num volume final de $300 \mu L$. Representativo de 2 experimentos.

Oxidação do luminol por homogenatos de macrófagos residentes e macrófagos ativados com Con A de camundongos IFN- γ “knockout”

IFN- γ é um potente ativador do sistema imune e exerce uma gama de efeitos em macrófagos. Neste estudo foi verificada participação de IFN- γ no aumento de atividade peroxidásica observada em macrófagos ativados com Con A. Como pode ser observado na Figura 8, IFN- γ não tem nenhuma participação na aquisição de atividade peroxidásica pelos macrófagos ativados com Con A, uma vez que, curiosamente, camundongos IFN- γ “knockout” (GKO) apresentaram uma

atividade peroxidásica ainda maior do que camundongos “wild type” (WT). Embora a atividade peroxidásica de macrófagos residentes de camundongos GKO ter sido visualmente maior do que a atividade de macrófagos residentes de camundongos WT, isto não foi estatisticamente diferente.

Figura 8. Valores da média $\pm$ erro padrão da área integrada de emissão de luz obtida quando homogenatos de macrófagos peritoneais ativados por Con A (barra vermelha) e macrófagos residentes (barra hachurada) (1×10^6 células/ensaio) foram incubados com luminol (1mM) e H_2O_2 (0.5 mM). Os dados representam a média $\pm$ erro padrão de 10 experimentos p/ WT (in vivo), 5 experimentos p/ GKO e 4 experimentos p/ WT (in vitro). A situação in vivo e in vitro foram previamente explicadas em Material e Métodos. O meio da reação foi PBS 0.01M pH 7.4, temperatura 37°C num volume final de 300 μ L. WT(C57BL/6), GKO (C57BL/6 INF- γ knockout).

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$.

Oxidação do luminol por homogenatos de macrófagos residentes cultivados na presença de Con A

Como controle, para verificar se Con A por si só, afetava o conteúdo peroxidásico em macrófagos, as células residentes foram cultivadas na presença de Con A por 48 horas. Como mostra a Figura 8, o tratamento *in vitro* com Con A não foi capaz de causar o aumento de atividade peroxidásica de macrófagos. A atividade peroxidásica de macrófagos recém retirados do peritônio ou cultivados por 48 horas na presença ou ausência de Con A foi essencialmente a mesma. Neste caso não houve contato dos macrófagos com outros componentes inflamatórios e uma diminuição drástica da atividade peroxidásica foi observada quando comparada com macrófagos ativados *in vivo* com Con A (Figura 8). Neste sentido, também foram feitos alguns experimentos com THP-1 (linhagem monocítica), estas células expressam MPO, entretanto não se observou atividade peroxidásica significativa nestas células (dados não mostrados).

Oxidação de melatonina por homogenatos de macrófagos residentes e macrófagos ativados *in vivo* com Con A

Atualmente tem sido reconhecido que MPO pode ter uma ampla participação no processo inflamatório que vai além da produção de HOCl. Recentemente nosso grupo mostrou que HRP ou MPO na presença de H_2O_2 e também neutrófilos ativados oxidam melatonina (110). A oxidação de melatonina catalisada por MPO gera N^1 -acetil- N^2 -formil-5-metoxiquinuramina (AFMK). Como mostrado na Figura 9, homogenatos de macrófagos mais H_2O_2 são capazes de oxidar melatonina a AFMK. Este produto é fluorescente e pode ser isolado por HPLC. A quantidade de AFMK formada foi bem maior ($\cong 3.5$ vezes) em homogenato de macrófagos ativados com Con A comparado com homogenato de macrófagos residentes. Como mostrado anteriormente, a oxidação de melatonina é acompanhada por quimiluminescência, AFMK no estado excitado é a provável

espécie emissiva (110). Nenhum dos controles da reação, ou seja, homogenato/ H_2O_2 , melatonina/ H_2O_2 ou homogenato/ melatonina, foram capazes de desencadear quimiluminescência nas mesmas condições de ensaio. Como observado nas Figuras 10 e 11 a quimiluminescência que acompanha a oxidação da melatonina é também muito mais alta em macrófagos ativados com Con A que em macrófagos residentes ($\cong 7$ vezes) e é fortemente inibida pela azida.

Figura 9. Perfil cromatográfico (HPLC) da reação homogenato de macrófagos peritoneais de C57BL/6 (1×10^6 células/ensaio)/ melatonina(1mM)/ H_2O_2 (0.5mM). Foram utilizadas células ativadas (vermelho) ou não (azul) *in vivo* por Con A. Foi utilizado detector de fluorescência. O meio da reação foi PBS 0.01M, pH 7.4, temperatura 37°C num volume final de 300 μL . Representativo de 5 experimentos.

Figura 10. Cinéticas de emissão de luz obtidas quando homogenatos de macrófagos peritoneais (1×10^6 células/ensaio) de C57BL/6 foram incubados com melatonina (1mM) e H_2O_2 (0.5mM). Foram utilizadas células ativadas (vermelho) ou não (azul) *in vivo* por Con A. O meio da reação foi PBS 0.01M pH 7.4, temperatura 37°C num volume final de 300 μ L. Representativo de 13 experimentos.

Figura 11. Efeito de azida sobre homogenato de Mφ peritoneais ativadas ou não com Con A e tratados com H₂O₂ e melatonina. Valores da média $\pm$ erro padrão da área integrada de emissão de luz obtida quando homogenatos de macrófagos peritoneais (1×10^6 células/ensaio) de C57BL/6 foram incubados com melatonina (1mM) e H₂O₂ (0.5 mM) na ausência (barra azul; n=13) e presença (barra hachurada; n=8) de azida (1mM). O meio da reação foi PBS 0.01M pH 7.4, temperatura 37°C num volume final de 300 μ L. *** $p \leq 0,001$ para diferente de residente e ### $p \leq 0,001$ para diferente da reação sem azida.

