Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Curso de Pós Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Regulação cruzada entre peroxidases e indolamina 2, 3
dioxigenase no controle da metabolização do triptofano**

Sabrina Sayori Okada

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR.

Orientadora:

Prof. Dra. Ana Campa (FCF-USP)

São Paulo
2010

Sabrina Sayori Okada

Regulação cruzada entre peroxidases e indolamina 2,3 dioxigenase no
controle do metabolismo de triptofano

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Ana Campa
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Desiderata

(Max Ehrmann)

Go placidly amid the noise and the haste, and remember what peace there may be in silence. As far as possible without surrender be on good terms with all persons.

Speak your truth quietly and clearly; and listen to others, even to the dull and the ignorant, they too have their story. Avoid loud and aggressive persons, they are vexations to the spirit.

If you compare yourself to others, you may become vain and bitter; for always there will be greater and lesser persons than yourself.

Enjoy your achievements as well as your plans. Keep interested in your own career, however humble; it is a real possession in the changing fortunes of time.

Exercise caution in your business affairs, for the world is full of trickery. But let not this blind you to what virtue there is; many persons strive for high ideals, and everywhere life is full of heroism.

Be yourself. Especially do not feign affection. Neither be cynical about love; for in the face of all aridity and disenchantment it is as perennial as the grass. Take kindly the counsel of the years, gracefully surrendering the things of youth.

Nurture strength of spirit to shield you in sudden misfortune. But do not distress yourself with dark imaginings. Many fears are born of fatigue and loneliness.

Beyond a wholesome discipline, be gentle with yourself. You are a child of the universe, no less than the trees and the stars; you have a right to be here. And whether or not it is clear to you, no doubt the universe is unfolding as it should.

Therefore, be at peace with God, whatever you conceive him to be, and whatever your labors and aspirations in the noisy confusion of life, keep peace in your soul. With all its sham drudgery and broken dreams; it is still a beautiful world.

Be cheerful. Strive to be happy.

A ciência não consegue decifrar o mistério da natureza porque nós somos parte dele. (Max Planck.)

Minds are like parachutes. They only function when they are open. (Sir James Dewar, Scientist (1877-1925))

Foi com você que aprendi que sou capaz de fazer o possível e o impossível. Foi você que despertou o meu melhor. Foi você que me fez acreditar em mim!

À minha orientadora Ana Campa,
Por ter me suportado por todos estes anos,
Por ter me aconselhado em todos os momentos,
Por ter sido a melhor orientadora – amiga,
Por ter me orientado por este longo e tortuoso, mas recompensador caminho.
Sou sempre grata, sempre serei grata.
Obrigada Ana!!!!

Life is the art of drawing sufficient conclusions from insufficient premises. (Samuel Butler
(1612-1680))

A experiência aumenta a nossa sabedoria, mas não reduz nossas loucuras. (Josh Billings)

Mantenha viva a capacidade de esforçar-se, submetendo-a diariamente a um pequeno
exercício. (William James)

Aos meus pais,
Agradeço toda a confiança e esperança que depositaram em mim,
Agradeço toda a paciência por esta vida louca,
Agradeço a sua presença em todos os momentos da minha vida!
Meu muito obrigado, pois é a vocês que eu devo a minha existência.
Mãe, Pai, Muito obrigado!!!

"A ausência diminui as pequenas paixões e aumenta as grandes, da mesma forma como o vento apaga as velas e atiza as fogueiras." (La Rochefoucault)

Ao Eduardo...
Pela paciência,
Pela compreensão,
Pela confiança,
Pela lealdade
Pelo amor,
Meu muito obrigado!!!!

A ação não vem do pensamento, mas da disposição para a responsabilidade. (Dietrich Bonhoeffer.)

Nunca está só quem anda com nobres pensamentos. (Philip Sidney)

À minha avó e aos meus tios,
Agradeço por terem me acolhido,
Agradeço pela confiança e pela esperança em mim depositada,
Agradeço todo o apoio.
MUITO OBRIGADO!!!!!!

Agradecimentos:

À USP– Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas por me acolher e pelo conhecimento crítico por mim adquirido e que me fez escolher a vida acadêmica na melhor universidade do Brasil.

À FAPESP, CNPq, CAPES pelo apoio financeiro necessário para a dedicação exclusiva na pesquisa.

Às secretárias Ana, Dora, Edna e Sueli, por me orientarem e auxiliarem em todos os caminhos burocráticos que eu me envolvi durante todos estes anos.

À Rose e Cláudia por deixarem tudo limpinho e em ordem para que tenhamos a possibilidade de fazer pesquisa de qualidade.

Ao Dr. Eliver Ghosn pelo auxílio técnico e científico e por todos os conhecimentos que ele teve a paciência de me passar durante esta jornada.

Aos professores e funcionários do departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, pela confiança e auxílio em todos os problemas que enfrentei durante este doutorado.

Aos discentes do programa de Análises Clínicas por terem me dado a oportunidade de representá-los em todas as comissões de pós graduação do programa.

Ao André, meu querido amigo, por ter me acompanhado neste final de doutorado e auxiliado a me estruturar pessoalmente e profissionalmente.

MUITO OBRIGADO!!!!

Aos Colegas de Laboratório!!!!!!

Como não dizer nada de vocês!!!!!! A todos que me acompanharam por este longo caminho, meu muito obrigado!

À Silvana, não tenho nem palavras pra agradecer tudo o que fez por mim....Obrigado pela amizade, pelo companheirismo, pelos auxílios técnicos, pelos conselhos de vida! Por acreditar e incentivar todos os planos loucos do nosso futuro. Muito obrigada por me dar um empurrãozinho na carreira. Vou ser grata sempre!

À Silene, vice-chefe, muito obrigada pela amizade, acima de tudo. Agradeço todos os conselhos e auxílios que você me dá sem nem pensar. Muito obrigada por todos estes anos....

À Ana Carolina... Super empenhada, mas às vezes atrapalhada, sempre cheia de ideias e que vem me ajudando muito com todos os experimentos. Muito obrigada por toda a ajuda e paciência comigo. Muito obrigada pela amizade e conselhos.

Ao Edson.... Esta é pra você.... Um parágrafo inteirinho pra lhe enaltecer! Eu agradeço a sua presença no laboratório. Além de fazer com que o ambiente fique mais descontraído, temos a presença de uma pessoa muito inteligente, empenhada, amiga e sempre disposta a ajudar.

À Fabíola.... Muito obrigada pelos conselhos, pela amizade, pela convivência no laboratório. Aprendi muito com você, com o seu empenho, com a sua inteligência, com o seu foco.... Muito obrigada.

À Franciele.... Fran, muito obrigada pela sua amizade.... Pela sua paciência, pela sua confiança.... Pelo seu empenho..... E pelo seu astral!.

A Melissa... Muito obrigada pela sua paciência em me ter como tutora. Muito obrigada por me ensinar o que é ser empenhada e inteligentíssima. Agradeço por ter aprendido (ao menos eu acho) o que eu tentei ensinar até o momento.

A Carolzinha.... Nossa estagiária! Lindinha, sempre disposta, com vontade de aprender! Parabéns e muito obrigada pela sua confiança.

Andressita, não me esqueci de você. Muito obrigada pela sua presença, inteligência e amizade...

1. Índice:

1. Índice:.....	10
2. Lista de Abreviaturas:	12
Resumo	15
Abstract	16
3. Introdução e justificativa	17
3.1. Compostos indólicos e produtos de oxidação	19
3.2. Indolamina 2,3 dioxigenase	25
3.3. Mieloperoxidase (MPO)	33
3.4. Subpopulações de peritônio de camundongo.....	40
4. Objetivos:	46
4.1. Objetivos específicos:.....	46
5. Materiais e Métodos.....	47
5.1. Reagentes e Dispositivos	47
5.2. Equipamentos.....	48
5.3. Preparo de Soluções	49
5.4. Reação em cadeia de polimerase (PCR - Polimerase Chain Reaction) da sequência de IDO 55	
5.5. Digestão do plasmídeo pRSET B e do produto de PCR de IDO	55
5.6. Inserção da sequência de DNA de IDO no plasmídeo comercial pRSET B.....	55
5.7. Transformação de DH5- α para clonagem de DNA.....	56
5.8. Extração de DNA plasmidial por lise alcalina (“medium prep”).....	56
5.9. Transformação de BL21 competentes por CaCl ₂	57
5.10. Expressão de proteína recombinante em pequena escala.....	57
5.11. Expressão de proteína recombinante em média escala	58
5.12. Purificação da proteína recombinante humana IDO	58
5.13. Ensaio de atividade de IDO.....	59
5.14. Ensaio cinéticos da enzima IDO	59
5.15. Identificação e quantificação de TRP, NFK e QUIN.....	60
5.16. Ensaio de adição de superóxido dismutase (SOD) em ensaio enzimático.....	61
5.17. Síntese de AFMK e AMK	61
5.18. Ensaio de inibição da atividade de IDO	62
5.19. Identificação de TRP, QUIN, SER, MLT, AFMK, AMK.....	62
5.20. Ensaio de 5-HT, MLT, AFMK e AMK como substrato de IDO.....	63
5.21. Ensaio de atividade de HRP	63
5.22. Ensaio de inibição da atividade de HRP	63
5.23. Ensaio de QUIN como substrato de HRP	64
5.24. Ensaio cinéticos da enzima HRP.....	64
5.25. Obtenção de granulócitos humanos de sangue periférico	64
5.26. Ensaio de atividade de MPO	65
5.27. Identificação e isolamento de produtos de oxidação da MLT	65
5.28. Animais	66
5.29. Obtenção células peritoneais e esplênicas de camundongo.	66
5.30. Expressão de IDO (Western blotting)	67
5.31. Quimiluminescência amplificada por luminol e lucigenina (Burst oxidativo)	67
5.32. Reações imunocitoquímicas e microscopia de luz, confocal: (dupla marcação)	67
5.33. Imunocitoquímica para microscopia eletrônica de transmissão	68
5.34. Análise de células peritoneais por citometria de fluxo	69
5.35. Análise estatística dos dados	70
6. Capítulo I - Regulação cruzada entre as vias de metabolização de triptofano	72

5.25.	Obtenção de IDO recombinante humana	73
5.26.	Indóis e quinuraminas como inibidores de IDO.....	79
5.27.	Quinurenina como inibidor de peroxidase	87
6.	Discussão:.....	94
7.	Capítulo II - Localização das enzimas mieloperoxidase e indolamina 2,3 dioxigenase em células residentes e ativadas por concanavalina A de peritônio de camundongo	103
7.1.	Localização da enzima mieloperoxidase em células residentes e ativadas por concanavalina A de peritônio de camundongo	104
7.2.	Localização da indolamina 2,3 dioxigenase em células residentes e ativadas por concanavalina A de peritônio de camundongo	123
8.	Discussão:.....	134
9.	Conclusões	140
10.	Referências	142
	Apêndice	i

2. Lista de Abreviaturas:

1MT: 1-metil-triptofano

¹O₂: oxigênio singlete

5-HIAA: ácido 5-hidroxi-indolacético

5-HT: serotonina

AACD: enzima aminoácido descarboxilase

ACN: acetonitrila

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

AM: azul de metileno

AMK: *N*¹-acetil-5-metoxiquinuramina

ANAT: enzima arilalquilamina *N*-acetiltransferase

APC: *allophycocyanin* - alofococianina

B-MZ: linfócitos B da zona marginal

BSA: *bovine serum albumin* – albumina sérica bovina

Br⁻: ânion brometo

CG: complexo de Golgi

Cl⁻: ânion cloreto

CLN: calnexina

Con A: concanavalina A

COX-2 : ciclooxigenase -2

CRT: calreticulina

Cy5PE: conjugado de cianina 5 e ficoeritrina

D-1MT: isômero dextrogiro do 1 metil triptofano

D-TRP: isômero dextrogiro do triptofano

DAB: diaminobenzidina

DAPI: *4,6-diamidino-2-phenylindole* – 4,6-diamino-2-fenilindol

DNA: ácido desoxirribonucléico

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ERO: espécies reativas de oxigênio

FITC: *fluorescein isothiocyanate* – fluoresceína isotiocianato.

FMO: *fluorescence minus one* – fluorescência menos um – controle para citometria de fluxo

FSC: *forward scatter* - Medida de tamanho em citometria de fluxo

GM-CSF: *granulocyte/macrophage colony stimulating factor* – fator estimulador de colônia para granulócitos e macrófagos

H₂O: água

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HIOMT: hidroxindol o-metiltransferase

HOCl: ácido hipocloroso

HPLC: *high performance liquid chromatography* – cromatografia líquida de alta performance.

HRP: *horseradish peroxidase* – peroxidase de raiz de rábano

I⁻: ânion iodeto

IDO: indolamine 2,3 dioxigenase

IDO-2: indolamina 2,3 dioxigenase – 2

IFN-γ: interferon - γ

IL: interleucina

IPTG: isopropil β-D-1-tiogalactopiranosideo

L-1MT: isômero levogiro do 1 metil triptofano

L-TRP: isômero levogiro do triptofano

LB: meio Luria Bertani

LC-MS: cromatografia líquida de alto desempenho acoplado a um espectrômetro de massas

LDL: *low density lipoprotein*- lipoproteína de baixa densidade.

LPS: lipopolissacarídeo

M-CSF: *macrophage colony stimulating factor* – fator estimulador de colônia para macrófagos

MAO: enzima monoamino oxidase

MLT: melatonina

MPO: mieloperoxidase

MPO-I: mieloperoxidase composto I

MPO-II: mieloperoxidase composto II

MPO-III: mieloperoxidase composto III

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotido fosfato reduzido

NFK: *N*-formil-quinurenina

LPM: *large peritoneal macrophages* – macrófagos peritoneais grandes

NK: células *natural killer*

NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: óxido nítrico

O₂: oxigênio molecular

O₂^{•-}: ânions superóxido

PBS: *phosphate buffer saline* - tampão fosfato salina

PCR: *polimerase chain reaction* - reação em cadeia com polimerase

PE: *phycoerythrin* - ficoeritrina

PGE₂: prostaglandina E 2

PI: iodeto de propídio

PMSF: *phenylmethylsulphonyl fluoride*, fluoreto de fenilmetilsulfonil

QUIN/ KYN: quinurenina

RE: retículo endoplasmático

RNA_m: ácido ribonucléico mensageiro

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* - eletroforese em gel de poliácridamida com dodecil sulfato de sódio.

SFB: soro fetal bovino

SNC: sistema nervoso central

SOD: enzima superóxido dismutase

SPM: *small peritoneal macrophages* – macrófagos peritoneais pequenos

SSC: *side scatter* - medida de granulosidade em citometria de fluxo

TAAR: Receptores de traços de aminas

TBS: tampão tris salina

TDO: enzima triptofano 2,3 dioxigenase

TE: tampão EDTA

TEMED: *N,N,N',N'*-tetrametiletileneodiamina

TFA: ácido trifluoracético

TPH: enzima triptofano hidroxilase

T_{reg}: linfócitos T reguladores

TRP: triptofano

TRY: triptamina

VC: volume de coluna

Resumo

Triptofano (TRP) é metabolizado por duas vias, a via serotoninérgica e a via das quinureninas. Na via serotoninérgica, TRP é metabolizado a serotonina (5-HT) e, em algumas células, à melatonina (MLT) que pode ser oxidada à N^1 -acetil- N^2 -formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) e N^1 -acetil-5-metoxiquinuramina (AMK) por ação de peroxidases. Na via das quinureninas o TRP é diretamente metabolizado à N -formilquinurenina (NFK) e em seguida a quinurenina (QUIN). A enzima indolamina 2, 3 dioxigenase (IDO) é uma das responsáveis por esta reação. Dada a importância da IDO na tolerância imunológica e pelo fato desta enzima ser induzível nos propusemos a avaliar a existência de uma regulação cruzada entre esta enzima e a via serotoninérgica. Avaliando a interferência de AMK sobre a ação de IDO e a interferência de QUIN sobre a formação de AFMK por peroxidases, observamos uma possível interação entre as vias. AMK é um inibidor competitivo clássico de IDO e o K_i encontrado foi de 0,98 mM. QUIN é um inibidor incompetitivo linear simples da formação de AFMK e o K_i encontrado foi de 0,1 mM. A inibição da formação de AFMK também ocorre para a peroxidase humana (mieloperoxidase, MPO). Além de representarem uma regulação cruzada utilizada *in vivo*, as inibições encontradas podem ser relevantes para a proposta de novos inibidores de IDO e MPO na terapia imunomodulatória. Dado o nosso interesse pelas enzimas IDO e MPO, avaliamos ainda a localização intracelular destas enzimas em células de peritônio de camundongo, tanto residente como ativada com concanavalina A (Con A). O estímulo com Con A representa uma ativação de linfócitos T mediado por interferon gama ($IFN-\gamma$) e foi usado como modelo experimental para avaliar condições de localização em células ativadas. Por imunocitoquímica verificamos que IDO e MPO localizam-se próxima à membrana plasmática sendo que uma leve dispersão apenas de MPO foi observada em células ativadas com Con A. A localização intracelular das duas enzimas é no citoplasma, vesículas e núcleo. Curiosamente, verificamos MPO em células isoladas e também em agrupamentos celulares de duas ou mais células. Por citometria de fluxo identificamos macrófagos, linfócitos B1 e agrupamentos celulares como células que contém MPO. A mobilização de MPO durante a ativação celular, a presença de MPO em linfócitos e a presença de MPO e IDO em núcleos são informações novas que sugerem novas atividades para estas enzimas.

Palavras Chaves: Localização intracelular; Linfócitos; Macrófagos; AMK; Quinurenina.

Abstract

Tryptophan (TRP) is metabolized by two main pathways, the serotonergic pathway and the kynurenine pathway. In the serotonergic pathway, TRP is metabolized to serotonin (5-HT) and, in some cells, to melatonin (MLT). The latter can even be oxidized to acetyl- N^1 - N^2 -formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N^1 -acetyl-5-methoxykynuramine (AMK) by peroxidases. In the kynurenine pathway, TRP is metabolized to N -formylkynurenine (NFK) and to kynurenine (KYN). Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is one of those responsible for this reaction. Since IDO is important in immune tolerance and the fact that this enzyme is inducible by cytokines we proposed whether there is a cross regulation between this enzyme and the serotonergic pathway. A possible interaction between MLT and TRP oxidation pathways was shown by the AMK influence on IDO activity and QUIN interference on AFMK formation by peroxidases. AMK was shown to be an IDO classical competitive inhibitor with a K_i of 0.98 mM. QUIN was a peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) classical uncompetitive inhibitor and K_i was found to be 0.1 mM. AFMK formation inhibition was also found in human peroxidase (myeloperoxidase, MPO). Beyond the *in vivo* crosstalk, new IDO and MPO inhibitors in immunomodulatory therapy would be proposed by the compounds shown in this study. Given our interest in IDO and MPO, we also evaluated their intracellular localization in both resident and concanavalin A (Con A) activated mice peritoneum cells. Con A stimulation is a $IFN-\gamma$ mediated T lymphocytes activation and was our experimental model to evaluate activated cells. In light microscopy we observed IDO and MPO localization near the membrane and MPO only had a dispersed localization in Con A activated cells. Cytoplasm, nucleus and vesicles were the intracellular localization of both enzymes. Interestingly, we found MPO in isolated cells and in cell clusters of two or more cells. MPO was found on macrophages, B1 cells and cell clusters by flow cytometry. The MPO mobilization during cell activation, the presence of MPO in lymphocytes and the presence of MPO and IDO in nuclei are new informations to suggest new activities for these enzymes.

Key words: Intracellular localization; lymphocyte; macrophage; AMK; Kynurenine.

3. Introdução e justificativa

Triptofano (TRP), um aminoácido essencial, é metabolizado gerando compostos biologicamente ativos através de duas principais vias, a via serotoninérgica e a via das quinureninas. A via serotoninérgica sintetiza a serotonina (5-HT) através das enzimas triptofano hidroxilase (TPH) e em seguida a aminoácido descarboxilase (AADC). Este composto atua como neurotransmissor e sua função está associada ao controle do sistema gastrointestinal e dos transtornos comportamentais. Em algumas células há a síntese de melatonina (MLT) a partir de 5-HT envolvendo outras duas enzimas, a arilalquilamina N-acetiltransferase (ANAT) e a hidroxiindol o-metiltransferase (HIOMT) (1). Este composto é um hormônio associado ao controle do ciclo circadiano, além de ser considerado um agente imunomodulador (2, 3). A MLT pode ainda ser oxidada por ação de peroxidases aos seus produtos de abertura de anel indólico, a N^1 -acetil- N^2 -formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) e a N^1 -acetil-5-metoxiquinuramina (AMK) (4-6) (figura 1). É reconhecido para estes produtos de oxidação atividades biológicas semelhantes às descritas para a própria MLT (2, 7)

Na via das quinureninas, a formação de *N*-formilquinurenina (NFK) é o primeiro e limitante passo desta via e há o envolvimento de uma das seguintes enzimas, a triptofano 2, 3 dioxygenase (TDO), a indolamina 2, 3 dioxygenase (IDO) e a indolamina 2, 3 dioxygenase-2 (IDO-2) (8-10). O NFK é rapidamente deformilado à quinurenina (QUIN) (figura 1) através da ação de formamidases e esse composto pode ser metabolizado à nicotinamina envolvendo uma cascata de reações. QUIN e seus produtos estão associados à ações tolerogênicas de células dendríticas e tumores (11-13). Além disso, compostos intermediários neuro-ativos estão associados a patologias como Alzheimer e demência causada pelo HIV (14, 15).

Dentre as enzimas estudadas, destacamos a mieloperoxidase (MPO) e aIDO, pois estão diretamente envolvidas na resposta imune e é o foco deste estudo. Além de serem elementos chaves da bioquímica de células do sistema imune (11, 16, 17), ambas se mostraram bastantes úteis como marcadores de diagnóstico de doença ateromatosa (18) e câncer (19) respectivamente. A primeira está presente em neutrófilos e macrófagos e é responsável pela produção do agente microbicida ácido hipocloroso (HOCl). Sugere-se também que MPO esteja envolvida em eventos de sinalização celular e na ativação de fatores de transcrição importantes para a resposta inflamatória (20-23). A oxidação de substratos encontrados no foco inflamatório catalisada pela MPO também pode originar produtos com atividade imunomodulatória (5-7, 24), como é o caso da MLT. Apesar deste amplo espectro de atividades, questões envolvendo a localização intracelular desta enzima são discutidas apenas marginalmente (25). Em neutrófilos, sabe-se que a MPO está contida nos grânulos azurófilos, entretanto a localização precisa de MPO em macrófagos ainda é incerta. Apesar de ser reconhecido que diferentes tratamentos afetam a localização intracelular de MPO (25), isto tem sido pouco explorado no contexto de localização versus atividade.

AIDO, responsável pela degradação de TRP e síntese de compostos do tipo quinureninas, é também responsável pela resposta de tolerância imunológica (13). AIDO pode ser induzida em macrófagos por interferon gama (IFN- γ) e lipopolissacarídeo (LPS) (26). A localização intracelular, assim como o mecanismo de ação daIDO, não é precisamente conhecida até o momento. Ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) tem sido considerado um co-substrato deIDO, mas mais recentemente, esta participação tem sido questionada (27, 28). Neste projeto tivemos como objetivo avaliar a regulação cruzada das vias de metabolização de TRP e também a localização intracelular de MPO eIDO em processo de ativação de células de peritônio de camundongo.