Além da MPO, melatonina também é oxidada a AFMK pela enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), aqui foi verificado o efeito de 1-metil-triptofano (um inibidor de IDO) (116) na oxidação da melatonina por macrófagos ativados com Con A. 1-metil-triptofano não teve nenhum efeito na formação de AFMK ou na quimiluminescência (dados não mostrados).

Similarmente ao que ocorreu com a quimiluminescência originada pela oxidação do luminol (Figura 2), homogenatos de macrófagos ativados com Con A de camundongos GKO desencadearam uma quimiluminescência ainda maior que a de macrófagos primados com Con A de camundongos WT (Figura 12). Também do mesmo modo que aconteceu com a quimiluminescência originada pela oxidação do luminol, macrófagos cultivados com Con A não tiveram atividade sobre melatonina (Figura 12). Observando as Figuras 8 e 12, é notável a similaridade entre a oxidação da melatonina e do luminol por macrófagos obtidos em diferentes condições. Isto enfatiza que ambos substratos são oxidados por algumas enzimas.

Figura 12. Valores da média $\pm$ erro padrão da área integrada de emissão de luz obtida quando homogenatos de macrófagos peritoneais ativados por Con A (barra vermelha) e macrófagos residentes (barra hachurada) (1×10^6 células/ensaio) foram incubados com melatonina (1mM) e H_2O_2 (0.5 mM). Os dados representam a média $\pm$ erro padrão de 13 experimentos p/ WT (in vivo), 5 experimentos p/ GKO e 4 experimentos p/ WT (in vitro). As situações in vivo e in vitro foram previamente explicadas em Material e Métodos. O meio da reação foi PBS 0.01M pH 7.4, temperatura 37°C num volume final de 300 μ L. WT(C57BL/6), GKO (C57BL/6 INF- γ knockout). $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$.

Oxidação de melatonina por macrófagos estimulados com PMA

Como descrito para neutrófilos ativados com PMA (110), macrófagos estimulados com PMA também formou AFMK (Figura 13). O sinal de AFMK em macrófagos ativados com Con A foi maior que em macrófagos residentes ($\cong 5.5$ vezes). A quimiluminescência é observada apenas em macrófagos ativados com Con A (Figura 14). Esta quimiluminescência é de muito baixa intensidade, dura vários minutos e depende da adição de todos os reagentes.

Figura 13. Perfil cromatográfico (HPLC) da reação macrófagos peritoneais de C57BL/6 (1×10^6 células/ensaio)/ melatonina(1mM)/ PMA (16 ng/ensaio). Foram utilizadas células ativadas (vermelho) ou não (azul) *in vivo* por Con A. Foi utilizado detector de fluorescência. O meio da reação foi PBS 0.01M, pH 7.4, temperatura 37°C num volume final de 300 μ L. Representativo de 5 experimentos.

Figura 14. Cinéticas de emissão de luz obtidas quando macrófagos peritoneais de C57BL/6 (1×10^6 células/ensaio) foram incubados com melatonina (1mM) e PMA (16ng/ensaio). Foram utilizadas células ativadas (vermelho) ou não (azul) *in vivo* por Con A. O meio da reação foi PBS 0.01M pH 7.4, temperatura 37°C num volume final de 300 μ L. Representativo de 14 experimentos.

Observações:

- As escalas das figuras 2,7,10,14 e 3,8,11,12 são comparáveis.
- Além da melatonina, triptofano também foi utilizado, porém macrófagos ativados com Con A não foram capazes de oxidar o triptofano.

8. Discussão

A produção de ânion superóxido e outras espécies reativas derivadas deste ocorre em diversos tipos celulares, mas é em fagócitos, através do sistema NADPH oxidase, que esta produção torna-se mais acentuada. Neste caso a produção de ERO tem uma importante função na destruição de patógenos invasores (15,18,42). O ânion superóxido formado neste sistema, possui baixa atividade microbida, entretanto pode originar espécies que irão reagir com substratos endógenos, formando moléculas com uma maior ação microbida. Além da função microbida as ERO estão envolvidas com eventos de sinalização, como exemplo ativação de NK-kB e algumas citocinas (2,3). Neste sentido é esperado que a concentração de enzimas que utilizam ERO como substrato ou co-substrato exerça um controle no “pool” intracelular destas espécies e consequentemente na resposta imune. Catalase, glutathione peroxidase, IDO e MPO são algumas destas enzimas. Em neutrófilos, o alto conteúdo de MPO, leva a uma produção subsequente de HOCl, cloraminas e oxigênio singlete (4), sendo que o HOCl é o mais potente oxidante microbida produzido pelos neutrófilos (55,56).

Macrófagos, geralmente são recrutados para o sítio inflamatório após neutrófilos. Os mecanismos microbicidas destas células são similares, sabe-se que a secreção de citocinas, enzimas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são importantes no controle e eliminação de microorganismos. Macrófagos ainda participam da apresentação e depuração de antígenos, células mortas e também no reparo de tecidos do hospedeiro (53,54). Alguns estudos sugerem que macrófagos podem adquirir MPO via fagocitose de neutrófilos no foco inflamatório (6,54,117). Tradicionalmente, macrófagos não são uma fonte de MPO, pois se sabe que monócitos perdem o conteúdo de MPO, a medida que se diferenciam em macrófagos. A aquisição de MPO de neutrófilos, é interpretada como um meio adicional de incrementar a ação microbida dos macrófagos. Como exemplo, foi mostrado que *in vitro* a adição exógena de MPO aumenta a atividade fungicida de macrófagos residentes e de macrófagos ativados com GM-CSF (118). A captação

de MPO por macrófagos parece ter um papel importante na prevenção da destruição tecidual, visto que a MPO que alcança os compartimentos extracelulares durante a inflamação, está associada à destruição de tecidos e à inflamação crônica (119).