3.1. Compostos indólicos e produtos de oxidação

TRP é um aminoácido essencial cuja obtenção é realizada através da dieta. Este é um composto indólico e é o primeiro de uma cascata de reações gerando outros compostos indólicos e produtos de oxidação biologicamente ativos (figura 1). Há um fino controle na manutenção da concentração de TRP, assim, uma diminuição sérica deste composto pode estar associada a patologias como presença de tumores ou sintomas de depressão (29-31). Vemos também a sua associação ao processo de imunomodulação como a inibição da ativação e proliferação celular de linfócitos T (32). O TRP está envolvido ainda ao processo de imuno “escape” de tumores uma vez que certos tumores adquiriram a capacidade de expressar a IDO, uma das enzimas responsáveis pelo catabolismo desse aminoácido. A depleção desse composto, em sítios infecciosos, controla as ações dos patógenos e a infecção é mais bem resolvida (33). Distúrbios neurológicos relacionam ainda a diminuição de concentração de TRP sérico em paciente com depressão intensa (34). O TRP apresenta diversas ações e funções, entretanto, somente a diminuição da concentração deste composto não é capaz de explicar todas as ações envolvendo o processo de tolerância e modulação de células do sistema imune e nem todos os sintomas encontrados em distúrbios psicológicos.

Figura 1: Esquema simplificado das duas vias de metabolização de TRP. A via das quinureninas está destacada com setas azuis e a via serotonérgica está destacada com setas verdes.

A principal via de metabolização de TRP é a via das quinureninas. Nessa via, entre 95 e 99% do TRP ingerido e não utilizado para a síntese proteica é metabolizado a compostos coletivamente chamados de quinureninas (35). Inicialmente, o interesse nessa via era centrada na síntese de nicotinamida (niacinamida, vitamina B3), um precursor da síntese do cofator de reações nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) (figura 1). Logo foram sendo descritos intermediários desta via, e estes também com funções biológicas. A via das quinureninas apresenta varias ramificações sendo a geração do ácido quinolínico e da nicotinamida, a principal. Os outros ramos dessa via geram o ácido quinurênico e o ácido xanturênico. NFK é o primeiro produto de oxidação TRP, e as enzimas TDO, IDO e IDO-2 são o primeiro e limitante passo desta via. TDO é uma dioxigenase expressa pelo

figado e é responsável pelos níveis séricos de QUIN (36). A IDO e IDO-2 são enzimas expressas em diversos outros tecidos e suas ações específicas serão comentadas mais adiante.

É na via das quinureninas que se encontram os compostos que auxiliam no processo de tolerância, de imunomodulação e das alterações psicológicas descritas para o TRP. Foi verificado que os ácidos 3-hidroxi-antranílico e o quinolínico atuam sobre um subtipo determinado de timócitos em camundongos (37) e que a presença de QUIN e 3-hidroxi-quinurenina, intermediários da via das quinureninas, foram capazes de induzir linfócitos T reguladores (T_{reg}) (38) e células dendríticas com ação supressora (39). Alguns dos intermediários dessa via são ainda neuro-ativos. O ácido quinolínico é um agonista de receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), produzindo excitação (40) e lesões nos axônios de células neurais (41). Apesar de este ácido ser menos potente do que NMDA ele é similar a uma neurotoxina, possivelmente porque produz danos, devido a sua atuação conjunta na ativação de receptores NMDA, na disfunção mitocondrial (42, 43), e no aumento de geração de radicais livres (44, 45). Já o ácido quinurênico foi o primeiro a mostrar a ação de bloquear receptores glutamato (46) e ser antagonista de receptores que ligam ao sítio do glutamato e receptores que se ligam ao sítio alostérico de glicina de NMDA (47, 48). Há indícios que a atuação deste ácido em determinados locais do cérebro e a prevenção da morte neuronal induzida por glutamato seriam realizadas pelas suas concentrações fisiológicas (49). O composto 3-hidroxiquinurenina é neurotóxico pela sua conversão a quinoniminas e espécies reativas de oxigênio (ERO), agentes que iniciam a apoptose (50, 51). Alguns dos danos gerados por esse composto pode ser devido ao seu metabolismo para o ácido 3-hidroxi antranílico que pode se auto-oxidar formando $O_2^{\cdot-}$.

O aumento de metabolização de TRP pela via das quinureninas tem como consequência a diminuição da concentração de 5-HT, uma vez que TRP também pode ser metabolizado pela via serotoninérgica (figura 1). Esta é a via de formação de 5-HT e de

MLT. Sendo assim, a baixa disponibilidade de TRP, diminui a síntese de 5-HT e consequentemente de MLT.

A 5-HT é sintetizada a partir de TRP através de duas enzimas, a TPH, que gera o 5-hidroxi-triptofano e a AADC que forma a 5-HT. Este composto é um neurotransmissor monoamina cujas principais células que a sintetizam são as células enterocromafins das criptas do trato gastrointestinal (52). Noventa e cinco por cento da 5-HT periférica são sintetizadas por essas células, enquanto somente uma pequena fração da 5-HT total é sintetizada nos neurônios tronco-cerebrais no núcleo da rafe, localizado na linha mediana do tronco encefálico (53). O ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) é o principal produto de metabolização de 5-HT pela enzima monoamino oxidase (MAO) (54), sendo esta realizada pelo fígado (55). Caso a 5-HT não seja metabolizada nesse órgão, ela pode ainda sofrer essa ação no endotélio de capilares pulmonares.

A 5-HT tem importantes atuações na agregação plaquetária, regulação de músculo liso cardiovascular (56) e sistema gastrointestinal. Como neurotransmissor, uma variedade de desordens de comportamento incluindo depressão e ansiedade (57, 58) está associada ao metabolismo deste composto. Há também evidências do seu papel em crescimento e diferenciação celular (60), desenvolvimento (61) e vias de sinalização neuronal. Apesar da hipótese de depressão ser devido à deficiência de 5-HT, ainda não há uma ligação definitiva entre esses dois fatores (62). Através dos receptores intrínsecos na parede do trato gastrointestinal, a 5-HT leva à secreção intestinal, peristaltismo e sensação de saciedade. Já os receptores extrínsecos estão associados à náusea, vômito, sensação de dor e desconforto gastrointestinal. Em sítios inflamatórios, a ativação plaquetária leva à sua agregação com liberação de 5-HT na proximidade das células sanguíneas (63). O C5a também desencadeia a liberação de 5-HT por mastócitos, o que é particularmente importante, pois se acredita que este fato favoreça a resistência imune de tumores primários e metástases (64). A concentração de 5-HT também pode ser

regulada pelo seu transporte em monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos, onde sua liberação é dependente de processos inflamatórios (63). 5-HT pode agir em diversas linhagens tumorais e não tumorais, mediando seu crescimento e diferenciação, além de regular a expressão de genes

Em algumas células, a 5-HT pode ainda ser metabolizada a MLT por ação das enzimas ANAT formando a N-acetil 5-HT e a HIOMT gerando a MLT (65). A MLT cujo principal local de produção é a glândula pineal, também é gerada por outras células e órgãos, como a glândula harderiana, cóclea membranosa, leucócitos mononucleares, pele e trato gastrointestinal (66). Acreditava-se que MLT era catabolizada somente pela enzima monoxigenásica hepática P450. Entretanto, no SNC, foi encontrado o primeiro produto da clivagem do seu anel indólico, o AFMK (67). Estimativas revelaram que a clivagem do anel indólico contribui com um terço do catabolismo total de MLT (68), mas a porcentagem pode ser maior em outros tecidos.

MLT é um composto altamente pleiotrópico, pois além de ser um composto que participa do controle do ciclo circadiano e ritmos sazonais (69), também apresenta propriedades imunomodulatórias (70), como ação anti-inflamatória inibindo os efeitos de prostaglandina E2 (PGE2). A MLT ainda apresenta um efeito antitumoral devido as suas ações onco estáticas e de controle do crescimento tumoral, por ser um agente antiangiogênico natural (71). Ainda é sugerido que a atividade antitumoral da MLT estaria relacionada com os seus efeitos antiproliferativos e antioxidantes (72). Apesar do mecanismo pelo qual a MLT exerce esses efeitos não ser totalmente conhecido, estudos mostram que esse composto atua como inibidor de apoptose em células imunes e como um indutor de apoptose em células cancerígenas (73). A MLT também apresenta ação antioxidante importante o que promove efeito protetor em inúmeras culturas celulares e sistemas *in vivo* (66, 74, 75). Esse composto ainda tem a propriedade neuro-protetora, prevenindo a formação e a ação de radicais. Além do efeito antioxidante *per se*, a MLT

ainda é capaz de regular positivamente alguma das importantes enzimas antioxidantes (glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase, glucose 6-phosphate dehydrogenase, Cu⁺, Zn⁺ e Mn⁺ superoxide dismutase e catalase) e regular negativamente as enzimas pró-oxidantes (NO sintases, lipoxigenases) (76).

Uma das vias de metabolização de MLT é a formação do seu produto de abertura de anel indólico, o AFMK. Esse é ainda deformilado a um composto mais estável, o AMK (figura 1). Apesar de o AFMK ter sido encontrado em líquido cerebral, não sabia ao certo qual a via de síntese desses compostos. Nosso grupo, com o trabalho de Silva, S.O. e colaboradores mostramos pela primeira vez a oxidação de MLT pela MPO em células do sistema imune, particularmente neutrófilos, monócitos e macrófagos, em uma via enzimática (5). AFMK e AMK, além de apresentar funções muito semelhantes à MLT, suas atividades muitas vezes são superiores a da própria MLT (5, 6, 77-80). De acordo com outro trabalho de Silva, S.O. e colaboradores, MLT é metabolizada ao AFMK em sítios inflamatórios dada a presença deste último em altas concentrações no liquor de pacientes com meningite viral. A coincidência da presença de AFMK e a diminuição de parâmetros inflamatórios como celularidade e concentrações de proteínas e citocinas pró-inflamatórias dão indícios da ação imunomodulatória desse composto (3). O AMK foi ainda capaz de diminuir a regulação da enzima ciclooxigenase – 2 (COX-2) demonstrando uma ação anti-inflamatória (2). Nosso grupo ainda demonstrou o efeito inibitório de AFMK e AMK sobre a secreção de citocinas (IFN- γ , IL-2) e proliferação de linfócitos T humanos previamente ativados, sugerindo que parte dos efeitos biológicos descritos para MLT pode ser intermediado por seus produtos de oxidação (81).

3.2. Indolamina 2,3 dioxigenase

A enzima indolamina 2,3 dioxigenase (IDO) é uma hemoproteína monomérica localizada no cromossomo 8 p12-p11. Ela possui como grupo prostético a protoporfirina IX e seu peso é de aproximadamente 42 kDa. Apesar de ser uma enzima descoberta há quase 40 anos (82), sua estrutura terciária foi desvendada somente em 2006 por Sugimoto, H. e colaboradores (83). A enzima possui dois domínios distintos (maior e menor), sendo que o maior domínio é helicoidal e apresenta 13 α -hélices e duas 3_{10} hélices e o menor domínio é composto de 6 α -hélices, 2 folhas β curtas e três 3_{10} hélices (figura 2). Devido ao oxigênio molecular ligar-se a sítio de coordenação do ferro heme as características estruturais desse ambiente distal do heme pode ser o responsável pela reação dioxigenásica da IDO.