Apesar da MPO ser conhecida principalmente como a enzima que catalisa a formação de HOCl; atualmente é reconhecido que o espectro de ação desta enzima é muito mais amplo. Sabe-se que MPO catalisa a oxidação de vários substratos endógenos por um ciclo peroxidásico clássico (Esquema 2) e que possivelmente tenha um papel importante na imunomodulação (6). Mais recentemente foi descrito um outro importante aspecto da MPO, que é a reação das suas forma férrica e ferrosa com NO (120). Foi sugerido que a interação de NO com MPO serviria como um mecanismo para o consumo catalítico de NO, limitando desta maneira, a biodisponibilidade de NO no sítio inflamatório e formação de um novo grupo de oxidantes com ação bactericida (121).

Por outro lado, algumas evidências apontam para a ligação entre macrófagos ricos em MPO e doença. Macrófagos enriquecidos em MPO são encontrados em certas subpopulações de macrófagos teciduais, como na lesão aterosclerótica (51,120), evidenciando o papel de macrófagos e MPO na etiologia e progresso da aterogênese. Numa mesma linha de evidências, foi mostrado que, na esclerose múltipla são encontrados macrófagos contendo MPO, ao contrário do macrófago originado de tecido cerebral normal (122).

Neste estudo, utilizamos como modelo experimental macrófagos ativados *in vivo* pela administração intraperitoneal de Con A. Esta ativação pôde ser observada pelas modificações morfológicas no macrófago (8,25), e aumento do "burst" oxidativo (8,25) (Fig. 6). Primeiramente, nós mostramos que macrófagos ativados *in vivo* com Con A apresentam uma importante atividade peroxidásica (Fig. 2), fortemente inibida por azida (Fig. 3). O aumento de enzimas antioxidantes como glutathione peroxidase e catalase foi excluído, uma vez que macrófagos residentes têm a mesma atividade que macrófagos ativados com Con A (Tabela 2). Nossos resultados mostram que o aumento da atividade peroxidásica está relacionado ao aumento do conteúdo de MPO, que pôde ser observado por

immunoblotting (Fig. 4). Esta MPO é ativa na geração de HOCl (Fig. 5) e na peroxidação de substratos (Fig 2 e 10). É possível que o enriquecimento de macrófagos com MPO seja um achado mais comum e que ocorra em outras condições de ativação de macrófagos. A origem da MPO presente em macrófagos é uma questão importante. A teoria mais aceita é que macrófagos adquirem MPO de neutrófilos durante o processo inflamatório. Entretanto no modelo experimental aqui estudado, a transferência de MPO de neutrófilos para macrófagos não foi importante. Neste caso foram utilizados macrófagos de camundongos tratados com anticorpo antigranulócitos, este tratamento preveniu a migração de neutrófilos para o peritônio após a injeção intraperitoneal de Con A mostrando que o enriquecimento de MPO pelos macrófagos, é um processo que independe de neutrófilos (Figura 7). A necessidade do contato prévio com outros componentes inflamatórios fica evidente pelos resultados obtidos quando macrófagos residentes foram cultivados na presença de Con A, onde houve uma diminuição dramática na atividade peroxidásica destas células quando comparadas às células ativadas *in vivo* (Fig.8 e 12)

Recentemente, foi descrito que, *in vitro*, GM-CSF preserva a atividade de MPO em macrófagos derivados de monócitos (123). Este achado confirma a idéia que citocinas ou outros fatores produzidos durante a resposta inflamatória induzida por Con A preservam a MPO de monócitos recém migrados para a cavidade peritoneal.

IFN- γ , uma importante molécula envolvida na ativação de macrófagos, exerce um efeito inibitório na expressão de MPO de células progenitoras e de diferentes linhagens celulares (124). Nossos resultados demonstram que macrófagos recuperados de camundongos IFN- γ “knockout” (GKO) apresentam uma atividade peroxidásica ainda maior que camundongos “wild type” (WT) (Fig. 8 e 12). Isto indica que a condição persistente de ausência de IFN- γ encontrada nos camundongos GKO resulta num maior conteúdo de MPO em células fagocíticas maduras (Fig 8 e 12). Este evento poderia tornar-se mais evidente em situações onde existe um maior influxo de monócitos para a cavidade, o que é observado no nosso caso (Fig 8 e 12).

Uma outra questão abordada neste estudo foi avaliar se macrófagos eram capazes de oxidar melatonina, como ocorre com neutrófilos. Melatonina é um hormônio produzido principalmente pela glândula pineal. Melatonina está envolvida em várias funções fisiológicas, incluindo regulação do ritmo sazonal e circadiano, sono e resposta imune (89). Trabalhos recentes apontam para um possível papel antiinflamatório da melatonina. Foi descrito o efeito protetor deste hormônio em vários modelos de reperfusão pós-isquemia (125), doenças inflamatórias ósseas (126) e injúrias neurológicas (127). Foi mostrado ainda que melatonina protege contra o choque induzido por LPS (128,129). Este indol é um seqüestrador efetivo de radical hidroxil e peroxil (130), peróxinitrito (106,107) e ainda estimula a expressão gênica das enzimas antioxidantes SOD, CAT, glutathione peroxidase e glutathione reductase (108,109). Melatonina inibiu infiltração de neutrófilos, formação de edema, peroxidação lipídica e formação de peróxinitrito (131), após o estímulo inflamatório. Em monócitos, a melatonina induz a secreção de IL-1, IL-6, IL-10, ativa a formação de intermediários reativos de oxigênio e a citotoxicidade contra células tumorais (93-96). É descrito ainda que a síntese extrapineal de melatonina pode ocorrer em monócitos em condições inflamatórias (102).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa descreveu que melatonina pode ser oxidado a AFMK por neutrófilos ativados, numa reação dependente de MPO (110). Macrófagos também foram capazes de oxidar melatonina a AFMK, da mesma forma que neutrófilos (FIG. 9,10,13 e 14). Entretanto, no caso de macrófagos, as células tiveram que ser pré-estimuladas *in vivo*, uma condição não necessária para neutrófilos. Esta estimulação prévia parece ser necessária para o aumento na produção de ERO e para prover a célula de atividade peroxidásica para a reação com melatonina.