Figura 2 - Estrutura terciária de IDO. Em azul escuro está o domínio menor e em verde está o domínio maior. Cadeia de ligação está em azul ciano. O *loop* longo de conexão entre os dois domínios está em vermelho. Retirado de Sugimoto e colaboradores 2006 (83).

A IDO é expressa em diferentes tecidos como no trato gastro intestinal (esôfago, estômago, intestino grosso e delgado), sistema reprodutor masculino (epidídimo, testículo, próstata) e sistema urinário (bexiga e rim). Observa-se IDO também em células

dendríticas, monócitos, macrófagos, eosinófilos, células epiteliais, fibroblastos, músculo vascular liso, células endoteliais e algumas linhagens de tumores. Recentemente foi descrito que a IDO apresenta uma localização específica em diversos tecidos (84) implicando nas suas funções biológicas. Apesar de este trabalho ter descrito a presença de IDO em diversos tecidos de camundongo, nada foi mencionado sobre as células do sistema imune.

A IDO catalisa a oxidação de TRP à NFK. Apesar de não apresentar uma especificidade de substrato a IDO tem uma preferência pela L -TRP, entretanto outros substratos já foram descritos como a D -TRP e a 5-metoxi- D,L -TRP (68). Estudos mecanísticos da reação de L -TRP com IDO mostraram que a enzima encontra-se naturalmente na forma férrica (Fe^{+3}), forma não ativa, e é necessário um agente redutor para iniciar e manter a sua atividade enzimática. *In vitro* o sistema azul de metileno/ascorbato (27, 85, 86) é amplamente utilizado apresentando bons resultados. Inicialmente considerou-se que esse sistema geraria $O_2^{\cdot-}$ e este radical livre reduziria o grupo férrico da IDO, tornando-a cataliticamente ativa (86). Entretanto, trabalhos seguintes questionaram a ação de $O_2^{\cdot-}$, uma vez que células e tecidos apresentam baixas concentrações destes ânion, sendo insuficiente para a ativação da IDO e principalmente pela baixa interferência da enzima superóxido dismutase (SOD) na formação de QUIN. Recentemente um estudo apresentou uma nova hipótese de agente redutor de IDO, o sistema citocromo b5/citocromo P450 redutase na presença de sistema regenerador de NADPH (NADPH/glucose 6 fosfato/ glicose 6 fosfato desidrogenase) que poderia atuar em ambos ensaios (*in vitro* e *in vivo*) (28). Uma vez que a IDO- Fe^{+3} é ativada a IDO- Fe^{+2} , o sistema dioxigenásico se mantém às custas de oxigênio molecular (O_2) (figura 3).

Figura 3: Esquema resumido do ciclo dioxigenásico da IDO.

A oxidação de TRP se dá através da inserção de 2 oxigênios no seu anel pirrólico (87). Terentis, A. C., e colaboradores mostraram que o mecanismo de clivagem do anel indólico envolve a abstração de próton pelo O₂ ligado ao ferro, seguido de adição eletrofílica do oxigênio, atacando a dupla ligação entre os carbonos C2 e C3 do anel indólico (88). Esse mecanismo foi discutido por Sugimoto, H. e colaboradores como sendo plausível, mesmo após a descoberta da estrutura cristalina de IDO (figura 4) (83).

Figura 4: – Esquema mostrando a interação de IDO com TRP, levando a clivagem do anel indólico. (modificado de Sugimoto, H. e colaboradores. 2006 (83))

Por apresentar um grupo heme, a IDO também apresenta atividade peroxidásica (89). Esse fato foi demonstrado por Ferry, G. e colaboradores (68), ensaiando a IDO na presença de H_2O_2 . Nessas condições a atividade dioxigenásica não ocorre, e a degradação de TRP não é realizada. Quando a atividade dioxigenásica está presente, a ação peroxidásica é inibida e o substrato da IDO-peroxidase não é oxidado. Esse fato talvez auxilie na compreensão da inibição da ação dioxigenásica de IDO na presença de H_2O_2 , mesmo em relativamente baixas concentrações (10 μM) (90).

A descrição da IDO em placenta auxiliando na não rejeição do feto semi-alógeno (91) foi o primeiro trabalho demonstrando de fato a ação imunomodulatória de IDO. Estudos posteriores demonstraram extensivamente o papel da IDO na tolerância e imunossupressão (92-94) dado que ela foi considerada uma proteína fundamental na caracterização de células dendríticas com funções regulatórias (95) e macrófagos com atividade supressora (96, 97). O modo como a IDO leva a supressão de células do sistema imune, principalmente linfócitos T, é um ciclo de retroalimentação positiva. A diminuição de TRP e aumento de compostos como QUIN e 3-hidroxiquinurenina ativam T_{reg} e células dendríticas supressoras. As células T_{reg} são capazes de suprimir a atividade de células T $CD8^+$ (98) e também podem induzir a expressão de IDO em células dendríticas tornando-as supressoras, gerando uma retroalimentação positiva. Esse processo é importante para algumas situações como na placenta, tornando os linfócitos maternos tolerantes aos antígenos do feto alógeno, e em células ou tecidos transplantados, diminuindo a rejeição ao tecido doado (99, 100). Entretanto essa ação pode ser patogênica em outras situações.

A presença e ativação de IDO em alguns tipos tumorais representam um dos mecanismos pelo qual as células tumorais podem escapar do sistema imune. Os benefícios de sobrevivência destes mecanismos são balanceados pelo custo de privarem-se de TRP. Vários estudos têm sugerido que a super expressão de IDO pode

levar ao imunoescape de câncer de mama em camundongos (101) e a presença de células dendríticas IDO⁺ em linfonodos que drenam o tumor silenciam as células T tumor-específicas e converte células T CD4⁺ à T_{reg} (98, 102). Estes fatos estão associados a um mau prognóstico da doença. Entretanto a correlação entre a supressão imune e o mau prognóstico não são sempre evidentes. Em linfoma de Hodgkin, um aumento de T_{regs} está associado a um bom prognóstico (103). Esses resultados sugerem que IDO é uma enzima necessária para reações imunes anticâncer nas células que infiltram no tumor (104).

Há um recente relato que a IDO estaria envolvida no controle do tônus vascular. Células endoteliais de artérias apresentam IDO e estas são capazes de catalizar a oxidação de TRP à QUIN. A atividade da enzima e a presença de IFN- γ foram importantes para verificarem o relaxamento das artérias e este relaxamento foi induzido por QUIN e mediado pela ativação das vias de adenilato e guanilato ciclase solúvel (105).

Após a recente descoberta da IDO-2 humana e de camundongo os estudos de IDO estão tomando novos rumos (104, 106-108). Este gene é codificado no cromossomo 8, adjacente ao gene da IDO sugerindo que eles se formaram via duplicação de genes. A conservação entre as IDOs é maior entre a IDO-2 de camundongo e humano (72% idêntico, 84% similar) do que entre as sequências de IDO-2 e IDO tanto em humano quanto em camundongo (62% idêntico, 77% similar). Em camundongos, a proteína IDO-2 é predominantemente expressa em rim, epidídimo, testículo, fígado (106), ovário e útero (10). Apesar da expressão de ambas as proteínas de IDO em alguns tecidos, por exemplo, o epidídimo, a imuno-histoquímica demonstrou que a IDO e IDO-2 são expressas em diferentes tipos celulares, sugerindo uma função não redundante. Em camundongos, a IDO foi encontrada nas células principais e apicais da cabeça do epidídimo, enquanto que a IDO-2 foi encontrada na cauda do espermatozóide (106).

Apesar de apresentarem homologia entre si, as IDOs são induzidas por estímulos

distintos. Em uma infecção murina de malária, a indução de IDO foi dependente da presença de IFN- γ (109), enquanto que a expressão de IDO-2 não se alterou ou foi diminuída (106). É possível que outras citocinas regulem positivamente a expressão de IDO-2 em alguns tipos celulares, como a indução de RNAm de IDO-2 em linhagem de células pré dendríticas estimuladas a diferenciação para células dendríticas com GM-CSF (108).

Estudos revelam que a IDO-2 cataboliza vários substratos, similares aos já reconhecidos como sendo substratos de IDO (L -TRP, D -TRP, 5-hidroxitriptamina, triptamina e 5-HT), mas a eficiência da reação é menor (10). Estudos preliminares em IDO e IDO-2 recombinantes e lisados celulares de HEK293T (rim embrionário humano) transfectados com as IDOs demonstraram que IDO-2 apresentou somente 3-5% de formação de QUIN, quando comparada a IDO nas condições estabelecidas para a atividade de IDO *in vitro* (110). Quando verificamos estes parâmetros em células HEK193T transfectadas com as IDOs mantidas em cultura foi observado que expressão das duas enzimas apresentavam níveis comparáveis entre si (106).

Devido às ações já descritas para IDO, esta enzima é alvo terapêutico para tratamentos tumorais e distúrbios psicológicos utilizando inibidores. Para o desenvolvimento de inibidores de IDO é necessário um conhecimento profundo da estrutura do sítio ativo da enzima, além de ser capaz de testar outros grupos químicos similares para a descoberta de novos grupos capazes de atuar sobre a enzima. Vários grupos tem se empenhado em desenvolver inibidores de IDO cada vez mais eficientes. Inicialmente todas as moléculas descritas com atividade inibitória de IDO eram compostos contendo um núcleo indólico como o composto norhaman que é um inibidor incompetitivo e apresentou um K_i de 176 μ M (111). A inserção de uma metila no nitrogênio do anel (1MT; $K_i=34$ μ M) e a substituição do nitrogênio do anel por oxigênio ou por enxofre também impactaram na atividade catalítica da enzima (112). A brassinina, uma fitoalexina

de plantas crucíferas, e seus derivados também apresentaram atividade inibitória para IDO (113). O K_i encontrado para a brassinina e para o seu derivado contendo um bromo no anel aromático foi de 27,9 e 24,5 μM respectivamente (114).

Após a estrutura cristalina da IDO foi possível verificar que outros núcleos poderiam ser bons inibidores. O 4-fenil-imidazol apresentou um K_i de 4,4 μM quando este estudo havia sido realizado com D -TRP como substrato (115), levantando a possibilidade da utilização de novos núcleos estruturais como inibidores de IDO. Encontrou-se três derivados de 4-fenil-imidazol com K_i entre 5,0 e 9,0 μM frente ao próprio 4-fenil-imidazol que apresentou um K_i de 48 μM quando o ensaio foi realizado com L -TRP (116). O núcleo naftoquinona foi descrito como um novo núcleo farmacofórico. O resultado encontrado para alguns dos substituintes deste núcleo apresentou K_i em torno de 0,14 μM (117). Até o momento, este núcleo é o que vem trazendo os melhores resultados na inibição da IDO.

A busca por inibidores baseia-se na capacidade de 1MT ou outras moléculas menores terem efeitos antitumorais. Em 2002, mostrou-se a diminuição da velocidade de crescimento celular de carcinoma de pulmão murino com a utilização de 1MT (118). Foi descrito também que em tumor mamário espontâneo proveniente de um modelo murino (119) 1MT retardou o crescimento tumoral quando utilizado com quimioterápicos, não sendo observado o mesmo resultado quando o 1MT foi utilizado sozinho. Não foi verificado aumento dos efeitos colaterais observados em camundongos recebendo ambos agentes, sugerindo que a resposta sinérgica parece não ser devido ao aumento de efetividade de dose do quimioterápico sozinho (101). A depleção imune de células T CD8^+ antes do tratamento aboliu a eficácia do tratamento com 1MT. Esses achados confirmaram que o 1MT age indiretamente através da via mediada por células T. Células dendríticas IDO^+ que drenam o tumor são capazes de levar células T a anergia. Esta situação foi revertida na presença de 1MT. Verificou-se também que o isômero D -1MT foi mais eficiente em diminuir a supressão de linfócitos T causada por células dendríticas

(120).