Dois principais aspectos devem ser considerados a partir dos nossos resultados. O primeiro está concentrado nas possíveis reações catalisadas pela MPO *in vivo* além da produção de HOCl e o segundo aspecto importante é a possibilidade de que a oxidação de melatonina em células inflamatórias, seja uma rota de metabolização deste hormônio.

Melatonina possui uma alta lipossolubilidade, o que permite sua passagem para o meio intracelular, onde ela poderia sofrer metabolização e formar novos compostos. Várias quinureninas, incluindo a quinuramina derivada da melatonina, podem ter efeitos biológicos (60,132,133). Isto é uma evidência da importância da oxidação da melatonina *in vivo*, que vai depender de algumas condições, incluindo a concentração de melatonina no sítio inflamatório e uma fonte bioquímica eficiente de ERO. É factível que estas condições possam ser alcançadas *in vivo*, uma vez que foi descrito que monócitos podem sintetizar melatonina (102) e que fagócitos ativados são capazes de produzir altas concentrações de ERO (42). Macrófagos, ao contrário de neutrófilos, são células de vida longa e portanto, o efeito da oxidação de melatonina na função celular poderia ser mais evidente nestas células.

Monócitos, macrófagos e linhagens celulares correlacionadas contêm a enzima IDO que catalisa a oxidação de vários compostos indólicos. A expressão de IDO é francamente induzida *in vitro* e *in vivo* por IFN- γ (29-32). Os produtos formados pela IDO são análogos do tipo quinurenina; sendo que a oxidação de melatonina pela IDO gera AFMK. Neste contexto, IDO poderia ser a responsável pela oxidação da melatonina no nosso modelo experimental. Porém, a participação desta enzima na oxidação da melatonina por macrófagos ativados com Con A pode ser excluída pela ausência de efeito do 1-metil triptofano (inibidor de IDO) em nosso sistema e pela similaridade dos resultados encontrados entre camundongos GKO e WT.

Nós mostramos neste trabalho que macrófagos ativados com Con A contêm MPO ativa capaz de produzir HOCl (Fig. 5), incrementando a capacidade microbicida destas células. O enriquecimento do macrófago com MPO é independente do contato com neutrófilos e é provavelmente resultado do influxo de monócitos do sangue para o peritônio. Neste caso, na diferenciação de monócito a macrófago, o conteúdo de MPO seria preservado. É provável que isto represente uma situação mais comum presente em algumas condições inflamatórias. Além disto, foi mostrado também, que macrófagos ativados com Con A oxidam melatonina. A oxidação de melatonina por macrófagos poderia

estar associada a alguns efeitos biológicos descritos para este hormônio. Um outro aspecto que deve ser considerado a partir disso é o provável envolvimento de MPO na oxidação de melatonina por macrófagos, reafirmando assim a idéia que MPO tem uma ação biológica mais ampla do se supõe atualmente.

9. Conclusões

- Macrófagos ativados in vivo com Con A possuem uma alta atividade peroxidásica e esta atividade é fortemente inibida por azida.
- O aumento da atividade peroxidásica é acompanhada pelo aumento do conteúdo de MPO (que foi confirmado por *immunobloting*) e este fenômeno é independente do contato neutrófilos.
- A MPO encontrada nos macrófagos ativados in vivo com Con A são capazes de gerar HOCl.
- O aumento da atividade peroxidásica em macrófagos ativados in vivo por Con A é um fenômeno independente de $\text{INF-}\gamma$.
- Macrófagos ativados com Con A oxidam melatonina a um produto do tipo quinurenina (AFMK).
- A participação de IDO na oxidação da melatonina foi excluída pela ausência de efeito do 1-metil triptofano (inibidor de IDO) em nosso sistema e pela similaridade dos resultados encontrados entre macrófagos obtidos de camundongos WT e GKO.

10. Bibliografia

1. Rutherford, M.S., Witsell, A., Schook, L.B. (1993) Mechanisms generating functionally heterogeneous macrophages: chaos revisited. *J. Leukoc. Biol.* **53**, 602-618.
2. Remick, D.G., and Villarete, L., Regulation of cytokine gene expression by reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates. *J. Leukoc. Biol.* **59**, 471- 475, 1996.
3. Schreck, R., Albermann, K., and Baeuerle, P.A., Nuclear factor κ B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells. *Free Rad. Res. Comm.* **17**, 221-237, 1992.
4. Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. (1998) Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase and Bacterial Killing. *Blood* **92** (9), 3007-3017.
5. Ros A, Wever R, Roos D (1978) Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **525**, 37-44.
6. Lefkowitz, D.L., Mills, K., Morgan, D., Lefkowitz, S.S. (1992) Macrophage Activation and Immunomodulation by Myeloperoxidase. *Exp. Biol. Med.* **199**, 204-210.
7. Smith, C.W., Goldman, A.S. (1972) Effects of concanavalin A and pokeweed mitogen in vivo on mouse peritoneal macrophages *Exp. Cell Res.* **73** (2), 394-398.
8. Rodriguez, D., Cavada, B.S., Oliveira, A., Moreira, R.A., Russo, M. (1992) Differences in macrophage stimulation in response to intraperitoneal

administration of glucose/ mannose-binding plant lectins. Brazilian J. Med. Biol. Res. **25**, 823-826.

9. Metchnikoff, E. (1905). Immunity in infective diseases. University Press, Cambridge.
10. Mackaness, G.B. & Blander, R.V. (1967). Cellular immunity. Prog. Allergy. **11**, 89-98.
11. Van Furth, R. (1985) ed. Mononuclear phagocytes; Characteristics, physiology and function. Dordrecht, the Netherlands: Martinus Nijhoff.
12. 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), pp. 121-137. New York: Rockefeller University Press.
13. 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.
14. Kuna, P.; Reddigari, S. R.; Schall, T. J. ; Rucinski, D.; Sadick, M.; Kaplan, N. P. (1993). Characterization of the human basophil response to cytokines, growth factors, and histamine releasing factors of the intercrine/chemokine family. J. Immunol. **150**, 1932-43.
15. Ding, A.H.; Nathan, C. F.; Stuehr, D. J. (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. J. Immunol. **141**, 2407-12.