Verificou-se que 1-metil-D-triptofano (D -1MT) inibe seletivamente a IDO-2, enquanto o seu isômero 1-metil-L-triptofano (L -1MT) inibe seletivamente a IDO (108). Era difícil explicar porque o isômero D -1MT tinha ação antitumoral mais potente comparado ao seu isômero L , sendo esse, um melhor inibidor de IDO. Com a descoberta de IDO-2 e tendo essa a possibilidade de ser expressa em células dendríticas, levanta a hipótese de que a IDO-2 pode ser a enzima envolvida na evasão imune de tumores (108).

O uso de 1MT fez surgir à dúvida de qual isômero seria o mais eficiente. Em alguns sistemas biológicos, tem-se observado que o D isômero parece ser mais eficaz (120) quando usado como co-adjuvante no tratamento de tumores. Entretanto, estudos nas linhagens tumorais murina MC57 e COS de símio transfectados com IDOs humana, mostrou que o L -1MT foi superior ao D -1MT na inibição de formação de QUIN. Apesar destas divergências de resultados, foi possível verificar que a combinação de um agente imunomodulatório como o 1MT com agentes quimioterápicos convencionais representaram uma boa estratégia de atuação. A possibilidade de inibidores de IDO mais eficientes e menos tóxicos parece ser um bom caminho a ser traçado para uma modulação na agressividade de tumores IDO⁺ e do próprio sistema imune.

3.3. Mieloperoxidase (MPO)

A MPO é uma heme proteína codificada no braço longo do cromossomo 17 q12-24 (121-124) contendo 11 *introns* e 12 *exons* (125). A sequência inicial forma a préproMPO, de 80 kDa (126) que é convertida ao produto de 90 kDa (apoproMPO) (125) pela clivagem do peptídeo sinal de 41 aminoácidos e glicosilação pelas cadeias laterais ricas em manoses (127). Essa última associa-se à calreticulina (CRT), à calnexina (CLN) e ao ERp57, chaperonas moleculares do retículo endoplasmático (RE) (128) que apesar de serem proteínas que se ligam ao cálcio, elas se encontram no RE (128). Logo, há a inserção do grupo heme formando a próMPO, enzimaticamente ativa. Ela é então transportada ao complexo de Golgi (CG) e lá um pró-peptídeo de 125 aminoácidos (129-131) e um hexa-peptídeo (ASKVTG) são retirados. Essas deleções formam um intermediário de vida curta de 74 kDa que é clivado em duas subunidades, a subunidade- α de 59 kDa e a subunidade- β de 13,5 kDa que se ligam entre si por ligações covalentes associadas ao grupo heme. Duas dessas unidades interagem para produzir a forma madura de MPO e cada metade é ligada por uma ponte dissulfeto (132, 133) (figura 5).

Figura 5: Biossíntese e processamento de MPO. A MPO é traduzida como um único produto primário de 80 kDa contendo as sequência do propeptídeo (pró), a maior subunidade (α) e a menor subunidade (β). A clivagem co-translacional do peptídeo sinal e a incorporação de cadeias laterais de oligossacarídeos ricos em manose gera a apopróMPO de 90 kDa, que associa-se sequencialmente as chaperonas moleculares CRT e CLN ainda no RE. Durante esta associação a apopróMPO adquire o heme (estrela vermelha) e se torna a enzimaticamente ativa próMPO. Há ainda uma série de etapas proteolíticas retirando um hexapeptídeo entre a as subunidades leve e pesada e o resíduo de serina terminal. A proteína resultante é clivada em duas subunidades acopladas pela dimerização para a produção da MPO madura (adaptado de Hanson, M. e colaboradores, 2006. (134)).

A estrutura cristalina da proteína MPO humana mostrou um dímero catiônico de 146 kDa com uma única ponte dissulfeto (Cys153) entre as metades simétricas (73 kDa). Cada metade tem dois polipeptídeos, um de 14,5 kDa contendo 106 aminoácidos e outro de 58,5 kDa contendo 467 aminoácidos, esse último polipeptídeo é ainda glicosilado (figura 6) (133). Cada metade simétrica da molécula contém um centro com heme composto de 6 α -hélice, 5 no peptídeo grande e 1 no pequeno.

Figura 6: Representação em fita da estrutura dimérica da MPO. Em verde claro e azul claro estão as cadeias α glicosiladas e em verde escuro e azul escuro estão as cadeias β não glicosiladas. (Fenna, R.E. e colaboradores 1995 (135))

O grupo heme da MPO é derivado da protoporfirina IX e está ligado covalentemente à proteína. (135). O heme da protoporfirina é considerado distorcido da planaridade com um formato abaulado devido as ligações covalentes inclinadas do anel pirrólico A, e em menor extensão do C, com relação ao lado distal (135). A presença da terceira ligação covalente entre o heme e a proteína (Met243) faz com que a MPO apresente um espectro de absorção mais próximo da região do vermelho alterando a absorção da banda Soret de 412 nm (peroxidases) para 430 nm (MPO), com bandas adicionais em 496, 570, 620 e 690 nm, responsáveis pela cor verde da proteína (132).

A MPO é expressa ativamente em células da medula óssea como os promielócitos e prómielomonocitos, entretanto durante o processo de maturação celular essa expressão diminui (25, 126). Apesar da baixa expressão da enzima em células maduras, a concentração de MPO em neutrófilos é alta, sendo até 5% do peso seco das células. A concentração encontrada em monócitos é apenas 1/3 da concentração encontrada em neutrófilos, o que, mesmo assim, representa uma alta concentração (136). Quando monócitos se diferenciam em macrófagos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, o

conteúdo de MPO é perdido. Entretanto, o gene da MPO pode ser reativado em algumas condições (137). Também tem sido discutida a possibilidade de que há a contribuição de MPO previamente presente em neutrófilos no conteúdo de MPO de macrófagos. Entretanto, nosso grupo demonstrou, em modelo de ativação com a lecitina Con A, que em macrófagos recém migrados ao peritônio os níveis de expressão de MPO não foi dependente de neutrófilos (138).

A localização intracelular de MPO é um assunto discutido marginalmente na literatura. Sabe-se que em neutrófilos a enzima está estocada em grânulos azurófilos citoplasmáticos. Entretanto, em macrófagos e monócitos não se sabe ao certo onde elas estão localizadas. Um estudo demonstrou que quando macrófagos são estimulados com GM-CSF, a enzima fica próxima a região perinuclear, enquanto que quando são estimulados por M-CSF, a distribuição é periférica (25). Este fato, associado à presença de MPO em outros tipos celulares que não fagócitos (neurônios (139), evidencia fortemente o envolvimento da MPO na sinalização celular, na modulação imunológica e em doenças. Aparentemente a localização da enzima e o sistema na qual ela se co-localiza pode definir diferentes funções.

As peroxidases catalisam a reação de formação de ácido hipohaloso. Todas elas são capazes de formar o ácido proveniente da reação com iodo (I^+), entretanto, somente a MPO é capaz de reagir com ânions cloreto (Cl^-) em pH 7,0. A formação dos ácidos é decorrente da geração de um composto I (MPO-I) através de H_2O_2 , e o retorno da enzima para a forma nativa, gerando o ácido hipohaloso correspondente ao haleto da reação (140).

O MPO-I é formado pela reação da peroxidase Fe(III) e excesso de H_2O_2 , apresentando dois equivalentes oxidativos a mais que a enzima nativa (figura 8). Durante a reação há a formação de uma molécula de água e um oxigênio ainda fica coordenado ao ferro, esse contendo 6 elétrons de valência, um potente agente oxidante (141). A meia

vida de MPO-I é de aproximadamente 100 ms.

Além da formação de HOCl, um importante agente microbicida e um forte oxidante (142), a MPO é capaz de entrar em um ciclo peroxidásico, que envolve a ação de outra forma da MPO, o composto II (MPO-II). Nessa reação, o MPO-I é reduzido por dois sucessivos passos de um elétron ao MPO-II oxidando vários substratos (AH) aos seus radicais correspondentes ($A^\cdot$). Para que o ciclo seja completo, o MPO-II também reage com substratos formando seus radicais correspondentes, levando a enzima a sua forma nativa (figura 8). Para que essas reações ocorram os melhores substratos são compostos doadores de elétrons. Tirosina, ditirosina (143), ascorbato (144), ferrocianeto (145) e ácido 5-aminosalicílico (146) mostraram ser bons substratos tanto para MPO-I quanto para MPO-II.

A MPO pode ainda ser convertida a composto III (MPO-III) pela ação de $O_2^{\cdot-}$ (figura 7). Esse ânion é capaz de transferir um elétron para os MPO-I, II e III (147). A redução do MPO-III por $O_2^{\cdot-}$ regenera a MPO nativa, produzindo H_2O_2 e O_2 e ainda pode ser considerado uma enzima similar a SOD. A formação do MPO-III pode inibir a formação de HOCl onde a concentração de MPO e o fluxo de H_2O_2 são baixos e a taxa de transformação da enzima férrica é limitada (148, 149). Essa interação de MPO com $O_2^{\cdot-}$ pode promover atividades catalíticas não dependentes da halogenação e do ciclo peroxidásico, como a hidroxilação de substratos aromáticos como fenol (150) e salicilato (151) e a oxidação de MLT ao AFMK em processos dependentes de $O_2^{\cdot-}$. Acredita-se que essas reações são iniciadas por MPO nativa com $O_2^{\cdot-}$ para a formação de MPO-III, envolvendo um intermediário reativo comum com propriedade similares ao 1O_2 (152).

Figura 7: Esquema resumido do ciclo peroxidásico da enzima MPO e da formação de MPO-III.

O principal composto da MPO, o HOCl, pode atuar diretamente ou ainda pode continuar a reagir com aminoácidos extracelulares formando cloraminas ([R-NHCl]) (153-155), e com H_2O_2 formando oxigênio singlete (1O_2) (156). Trabalhos mostram que HOCl, através da ação de [R-NHCl], apresenta ação apoptótica em células do sistema imune (157-159). Além disto, produtos gerados a partir de HOCl (por exemplo, [R-NHCl] e 1O_2) são capazes de ativar a produção de citocinas, assim como ativação de quinases e outras enzimas (160), fazendo parte de processos de sinalização celular. Há evidências que a MPO possui ação sobre as células mesmo sem envolver a atividade catalítica. Macrófagos tratados com MPO foram capazes de liberarem $TNF-\alpha$ e baixos níveis de $IFN-\gamma$ e aumentaram a citotoxicidade dependente de macrófagos, modulando a resposta imune (20).

Devido aos resultados benéficos encontrados em pacientes com deficiência de MPO vem sendo estudado a possibilidade de utilização de inibidores de MPO para diminuir seus efeitos nocivos. Inibir MPO também implica em efeitos adversos na sua ação contra patógenos. Até o momento há descrito alguns tipos de inibidores de MPO. Derivados de indóis e triptaminas (AH) são inibidores reversíveis da atividade de cloração de MPO, pois eles exibem um potencial de redução de um elétron (161). Por serem considerados bons doadores de elétrons somente para o MPO-I, eles são

considerados substratos ruins da MPO. Apesar deste potencial inibidor, em condições fisiológicas estes inibidores não funcionariam, pois há a presença de outros substratos como tirosina (143), ascorbato (144) e superóxido (162, 163) podem promover a volta do MPO-II para a forma nativa da enzima. Outra classe de inibidores de IDO são as hidrazidas e hidrazinas. Estes são inibidores suicidas, uma vez que quando se ligam a enzima destroem o heme.