16. Lurie, M. B.(1984). Resistance to Tuberculosis: Experimental studies in nature and acquired defense mechanisms. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
17. Svedersky, L. P., Benton, C. V., Berger, W. H., Rinderknecht, E., Harkins, R.N.; Palladino, M. A.(1984). Biological and antigenic similarities of murine interferon- γ and macrophage activating factor. J. Exp. Med. **159**, 812-20.
18. Nathan, C. F.; Murray, H. W.; Wiebe, M. E.; Rubin, B. F.(1983). Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. J. Exp. Med. **158**, 670-89.
19. Pace, J. L.; Russel, S. W.; LeBlanc, P.A.; Murasko, D. M.(1985). Comparative effects of various classes of mouse interferons on macrophage activation tumoral cell killing. J. Immunol. **134**, 977-81.
20. Mosmann, T. R.; Cherwinsky, H.; Bond, M. W.; Giedlin, M. A; Coffman, R. L.(1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J. Immunol., **136**, 2348-57.
21. Cook, G. M.(1986). Cell surface carbohydrates: molecules in search of a functions? J. Cell. Sci. **4**, 45-70.
22. Sharon, N.(1976). In "Mitogens in Immunobiology". (J. J. Oppenheim and D. L. Rosentreich, eds). pp. 31-41. Academic Press, New York.
23. Cooper, H. L.(1973). Effects of mitogens on the mitotic cycle: a biochemical evaluation of lymphocyte activation. In: Drugs and the Cell Cycle. Academic Press, Inc. New York.

24. Smith, S. B. & Revel, J. P.(1972). Mapping of concanavalin A binding site on the surface of several cell types. *Dev. Biol.* **27**, 434-41.
25. Soto, D.C.R. "Alterações Funcionais Induzidas em Macrófagos Peritoneais por Lectinas que se ligam a glicose/ manose", Dissertação de Mestrado,85p., Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Orientador: Momtchilo Russo.
26. Cerávolo, I.P., Chaves, A.C.L., Bonjardim,C.A., Sibley, D., Romanha, A.J., and Gazzinelli, R.T.(1999). Replication of *Toxoplasma gondii*, but not *Trypanossoma cruzi*, is regulated in human fibroblasts activated with gamma interferon: Requeriment of a functional JAK/STAT pathway. *Infection and Immunity.* **67**(5), 2233-2240.
27. Espey, M.G., and Namboodiri, M.A.A. (2000). Selective metabolism of kynurenine in the spleen in the absence of indoleamine 2,3-dioxygenase induction. *Immunology Letters.* **71** (1),67-72.
28. Carlin, J.M., Borden, E.C., Sondel, P.M., and Byrne, G.I.(1989). Interferon-Induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human Mononuclear phagocytes. *J. Leukocyte Biology.* **45**, 29-34.
29. Kudo, Y., and Boyd, C.A.R. (2000). Human placental indoleamine 2,3-dioxygenase: cellular localization and characterization of enzyme preventing fetal rejection. *Bioch et Bioph Acta.* **1500** (1),119-124.
30. Edelstein, M.P., Ozaki, Y., and Duch, D.S. (1989). Sinergistic effects of phorbol ester and IFN- γ on the inductions of indoleamine 2,3-dioxygenase in THP-1 monocitic leukemia cells. *J. Immunol.* **143**(9), 2969-2973.

31. Musso, T., Gusella, G.L., Brooks, A., Longo, D.L., and Varesio, L.(1994). Interleukin-4 inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human monocytes. *Blood*. **83** (5), 1408-1411.
32. Ozaki, Y., Edelstein, M.P., and Duch, D.S. (1988). Induction of indoleamine 2,3- dioxygenase: A mechanism of the antitumor activity of interferon- γ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85**, 1242-1246.
33. Nathan, C. F. & Root, R. K.(1977). Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophage. Dependence on sequential activation and triggering. *J. Exp. Med*. **146**, 1648-62.
34. Babior, B. M.; Kipness, R. S.; Curnuhe, J. I.(1973). Biological defense mechanism. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest*. **52**, 741-44.
35. Drath, D. B. & Karnovsky, M. L.(1975) Superoxide production by phagocytic leukocytes. *J. Exp. Med*. **141**,257-61.
36. Pick, E. & Keisari, Y. (1980). A simple colorimetric method for measurement of hydrogen peroxide by cells in culture. *J. Immunol. Methods*. **38**, 161-70.
37. Inoue K., Minami Y., Taoka Y., Ikata T., Fukuzawa K. (1994). Phagocytosis and superoxide generation in human polymorphonuclear leukocytes from synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis, in *Frontiers of Reactive Oxygen in Biology and Medicine* (eds Asaka, K. and Yoshikawa, T.) CRC Press: New York: 459-461.
38. Henderson L.M., Moule S.K., Chappell J.B. (1993). The immediate activator of the NADPH oxidase is arachidonate not phosphorylation. *FEBS Lett*. **211**, 157-62.

39. Moncada, S., and Higgs, A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* **329**, 2002-2012.
40. Hue, R. E., and Padmaja, S. (1993). The reaction of NO with superoxide. *Free Rad. Res. Commun.* **18**, 195-199.
41. Beckman, J. S., Beckman T. W., Chen, J., Marshall, P. A., and Freeman, B. A (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 1620-1624.
42. Babior, B.M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood.* **93**, 1464-1476.
43. Pietarinen-Runtti, P., Lakari, E., Raivio, K.O., Kinnula, V.L. (2000). Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **278**(1), 118-125.
44. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine* (2nd. Edition). Clarendon Press, Oxford.
45. Gutteridge, M.C. and Halliwell, B. (1994). In: *Antioxidants in nutrition, health and disease*. Oxford Univ. Press.
46. Change, B., Sies, H., Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Phys. Rev.* **59**, 527-605.
47. Granger, D.N. (1988). Role of xantina oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol.* **255**:1269-1275.
48. Brennan, M.L., Gaur, A., Pahuja, A., Lysis, A.J., Reynolds, W.F. (2001) Mice lacking myeloperoxidase are more susceptible to experimental autoimmune

encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* **112**, 97-105.

49. Pekoe, G. M., (1987). Measurement 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, pp168-182.
50. Bainton, D. F., Ulliyot, J. L., and Farquhar M. G. (1971). The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J. Exp. Med.* **134**, 907.
51. Daugherty, A., Rateri, D.L., Dunn, J.L., Heinecke, J.W. (1994) Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.* **94**, 437-444.
52. Nagra, R.M., Becker, B., Tourtellotte, W.W., Antel, J.P., Gold, D., Palatino, T., Smith, R.A., Nelson, J.R., Reynolds, W.F. (1997) Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **78**, 97-107.
53. Shepherd, V.L., Hoidal, J.R. (1990). Clearance of neutrophil-derived myeloperoxidase by macrophage mannose receptor. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2**,335-340.
54. Leung, K.P., Goren, M.B. (1989). Uptake and utilization of human polymorphonuclear granule myeloperoxidase by mouse peritoneal macrophages. *Cell Tissue Res.* **257**, 653-656.
55. Thomas, E. L., and Learn, D. B. (1991). Myeloperoxidase-catalysed oxidation of chloride and others halides: the role of chloramines, in Enverse J., Everse

K. E., Grisham M. B. eds. Peroxidases in chemistry and biology., Boca Raton, FL, CRC, 83.

56. Grisham, M. B., Jefferson, M. M., Melton, D. F., and Thomas, E. I. (1984). Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils. Ammonia-dependent bactericidal, cytotoxic and cytolytic activities of the chloramines. *J. Biol. Chem.* **259**, 10404-10410.
57. Kettle, A., and Winterbourn, C. C. (1994). Superoxide-dependent hydroxylation by myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* **269**, 17146-17151.
58. 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.
59. Hazen, S. L., Zhang, R., Shen, Z., Wi, W., Podrez, E. A., MacPherson, J. C., Schmitt, D., Mitra, S. N., Mukhopadhyay, C., Chen, Y., Cohen, P. A., Hoff, H. F., and Abu-Soud, H. M. (1999). Formation of nitric oxide-derived oxidants by myeloperoxidase in monocytes. *Cir. Res.* **85**, 950-958.
60. Kelly, R.W., Amato, F., Seemark, R.F. (1984) N-acetyl-5-methoxykynurenamine, a brain metabolite of melatonin, is a potent inhibitor of prostaglandin biosynthesis *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **121**, 372-379.
61. Littlejohn, T.K., Takikawa, O., Skylas, D., Jamie, J.F., Walker, M.J., Truscott, R.J.W. (2000). Expression and Purification of Recombinant Human Indoleamine 2,3-dioxygenase. *Protein Expression and Purification.* **19**, 22-29.

62. Takikawa, O., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Yoshida, R., Truscott, R.J.W. (1999) Interferon-gamma-dependent/independent expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. Studies with interferon-gamma knockout mice. *Adv. Exp. Med. Biol.* **467**, 553-7.
63. Watanabe, Y., Yoshida, R., Sono, M., Hayaishi, O. (1981) Immunohistochemical localization of indoleamine 2,3-dioxygenase in the argyrophilic cells of rabbit duodenum and thyroid gland. *J. Histochem. Cytochem.* **29**, 623-632.
64. Hirata, F., Ohnishi, T., Hayaishi, O. (1977). Indoleamine 2,3-dioxygenase. Potassium superoxide as substrate. *J. Biol. Chem.* **252**, 4643-4647.
65. Yoshida, R., Hayaishi, O. (1987). Indoleamine 2,3 dioxygenase in *Methods Enzymology*. **142**, 188-195.
66. Hirata, F., Hayaishi, O., Tokuyama, T., and Senoh, S. (1974). In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J. Biol. Chem.* **249**(4), 1311-1313.
67. Sono, M. (1989). The roles of superoxide anion and methylene blue in the reductive activation of indoleamine 2,3 dioxygenase by ascorbic acid or by xanthine oxidase-hypoxanthine. *J. Biol. Chem.* **264**, 1616-1622.
68. Higushi, K., Kuno, S., Hayaishi, O. (1967). *Arch. Biochem. Biophys.* **120**, 397.
69. Sono, M., Taniguchi, T., Watanabe, Y., and Hayaishi, O. (1980). Indoleamine 2,3-dioxygenase. Equilibrium studies of the tryptophan binding to the ferric, ferrous, and co-bound enzymes. *J. Biol. Chem.* **255**(4), 1339-1345.
70. Sono, M. (1986). Spectroscopic and equilibrium properties of the indoleamine 2,3 dioxygenase – tryptophan- O₂ ternary complex and of analogous

enzyme derivatives tryptophan binding to ferrous enzyme adducts with dioxygen, nitric oxide, and carbon monoxide. *Biochemistry*. **25**,6089-6097.

71. Kobayashi, K., Hayaishi, K., and Sono, M. (1989). Effects of Tryptophan and pH on the kinetics of superoxide radical binding to Indoleamine 2,3-dioxygenase studied by pulse radiolysis. *J. Biol. Chem.* **264** (26),15280-15283.
72. Groseclose, E.E., Frank, L. (1982). The activity of pulmonary indoleamine 2,3 dioxygenase in rats and mice is not altered by oxygen exposure. *Biochim. Biophys. Acta*.**705**,341-347.
73. Dufour, M.N, Crumbliss, A.L., Johnston, G. and Gaudmeyer, A. (1980) *J.Mol. Catal.*, **7**, 277-287.
74. Christen, S., Peterhans, E., Stocker, R. (1990.) Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: possible implication for inflammatory diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2506-2510.
75. Kerr, S.J., Armati, P.J., Pemberton, L.A., Smythe, G., Tattam, B., Brew, B.J. (1997). Kynurenine pathway inhibition reduces neurotoxicity of HIV-1-infected macrophages. *Neurology* .**49**,1671-1681.
76. Murr, C., Widner, B., Gerlach, D., Werner-Felmayer, G., Dierich, M.P., Wachter, H., Fuchs, D. (1997). Streptococcal erythrogenic toxins induce tryptophan degradation in human peripheral blood mononuclear cells. *Int Arch Allergy Immunol* .**114**,224-228.
77. Daubener, W., Remscheid, C., Nockmann, S., Pilz, K., Seghrouchni, S., Mackenzie, C., Hadding, U. (1996). Anti-parasitic effector mechanism in