Atualmente se reconhece que MPO tem participação na bioquímica dos neutrófilos e monócitos como na imunomodulação (164). As ações da MLT e seus produtos de oxidação também são reconhecidas como parte da imunomodulação que envolve a MPO e já foi discutida anteriormente. Também se tem associado a MPO com algumas doenças, como a glomerulonefrite (165) e a aterosclerose (166). A MPO tem sido relacionada ainda a alguns dos efeitos deletérios ocorridos durante o processo inflamatório, por exemplo, a catalisar a cloração de proteínas e oxidar lipídeos e proteínas (137, 167).

Há evidências que a MPO está envolvida em diferentes mecanismos de dano a parede arterial humana, com isso, a própria MPO e biomoléculas clorinadas vêm sendo consideradas marcadores específicos de reações de oxidação dessa enzima. As proteínas e LDL modificadas por HOCl estão presentes nas lesões ateroscleróticas e estão localizadas tanto nas células vasculares quanto no meio extracelular (168). Na oxidação de LDL por MPO verificou-se modificações nas apolipoproteínas como a formação de clorotirosina, ditirosina e nitrotirosina (169) e também ações nos lipídeos presentes nessa molécula (170). Dois outros estudos demonstraram que os níveis plasmáticos de MPO são preditores de risco em pacientes com síndromes coronárias agudas ou com dores no peito (171-173). Interessantemente a deficiência de MPO, ou baixos níveis dessa enzima no sangue tem um efeito benéfico contra as doenças cardiovasculares (137, 167).

3.4. Subpopulações de peritônio de camundongo

A cavidade peritoneal abriga uma variedade de células do sistema imune sendo uma excelente fonte de fagócitos mononucleares. Inicialmente acreditava-se que os macrófagos eram as principais células nesta cavidade, entretanto descobriu-se em 1980, a presença de um subtipo de linfócito (linfócitos B-1) (174-176) em quantidades similares as encontradas para os macrófagos. Com relação à quantidade celular no peritônio, foi descrito que apenas 50% das células peritoneais eram macrófagos. Estão ainda presentes linfócitos T e linfócitos natural *killer* (NK) nessa cavidade (177).

Macrófagos pertencem ao sistema mononuclear fagocítico que abriga diferentes subtipos celulares distribuídos pelo organismo. Esse sistema inclui as células de Kupffer, os macrófagos alveolares, as microglias, os osteoclastos e as células dendríticas e macrófagos peritoneais (178, 179). Essas células são especializadas em fagocitar patógenos intra e extracelulares, que são facilmente ingeridos após a opsonização tanto com fatores do complemento (fragmentos C3), quanto com anticorpos e proteínas secretadas pelo fígado durante a infecção. A ativação do sistema imune geralmente ocorre através da ativação dos macrófagos chamados “residentes”. Estas células são provavelmente originadas de monócitos circulantes, os quais migram constantemente para órgãos periféricos e se diferenciam em células fagocíticas como macrófagos e células dendríticas. Estes macrófagos residentes devem atuar como sentinelas capazes de rapidamente iniciar o processo inflamatório e recrutar novas células linfóides e mielóides para o local da inflamação. Os monócitos e macrófagos de camundongo são geralmente identificados pelas suas expressões de CD11b e F4/80. CD11b é a cadeia a da integrina (cadeia a) Mac-1, sendo essa apresentando ainda uma cadeia b (CD18). CD11b/CD18 juntas possuem funções como molécula de adesão (ligando-se a molécula

de adesão intracelular – ICAM) e reconhecimento de fragmentos iC3b. O F4/80 é uma molécula com sete domínios transmembrana expressa exclusivamente em macrófagos murinos (180, 181), podendo atuar na aderência celular e ainda contribuir para a indução de tolerância por favorecer a geração de T_{regs} (182). Além de F4/80 e CD11b, os macrófagos e monócitos ainda podem expressar Gr-1 (Ly6-C/Ly6-G), L-selectinas (CD62L) e receptores de quimiocinas como CCR2 e CX3CR1. Essas células são caracterizadas pela ausência de moléculas expressas em linfócitos T, B e NK. Distribuições diferenciadas da expressão destes marcadores de superfície podem descrever diferentes subtipos de monócitos e macrófagos.

Ghosn E. E. B. e colaboradores descreveram dois subtipos de macrófagos encontrados em peritônio de camundongo (183). Avaliando as células CD11b^{high} foram encontradas duas subpopulações celulares que se distinguiram em tamanho, fenótipo de marcador de superfície e função e baseado no tamanho e fenótipo encontrados em citometria de fluxo foram denominados de SPM (*small peritoneal macrophage* – macrófago peritoneal pequeno) e LPM (*large peritoneal macrophage* – macrófago peritoneal grande). Em camundongos não estimulados encontramos aproximadamente 90% de LPM e apenas 10% de SPM.

Estes dois subtipos de macrófagos apresentam características funcionais diferentes. Tanto SPM quanto LPM possuem a habilidade de fagocitar, mas SPM apresentou maior quantidade de bactérias intracelulares do que LPM. A capacidade de produzir óxido nítrico (NO) também foi testada. Quando este ensaio foi realizado *in vitro*, somente LPM foi capaz de produzir este composto, entretanto quando o ensaio foi realizado *in vivo*, tanto SPM quanto LPM apresentaram esta capacidade. Quando os camundongos receberam uma dose de LPS ou tioglicolato somente SPM persistiu na cavidade e esta célula não foi proveniente de uma diferenciação de LPM (183).

Os linfócitos B-1 (CD5⁺) são considerados uma subpopulação fisiológica em

camundongos selvagens (174, 184, 185). Estudos demonstraram suas funções, dentre elas a secreção espontânea de auto-anticorpos (186, 187). Os linfócitos B ($CD5^+$) não são gerados pelo desenvolvimento canônico de células B da linhagem hematopoiética da medula óssea adulta, tendo o seu desenvolvimento favorecido durante a fase fetal, principalmente no fígado (188-190). Com isso, estabeleceu-se a existência de duas linhagens progenitoras distintas, a primeira na fase fetal comprometida com o desenvolvimento de linfócitos B $CD5^+$ (B-1), e a segunda surgiria mais tardiamente, durante a hematopoiese na medula óssea adulta, e estaria comprometida com o desenvolvimento de linfócitos B convencionais (B-2) (191). Os progenitores de linfócitos B-2 ocupam a medula óssea, persistem por toda a vida adulta e repopulam as células B-2 periféricas. Por outro lado, os progenitores de células B-1, que surgem no fígado e baço, ocupam a cavidade peritoneal do animal e permanecem por um processo de auto-renovação (192). Em camundongos, há quatro principais células B periféricas e maduras, os linfócitos B-1a, os linfócitos B-1b, os linfócitos B-2 e os linfócitos B de zona marginal (B-MZ). Este último também reside no baço, envolvendo e limitando a polpa branca, separando-a da polpa vermelha (191, 193-196). Embora haja evidências da existência de dois diferentes progenitores, um para célula B-1 e um para célula B-2, não se pode descartar a existência de apenas um progenitor. Estudos demonstraram a capacidade de células B-2 de adquirir fenótipo de células B-1 como a expressão do CD5 e Ig/BCR mediante estímulos apropriados (197-201). Durante estudos com células B-1 foram encontradas células que não apresentavam CD5, passando a ser chamadas de células B-1b (202, 203). Experimentos de transferência adotiva de células mostraram que ambas B-1a e B-1b (Ig^+) eram auto-renováveis em recipientes congênicos, porém uma não era capaz de dar origem a outra (194, 203, 204). Um estudo mostrou que o progenitor de B1b era exclusivo dessa célula (205-207). Os linfócitos B-1b ($CD5^-$) se desenvolvem mais tardiamente do que as células B-1a e estão presentes no peritônio logo após o

estabelecimento de células B-1a representando aproximadamente 30% do total de células B-1 no peritônio.

Para separar e identificar todos esses subtipos de linfócitos, a expressão distinta de suas moléculas de superfície é de extrema importância. Os linfócitos B1 expressam grande quantidade de IgM (IgM^{high}) e pouca ou nenhuma expressão de IgD (IgD^{low}). Baixos níveis de molécula B220 e expressão rara de CD23 também auxiliam na identificação de B-1. Dentre os subtipos de células B, as células B-1 são as que expressam os maiores níveis de CD19, MHC-II, CD80 e CD86, e ainda expressam baixos, porém detectáveis níveis de CD5, um marcador universal para células T. As células B-1a e B-1b apresentam o mesmo fenótipo com exceção do CD5, que só é encontrado nas células B1-a. As células B-2 apresentam fenótipo oposto das células B-1 sendo elas IgM^{low} , IgD^{high} , $B220^{+/high}$ e $CD23^{high}$ e $CD5^{-}$. As B-2 também expressam CD19, MHC-II, CD80 e CD86, porém em menor intensidade do que as células B-1. Já as células B-MZ do baço apresentam um fenótipo misto, expressando IgM^{high} , IgD^{low} , $CD23^{-}$ e $CD5^{-}$ semelhante as B-1b e B220 semelhantes as B-2. Os marcadores para detectar células B-MZ são as altas expressões de CD21 (receptor de complemento) e CD1d (molécula da família do MHC envolvida na apresentação de estruturas glicolipídicas). Em B-1 e B-2 esses marcadores são pouco expressos. Um marcador importante que também está envolvido no estudo de células B é a molécula CD11b. Pensava-se que todas as células B-1 apresentavam CD11b, entretanto Gosh, E.E.B. demonstrou que somente metade dessas células expressam CD11b, representando estágios de diferenciação e desenvolvimento dessas células no peritônio (287).

Ghosn, E. E. B. demonstrou também a presença de duplas de linfócitos B-1 (208). Análises em citometria de fluxo mostraram células com características de B-1, porém com tamanho e granulosidades muito alto. Uma análise mais rebuscada verificou que essas células eram dois linfócitos juntos, sendo chamados de *doublets*. Um estudo com

camundongo F1 possibilitou a verificação desses *doublets*, pois nesse animal, metade das células B-1 apresentam IgM com genótipo “a” e metade com genótipo “b”, tornando possível a presença de *doublets* IgMa-IgMa, IgMb-IgMb e IgMa-IgMb. Realizando separação por citometria de fluxo dos *doublets* e marcação de IgMa e IgMb, demonstrou as duplas de células com as marcações diferentes. Imaginar que essas duplas celulares possam se comunicar entre si, através de sinapses como os linfócitos T não está descartada. Estudos recentes demonstraram alterações morfológicas das células constituintes das duplas, como a polarização de mitocôndrias para a região de possível sinapse. Ainda não há outras evidências demonstrando qual a função dessas duplas celulares. Os linfócitos B-1, além de se ligarem a si mesmos podem ainda interagir com macrófagos. Estudos demonstraram que aproximadamente 33% das células SPM expressam IgM^{high} (marcadores de B-1 peritoneais) e apenas 7% de LPM apresentam esse marcador. Em estudos minuciosos de citometria de fluxo demonstraram duplas de células B-1 e macrófagos e não macrófagos expressando marcadores de B-1. Apesar dessa diferença em porcentagem de interação de B-1 e LPM ou B-1 e SPM, como o número absoluto de células LPM e SPM são diferentes, os valores absolutos de B-1-LPM e B-1-SPM são muito semelhantes. Ao final, foi demonstrado que metade dos *doublets* são linfócitos B-1-B-1, 30% dos macrófagos SPM forma duplas com B-1 e 5% de LPM forma duplas com B-1.

A utilização de alguns estímulos que mimetizam a ativação celular *in vivo* é bastante aceita. Concanavalina A (Con A) é uma lectina extraída de feijão e é considerado o protótipo da família das lectinas vegetais. Lectina são carboidratos ligados a proteínas que não sejam enzimas nem anticorpos (209). Esta lectina demonstrou ter alguns importantes papéis na ativação do sistema imune, envolvendo linfócitos. A sensibilização de linfócitos é medida pelo aumento do tamanho da célula, quanto maior o tamanho mais sensibilizado está o linfócito. Con A foi capaz de sensibilizar linfócitos tornando 50% dos

linfócitos em tamanho grande em 48 horas. Esta lectina ainda aumentou a adesão de linfócitos com fibroblastos e aumentou a capacidade litica destes linfócitos (210). Con A foi capaz de induzir a proliferação de linfócitos além de induzir a produção de IFN- γ (211). Há diversos estudos utilizando Con A como modelo de indução de proliferação de linfócitos e expressão de IFN- γ e o nosso grupo demonstrou bastante interesse neste modelo.

4. Objetivos:

Avaliamos as interações entre as vias de metabolização de TRP, a via serotoninérgica e a via das quinureninas, incluindo ainda os produtos de oxidação de MLT gerados através da reação com peroxidases (HRP e MPO) com o intuito de estudarmos a regulação entre estas vias. Com o interesse nas enzimas IDO e MPO, avaliamos também a sua presença e localização em células de peritônio de camundongo residentes e ativadas.

4.1. Objetivos específicos:

1. Verificamos o efeito de 5-HT, MLT, AFMK e AMK na reação catalisada por IDO.
2. Verificamos se produtos formados a partir da reação de oxidação do triptofano catalisada por IDO tem efeito de em reações catalisadas por peroxidases, ou são substratos desta.
3. Averiguamos a localização intracelular e concentração de MPO em células de peritônio de camundongo (residentes e estimuladas com Con A).
4. Averiguamos a localização intracelular e concentração de IDO em células de peritônio de camundongo (residentes e estimuladas com Con A).

5. Materiais e Métodos

5.1. Reagentes e Dispositivos

Os reagentes acetonitrila grau HPLC, ácido acético glacial, ácido clorídrico fumegante, álcool etílico P.A., agar-agar, bicarbonato de potássio, bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, clorofórmio, diclorometano, fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio bibásico, fosfato de sódio bibásico, hidróxido de sódio, isopropanol, metanol, metanol grau HPLC, peróxido de hidrogênio 30%, sulfato de amônia e tween 20 foram adquiridos da Merck KGaA (Alemanha). 1-metil-DL-triptofano, β -mercaptoetanol, ácido ascórbico, ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), acrilamida, albumina sérica bovina, azul de metileno, N, N'-metilenobisacrilamida (bis-acrilamida), catalase, cloreto de amônio, concanavalina A, diaminobenzidina (DAB), dodecil sulfato de sódio (lauril sulfato de sódio – SDS), glicina, imidazol, isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG), lisozima, luminol (3-aminofthalhidrazida; 5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona), lucigenina (9,9'-bis (N-metilacridino nitrato)), melatonina (N-acetil-5-hidroxitriptamina), persulfato de amônio, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), ponceau S, quirunina, serotonina (5-hidroxitriptamina), meio de cultura RPMI sem vermelho de fenol, soro fetal bovino, N,N,N',N'-tetrametiletileneodiamina (TEMED), resina LR White, L-triptofano, trizma base, trizma hidrocloreto foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (Estados Unidos)/ Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Alemanha). Os reagentes azul de Coomassie G 250 e azul de Coomassie R 250 são provenientes da empresa Bio Rad Laboratories (Estados Unidos). Os anticorpos anti mieloperoxidase (camundongo), gp91 phox (humano), p40 phox (humano), indolamina 2,3 dioxigenase (humano e camundongo), secundário anticabra marcado com HRP e 4-cloro-naftol foram adquiridos

da empresa Santa Cruz Biotechnology (Estados Unidos). Os anticorpos antimieloperoxidase (humano) e o secundário anticoelho marcado com HRP foram adquiridos da Millipore Ind e Com (Estados Unidos). O extrato de levedura e a triptona foram obtidos da empresa Oxoid (Inglaterra). O kit cytofix/cytoperm para fixação e permeabilização celular foi adquirido da BD e da eBiosciences (Estados Unidos). O plasmídeo pRSET B foi adquirido da Invitrogen Corporation (Estados Unidos). Os anticorpos antiF4/80-PE, IgM – APC, CD5 – Cy5PE, IgD – PE e CD11b – FITC, filme de revelação, os padrões de peso molecular de proteínas de baixo peso (97, 66, 45, 30, 20.1 e 14.4 kDa), kit de revelação ECL, membrana de nitrocelulose para transferência de proteínas (poro de 0,45 µm) e a resina da coluna de níquel para purificação de proteínas foram obtidos da empresa GE healthcare (Estados Unidos). Os anticorpos F4/80 e CD19 monoclonal para camundongo e o anticorpo secundário anti rato IgG marcado com Texas Red[®] foram adquiridos da Abcam Inc. (Estados Unidos).

A água ultra pura é proveniente do equipamento Milli Q Synthesis, previamente purificado pelo equipamento Elix equipamentos Millipore Ind. e Com. (Estados Unidos).

As cepas de *Escherichia coli* foram gentilmente cedidas pela professora Irene da Silva Soares do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

5.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados neste projeto foram: agitador magnético de bancada (Fisaton – 752), balança analítica (Shimatsu – BL 3200H), banho seco para microtubos de 1,5 mL (Eppendorf – Thermostat plus), centrifuga de bancada refrigerada (Eppendorf – 5804 R), centrífuga refrigerada (Himac CR 20B2 Hitachi, rotor RPR20-2); citômetro de fluxo (modelo Canto II - BD Biosciences), cuba de transferência em tanque (BIORAD modelo Mini Trans-Blot cell), cuba para eletroforese vertical (BIORAD modelo Mini

Protean III); espectrofotômetro (Shimatsu – UV-1601PC), estufa bacteriana; fluxo laminar (VECO, modelo VSLF 90), freezer -20° C e -80° C, luminômetro (EG &G Berthold LB 96V de microplacas brancas), microscópio óptico (Nikon – Eclipse E200), micrótomo (Leica RM 2135), pHmetro (Quimis – SC09); sonicator (Bradson ultrasonifier 450).

Utilizamos também um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – High Performance Liquid Chromatography - Shimatsu), com a controladora SCL-10A VP, injetor automático SIL-10AF, duas bombas LC-10A VP, degaseificador DGV – 14A, detector de fluorescência RF-10A VL e detector de arranjo de diodos SDP-M 10A. HPLC preparativo, SHIMADZU SCL-10A VP acoplado a um coletor de frações FRC-10A e um detector UV-VIS. Todo o sistema é controlado pelo software Class VP.

Os microscópios utilizados para a captação das imagens foram: microscópio confocal (Bio Rad 1024) com laser de UV (363 nm) e visível (488, 567 e 657 nm) acoplado a um microscópio Zeiss Axiovert 100. Os cortes foram analisados com objetivas planapocromáticas de 40x (N.A. = 1,2, imersão em água) e de 63x e 100x (N.A.= 1,4, imersão em óleo) e microscópio eletrônico de transmissão (JEM 1011 da Jeol).

5.3. Preparo de Soluções

Segue uma lista das soluções utilizadas e alguns detalhes de preparação e conservação.

Meio de cultura ágar Luria-Bertani: 10,0 g de triptona, 5,0 g extrato de levedura, 10,0 g NaCl, 2,5 mL NaOH 1 M, 16,0 g de agar-agar e água ultrapura completando o volume de 1000,0 mL. Armazenamos as placas a 4°C.

Meio de cultura caldo Luria-Bertani: 10,0 g de triptona, 5,0 g extrato de levedura, 10,0 g NaCl, 2,5 mL NaOH 1 N e água ultrapura completando o volume de 1000,0 mL. Armazenamos a solução a 4°C.

Ponceau 0,1%: 0,1 g de Ponceau S, 30,0 mL de ácido acético glacial e água ultrapura até

completar o volume de 100,0 mL. Armazenamos a solução a temperatura ambiente.

Solução corante de azul de Coomassie: 0,6 g de azul de Coomassie R-250, 33,0 mL de ácido acético glacial, 113,5 mL de metanol e 146,0 mL de água ultrapura completando o volume para 300,0 mL. Armazenamos a solução a temperatura ambiente em frasco âmbar.

Solução de 1-metil-DL-triptofano (1,0 mM): 2,2 mg de 1-metil-DL-triptofano em 10,0 mL de água ultrapura. Aliquotamos e estocamos a -20°C.

Solução de 3-aminoftalhidrazida (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona; luminol) (10,0 mM): 17,7 mg de luminol em 10,0 mL de água ultrapura. Aliquotamos e estocamos a -20°C em frasco âmbar.

Solução de 9,9'-Bis(N-metilacridino nitrato) (lucigenina) (10,0 mM): 51,0 mg de lucigenina em 10,0 mL de água ultrapura. Aliquotamos e estocamos a -20°C em frasco âmbar.

Solução de ácido tricloroacético 30%: 3,0 g de ácido tricloroacético em 10,0 mL de água ultrapura. Aliquotamos e armazenamos a -20°C.

Solução de acrilamida 12%/ bis-acrilamida 1,2%: 12,0 g de acrilamida e 1,2 g de bis acrilamida em 100,0 mL de água ultrapura. Filtramos a solução em filtros com poros de 0,45 µm, estocamos em frasco escuro a 4°C.

Solução de acrilamida 30%/ bis-acrilamida 0,8%: 30,0 g de acrilamida, 0,8 g de bis acrilamida em 100,0 mL de água ultrapura. Filtramos a solução em filtros com poros de 0,45 µm e estocamos em frasco escuro a 4°C.

Solução de ampicilina (100,0 mg/mL): 100,0 mg de ampicilina em 1,0 mL de água ultrapura. Aliquotamos e estocamos a -20°C.

Solução de ascorbato (200,0 mM): 352,2 mg de ácido ascórbico em 10,0 mL de água ultrapura. Ajustamos o pH da solução para 6,5, aliquotamos e armazenamos a -20°C.

Solução de azul de metileno (0,5 mM): 1,9 mg de azul de metileno em 10,0 mL de água ultrapura. Aliquotamos e armazenamos a -20°C.

Solução de bloqueio para *blotting* da proteína recombinante humana IDO: 0,7 g de leite desnatado, 0,4 g de BSA em 15,0 mL de TBS.

Solução de bloqueio para *blotting* de IDO intracelular (leite 1% + soro fetal bovino 2%): 0,2 g de leite desnatado, 0,4 mL de soro fetal bovino em 20,0 mL de TBS/ tween 20 0,1%. Armazenamos a 4°C até o momento do uso.

Solução de catalase (5,0 mg/mL): 5,0 mg de catalase em 1,0 mL de água ultrapura. Aliquotamos e armazenamos a -20°C.

Solução de concanavalina A (1,0 mg/mL): 1,0 mg de Con A em 1,0 mL de água ultrapura. Aliquotamos e estocamos a -20°C.

Solução de DAPI (10,0 mM): 10,0 mg de DAPI em 2,6 mL de água ultrapura. Diluímos a solução 1:10 na hora do uso. Estocamos a -20°C.

Solução de imidazol (1,0 M): 0,7 g de imidazol em 10,0 mL de água ultrapura. Aliquotamos e estocamos a 4°C.

Solução de IPTG (100,0 mM): 23,8 mg de IPTG em 1,0 mL de água ultrapura. Aliquotamos e estocamos a -20°C.

Solução de lauril sulfato de sódio 10% (dodecil sulfato de sódio – SDS): 1,0 g de SDS em 10,0 mL de água ultrapura. Armazenamos a temperatura ambiente.