- human brain tumor cells: role of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Eur. J. Immunol.* **26**, 487-492.
78. Mehta, S.J., Miller, R.D., Ramirez, J.A., Summersgill, J.T. (1998). Inhibition of *Chlamydia pneumoniae* replication in Hep-2 cells by interferon-gamma: role of Tryptophan catabolism. *J. Infect Dis.* **177**,1326-1331.
 79. Heyes, M.P., Morrison, P.F. (1997). Quantification of local de novo synthesis versus blood contributions to quinolinic acid concentrations in brain and systemic tissues. *J. Neurochem.* **68**, 280-288.
 80. Heyes, M.P., Chen, C.Y., Major, E.O., Saito, K. (1997) Different kynurenine pathways enzymes limit quinolic acid formation by various human cell types. *Biochem. J.* **326**, 351-356.
 81. Taylor, W.M., and Feng, G. (1991). Relationship between interferon- γ , indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *Faseb J.* **5**, 2516-2522.
 82. Takikawa,O., Kuriowa, T., Yamazaki, F., and Kido, R.(1988). Mechanism of interferon- γ action. Characterization of indoleamine 2,3-dioxygenase in cultured human cells induced by interferon- γ and avaluation of the enzyme mediated tryptophan degradation in its anticellular activity. *J. Biol.Chem.* **263**, 2041-2048.
 83. Yamazaki, F., Kuroiwa, T., Takikama, O., and Kido, R. (1985). Human indoleamine 2,3-dioxygenase. Its tissue distribution and characterization of the placental enzyme. *Biochem. J.* **230**,635-638.

84. Alberati-Giani, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Kohler, C., and Cesura, A.M.(1996). Regulation of the kynurenine metabolic pathway by interferon- γ in murine cloned macrophages and microglial cells. *J. Neurochem.* **66**, 996-1004.
85. Sanni, L.A., Thomas, S.R., Tattam, B.N., Moore, D.E., Chaudhri, G., Stocker,R., Hunt, N.H. (1998). Dramatic changes in oxidative tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in experimental cerebral and non cerebral malaria. *Am J Pathol* . **152**,611-619.
86. Munn,D.H., Zhou, M., Attwood, J.T., Bondarev, I., Conway, S.J., Marshall, B., Brown, C., Mellor, A.L. (1998). Prevention of alloeneic fetal rejection by tryptophan catabolism.*Science.* **281**, 1191-1193.
87. Lopez-Gonzalez, M. A., Calvo, J. R., Segura, J. J., and Guerrero, J. M. (1993). Characterization of melatonin binding sites in human peripheral blood neutrophils. *Biotechnol Ther.* **4**, 253-262.
88. Conn, P. M., and Melmed, S. (1997). Endocrinology: Basic and Clinical Principles. The Pineal Hormone-Melatonin Irina V. Zhdanova MD and Richard J Wurtman. Cap 18 279-290. Humana Press Inc. Totowa, NJ.
89. Reiter, R. J. (1991). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and its physiological interactions. *Endocr. Rev.* **12**,151-180.
90. Textbook of Medical Physiology sixth edition, Arthur C Guyton, MD, 1003, 1004.
91. Conte, A., Conconi, S., Hertens, E., Skwarlo-Sonta, K., Markocoska, M., Maestroni, G.J.M.(2000) Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J. Pineal Res.* **28**,193-202.

92. Tan, D., Manchester, L.C., Reiter, R.J., Qi, W., Zhang, M., Weintraub, S.T., Cabrera, J., Sainz, R.M., and Mayo, J.C. (1999). Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochim. Biophys. Acta* **1472**, 206-214.

93. Barjavel, M. J., Mamdouh, Z., Raghbate, N., and Bakouche, O. (1998). Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. *J. Immunol.* **160**, 1191-1197.

94. Cutolo, M., Villaggio, B., Candido, F., Valenti, S., Ciusti, M., Felli, L., Sulli, A., and Acardo, S. (1999). Melatonin influences interleukin-12 and nitric oxide production by primary cultures of rheumatoid synovial macrophages on THP-1 cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **876**, 246-254.

95. Garcia-Maurino, S., Gonzalez-Haba, M. G., Calvo, J. R., Rafii-El-Idrissi, M., Sanchez-Margalet, V., Goberna, R., and Guerrero, J. M. (1997). Melatonin enhances IL-2, IL-6 and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J. Immunol.* **159**, 574-581.

96. Morrey, K. M., Mclachlan, J. A., Serkin, C. D., and Bakouche, O. (1994). Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. *J. Immunol.* **153**: 2671-2680.

97. Hirata, F., Hayaishi, O., Tokuyama, T., and Senoh, S. (1974). In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J. Biol. Chem.* **249**(4), 1311-1313.

98. Angeli, A., Gatti, G., Sartori, M. L., Del Ponte, D., and 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.

99. Caroleo, M. C., Frasca, D., Nistico, G., and Doria, G. (1992). Melatonin as immunomodulator in immunodeficient mouse. *Immunopharmacology* **23**, 81-89.
100. Csaba, C., and Barath, P. (1975). Morphological changes of thymus and the thyroid gland after postnatal extirpation of the pineal body. *Endocrinol. Exp.* **9**, 59-67.
101. Maestroni, G. J. M., Conti, A., and Pierpaoli, W. (1987). Role of the pineal gland in immunity. II. Melatonin enhances the antibody response via an opiate mechanism. *Clin. Exp. Immunol.* **68**, 384-391.
102. Finocchiaro, L.M.E., Nahmod, V.E., and Launay, J.M. (1991). Melatonin biosynthesis and metabolism in peripheral blood mononuclear leucocytes. *Biochem. J.* **280**, 727-731.
103. Hardeland, R., Reiter, R. J., Poeggeler, B., and Tan, D. X. (1993c). The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **17**, 347-357.
104. Reiter, R. J., Poeggeler, B., Tan, D. -X., Chen, L. -D., Manchester, L. C., and Guerrero, J. M. (1993). Antioxidant capacity of melatonin: A novel action not requiring a receptor. *Neuroendocrinol. Lett.* **15**, 103-116.
105. Matuszak, Z., Reszka, K. J., and Chignell, C. F. (1997). Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radicals: EPR and spin trapping investigations. *Free Radical Biol. & Med.* **23**, 367-372.

106. 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**, 83-87.
107. Zhang, H., Squadrito, G. L., Uppu, R., and Pryor, W. (1999). Reaction of peroxynitrite with melatonin: a mechanistic study. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 526-534.
108. Reiter, R.J., Tan, D-X., Osuna, C., Gitto, E. (2000). Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J. Biomed. Sci.* **7**, 444-458.
109. Chan, T-Y., Tang, P-L. (1996). Characterization of the antioxidant effects of melatonin and related indoleamines in vitro. *J. Pineal Res.* **20**, 187-191.
110. Silva, S.O., Ximenes, V.F., Catalani, L.H., Campa A. (2000) Myeloperoxidase-catalyzed oxidation of melatonin by activated neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**, 657-662.
111. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 265-275.
112. Beutler, E. (1975). Catalase in Red Cell metabolism: *A manual of Biochemical methods*. 2^a ed. Grune & Stratton, New York, 89-90.
113. Wendel, A. (1981). Glutathione Peroxidase in *Methods in Enzymology*, vol. **77**, Academic Press, 325-333.
114. Kettle, A.J., Winterbourn, C.C.(1994) Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase. *Methods Enzymol.* **233**, 502-512.

115. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
116. Cady, S.G., Sono, M. (1991) 1-Methyl-DL-tryptophan, β -(3-benzofuranyl)-DL-alanine (the oxygen analog of tryptophan), and β -[3-benzo(b) thienyl]-DL-alanine (the sulfur analog of tryptophan) are competitive inhibitors for indoleamine 2,3-dioxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **291**, 326-333.
117. Shellito, J., Sneezeck, M., Warnock, M. (1987). Acquisition of peroxidase activity by rat alveolar macrophages during pulmonary inflammation. *Am. J. Pathol.* **129**, 567-577.
118. Maródi, L., Tournay, C., Káposzta, R., Johnston, R.B., Moguilevsky, N. (1998) Augmentation of human macrophage candidacidal capacity by recombinant human myeloperoxidase and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Infection and Immunity.* **66**, 2750-2754.
119. Winterbourn, C.C., Vissers, M.C.M., Kettle, A.J. (2000) Myeloperoxidase. *Curr. Opin. Hematology* **7**, 53-58.
120. Abu-Soud, H.M., Hazen, S.L. (2000) Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* **275**, 5425-5430.
121. Abu-Soud, H.M., Hazen, S.L. (2000) Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases. *J. Biol. Chem.* **275**, 37524-37532.
122. Reynolds, W.F., Rhess, J., Maciejewski, D., Paladino, T., Sieburg, H., Maki, R.A., Masliah, E. (1999) Myeloperoxidase polymorphism is associated with gender specific risk for Alzheimer's disease. *Exp. Neurology.* **155**, 31-41.

123. Sujiyama S, Okada Y, Sukhova GK, Virmani R, Heineck JW, Libby P (2001) Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am. J. Pathol.* **158**, 879-891.
124. Kawano, S., Tatsumi, E., Yoneda, N., Nagata, S., Yamaguchi, N. (1993) Suppression of gene expression of myeloperoxidase (MPO) by gamma-interferon (IFN-gamma) in HL60 cells, *Lymphokine Cytokine Res.* **12**, 81-85.
125. Bertuglia, S., Marchiafava, P.L., Colantuoni, A. (1996). Melatonin prevents ischemia reperfusion injury in hamster cheek pouch microcirculation. *Cardiovasc. Res.* **31**, 947-952.
126. Pentney, P.T., Bubenik, G.A. (1995). Melatonin reduces the severity of dextran-induced colitis in mice. *J. Pineal Res.* **19**, 31-39.
127. Giusti, P., Lipartiti, M., Franceschini, D., Schiavo, N., Floreani, M., Manev, H. (1996). Neuroprotection by melatonin from kainate-induced excitotoxicity in rats. *FASEB J.* **10**, 891-896.
128. Sewerynek, E., Abe, M., Reiter, R.J., Barlow-Walden, L.R., Chen, L., McCabe, T.J., Roman, L.J., Diaz-Lopez, B. (1995). Melatonin administration prevents lipopolysaccharide-induced oxidative damage in phenobarbital-treated animals. *J. Cell. Biochem.* **58**, 436-444.
129. Sewerynek, E., Reiter, R.J., Melchiorri, D., Ortiz, G.G., Lewinski, A. (1996). Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin. *Hepato-Gastroenterology* **43**, 898-905.

130. Pieri, C., Marra, M., Moroni, F., Recchioni, R., Marcheselli, F., 1994. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci.* **55**, 271-277.
131. Constantino, G., Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Caputi, A.P. (1998) Protective effects of melatonin in zymosan-activated plasma-induced paw inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* **363**, 57-63.
132. Sze, S.F., Liu, W.K., Ng, T.B. (1993) Stimulation of murine splenocytes by melatonin and methoxytryptamine. *J. Neural. Transm.* **94**, 115-126.
133. Leon, J., Vives, F., Crespo, E., Camacho, E., Espinosa, A., Gallo, M.A., Escames, G., Acuna-Castroviejo, D. (1998) Modification of nitric oxide synthase activity and neuronal response in rat striatum by melatonin and kynurenine derivatives. *J. Neuroendocrinol.* **10**, 297-302.