Solução de lisozima (10,0 mg/mL): 10,0 mg de lisozima em 1,0 mL de água ultrapura. Estocamos a -20°C.

Solução de melatonina (5,0 mM): 5,8 mg de melatonina em 5,0 mL de água ultrapura com 10% de etanol P.A. Aliquotamos e estocamos a -20°C.

Solução de NaOH (1,0 M): 0,4 g de NaOH em 10,0 mL de água ultrapura. Estocamos a solução a 4°C.

Solução de persulfato de amônio 10%: 0,5 g de persulfato de amônio em 5,0 mL de água ultrapura. Aliquotamos e estocamos a -20°C.

Solução de PMSF (100,0 mM): 0,2 g de PMSF em 10,0 mL de etanol P.A. Aliquotamos e

estocamos a -20°C.

Solução de quinurenina (2,0 mM): 2,1 mg de quinurenina em 5,0 mL de água ultrapura.

Aliquotamos e estocamos a -20°C.

Solução de superóxido dismutase (SOD) (2,0 mg/mL): 2,0 mg de SOD em 1,0 mL de água ultrapura. Estocamos a -20°C.

Solução de triptofano (10,0 mM): 20,4 mg de triptofano em 10,0 mL de água ultrapura.

Aliquotamos e estocamos a -20°C.

Solução de triptofano (5,0 mM): 10,2 mg de triptofano em 10,0 mL de água ultrapura.

Aliquotamos e estocamos a -20°C.

Solução descorante para gel de poliacrilamida: 7,5 mL de ácido acético glacial, 5,0 mL de metanol e completamos o volume de 100,0 mL com água ultrapura. Armazenamos a temperatura ambiente em frasco âmbar.

Tampão ACK para citometria de fluxo: 16,6 g de NH_4Cl , 2,0 g de KHCO_3 , 0,7 g de EDTA e água ultrapura para completar o volume de 200,0 mL. Acertamos o pH para 7,4 e utilizamos para lisar os eritrócitos das células de baço de camundongo.

Tampão da amostra para proteínas 5x (Tris HCl 60,0 mM, glicerol 25%, SDS 2%, β -mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1% pH 6,8): 72,7 mg de trizma base, 2,5 mL de glicerol, 0,2 g de SDS, 0,5 mL de β -mercaptoetanol, 10,0 mg de azul de bromofenol em água ultrapura completando o volume de 10,0 mL. Acertamos o pH para 6,8. Aliquotamos e estocamos a solução a -20°C. No momento do uso, as amostras contendo as proteínas de interesse foram diluídas com o tampão da amostra (1:5) e incubadas em banho de água a 96°C por 10 minutos.

Tampão de corrida, pH 8,3: 3,0 g de trizma base, 14,4 g de glicina, 1,0 g de SDS e completamos com água ultrapura à um volume final de 1000,0 mL. Acertamos o pH para 8,3 e estocamos em frasco escuro a 4°C.

Tampão de equilíbrio para purificação da enzima recombinante humana IDO (20,0 mM

Tris HCl, 200,0 mM NaCl, pH 8,0): 12,1 mg de trizma base, 58,4 mg de NaCl completando o volume com água ultrapura até 5,0 mL. Estocamos a 4°C.

Tampão de lavagem para purificação da enzima recombinante humana IDO (20,0 mM Tris HCl, 200,0 mM NaCl 10% glicerol, pH 8,0): 24,2 mg de trizma base, 116,9 mg de NaCl, 1,0 g de glicerol e água ultrapura completando o volume da solução para 10,0 mL. Armazenamos a 4°C.

Tampão de lise bacteriana (Tris HCl 20,0 mM, NaCl 200,0 mM, 1 mg/mL de lisozima, 1 mM de PMSF pH 8,0): 24,2 mg de trizma base, 116,9 mg de NaCl, 10,0 mg de lisozima, 100,0 µL de PMSF (solução estoque de 100 mM) em água ultrapura completando o volume para 10,0 mL. O pH da solução foi ajustado para 8,0 e a solução foi alíquotada e estocada a -20°C.

Tampão de lise para Western blot de IDO intracelular (Tris HCl 20,0 mM, NaCl 137,0 mM, NP40 1%, glicerol 10%, PMSF 1 mM e 10% de coquetel de inibidor de protease: 0,24 g de trizma base, 0,8 g de NaCl, 11,5 mL de glicerol 87% e água ultrapura para o volume final de 100,0 mL. Na hora do uso, 900,0 µL o tampão foi suplementado com 100,0 µL de coquetel de inibidor de protease, 10,0 µL de PMSF e 10,0 µL de NP40.

Tampão de transferência: 3,0 g de trizma base, 14,0 g de glicina, 200,0 mL de metanol e completamos com água ultrapura até completar o volume para 1000,0 mL. Armazenamos a 4°C em frasco ambar.

Tampão de Tris HCl 0,25 M, SDS 0,2%, pH 6,8 para blotting de IDO recombinante humana: 3,0 g de trizma base, 20,0 mg de SDS em 100,0 mL de água ultrapura. Acertamos o pH para 6,8 e estocamos a 4°C.

Tampão de Tris HCl 0,75 M, SDS 0,2% pH 8,8 para blotting de IDO recombinante humana: 9,1 g de trizma base, 20,0 mg de SDS em 100,0 mL de água ultrapura. Acertamos o pH para 8,8 e estocamos a 4°C.

Tampão de Tris HCl 1,5 M, pH 8,8 para blotting de IDO intracelular: 18,17 g de trizma

base em 100,0 mL de água ultrapura. Acertamos o pH para 8,8 e armazenamos a solução a 4°C.

Tampão Tris HCl 1,5 M, pH 6,8 para blotting de IDO intracelular: 23,64 g de trizma ácido em 100,0 mL de água ultrapura. Acertamos o pH para 6,8 e armazenamos a solução a 4°C.

Tampão fosfato de potássio 0,5 M, pH 6,5 (atividade enzimática): 2,7 g de K_2HPO_4 em 40,0 mL de água ultrapura. Acertamos o pH para 6,5, aliquotamos e estocamos a -20°C.

Tampão fosfato salina (PBS): 2,8 g de $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$, 0,3 g de KH_2PO_4 , 8,1 g de NaCl, 0,2 g de KCl e água ultrapura completando o volume para 1000,0 mL. Acertamos o pH para 7,4 e armazenamos a solução a 4°C em frasco âmbar.

Tampão fosfato salina com glicose (PBS com glicose): 2,8 g de $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$, 0,3 g de KH_2PO_4 , 8,1 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 0,1 g de $CaCl_2$, 47,6 mg de $MgCl_2$, 0,2 g de glicose e água ultrapura completando o volume para 1000,0 mL. Acertamos o pH para 7,4 e armazenamos a solução a 4°C em frasco âmbar.

Tampão tris salina (TBS) (0,05 M Tris Base, 0,9% NaCl, pH 7,6): 121,0 mg de trizma base, 876,6 mg de NaCl e água ultrapura completando o volume para 100,0 mL. Acertamos o pH para 7,6 e armazenamos a solução a 4°C em frasco âmbar.

Tampão tris salina tween (TBS-T) (0,05 M Tris Base, 0,9% NaCl, 0,1% de tween 20, pH 7,6): 121,0 mg de trizma base, 876,6 mg de NaCl e água ultrapura completando o volume para 100,0 mL. Acertamos o pH para 7,6 e armazenamos a solução a 4°C em frasco âmbar.

Solução de H_2O_2 : Diluímos 10,0 μL de H_2O_2 em 10,0 mL de água ultrapura. Calculamos a concentração de H_2O_2 através da equação: $A = \epsilon C \beta$, onde $\epsilon = 40 M^{-1} cm^{-1}$.

Solução de HRP (10,0 μM): 2,4 mg de HRP tipo VI e água ultrapura até o volume de 6,0 mL.

5.4. Reação em cadeia de polimerase (PCR - *Polimerase Chain Reaction*) da sequência de IDO

A reação de PCR foi realizada com tampão de PCR fornecido pela Invitrogen, 10,0 mM de dNTP mix, 50,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM dos *primers forward* e *reverse*, 2 unidades de Taq polimerase e água ultrapura. Os *primers* desenhados para essa reação foram:

Forward – GGC TCG AGA ATG GCA CAC GCT ATG GAA AAC

Reverse – GGG AAT TCT TAA CCT TCC TTC AAA AGG GA

Em destaque os sítios de restrição das enzimas *Xho I* e *Eco RI*, respectivamente.

A menos que indicado de outra maneira, as reações de PCR foram realizadas empregando-se um ciclo de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido por 34 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos oligonucleotídios a 63°C por 30 segundos e extensão a 68°C por 1 hora e 30 minutos e, finalizando com extensão de 7 minutos a 68°C.

Os produtos de amplificação foram purificados de acordo com as instruções apresentadas nos *kits* de extração e purificação de fragmentos de PCR fornecidos pela Qiagen.

5.5. Digestão do plasmídeo pRSET B e do produto de PCR de IDO

O plasmídeo e o produto de PCR foram digeridos com as enzimas *Xho I* e *Eco RI* na proporção de 10 U por micrograma de DNA a ser digerido. A reação ocorreu por 4 horas a 37°C.

5.6. Inserção da sequência de DNA de IDO no plasmídeo comercial pRSET B

A inserção do produto de PCR digerido no plasmídeo de expressão pRSET B foi realizado com T4 DNA ligase 5 U/μL para cada 100 ng de plasmídeo e 300 ng de inserto. A ligação ocorreu a 16°C durante 18 horas.

5.7. Transformação de DH5- α para clonagem de DNA

Incubamos um μL do plasmídeo pRSET B-IDO com 20 μL de células competentes DH5- α por 30 minutos em gelo. Em seguida colocamos a reação por 2 minutos a 42°C para ativação das células competentes. Acrescentamos 400 μL de meio SOC e incubamos novamente a 37°C por 1 hora. Plaqueamos todo o volume em meio ágar LB contendo 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina. Deixamos crescer a 37°C por 18 horas e observamos o crescimento de colônias isoladas.

5.8. Extração de DNA plasmidial por lise alcalina (“medium prep”)

Incubamos uma colônia da bactéria DH5- α em 70 mL de caldo LB/ampicilina 100 $\mu\text{g/mL}$ por 18 horas a 37°C. Centrifugamos a 5000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos à 4°C e em seguida, ressuspendemos o precipitado em 3,0 mL de glicose 50 mM, tris HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM. Adicionamos mais 6,0 mL de NaOH 0,2 M e SDS 1% e incubamos em gelo por 10 minutos. Logo, adicionamos 4,5 mL de $\text{KC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 3 M e $\text{HC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 5 M e incubamos por mais 15 minutos. Centrifugamos à 8000 rpm por 10 minutos a 4°C e filtramos o sobrenadante em gaze. Ao volume filtrado acrescentamos mais 2 volumes de etanol absoluto à temperatura ambiente e incubamos por 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugamos a 8000 rpm por 10 minutos a 4°C e deixamos o precipitado secar a temperatura ambiente. Redissolvemos o precipitado em 200 μL de TE (Tris EDTA), 2 μL de NaCl 5 M e 20 μL de RNase (10 mg/mL) e incubamos à 37°C por 30 minutos. Adicionamos mais 4 μL de SDS 10% e 2 μL de proteinase K e incubamos novamente por 30 minutos a 37°C. Extraímos uma vez com fenol:clorofórmio (1:1) e centrifugamos a 13.000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente. Extraímos mais uma vez com clorofórmio (1:1) a fração superior da extração anterior. Centrifugamos

novamente a 13.000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente. Retiramos novamente a fração superior. Adicionamos 100 μL de $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}$ 7,5 M, 600 μL de etanol absoluto gelado e centrifugamos a 12.500 rpm por 15 minutos a 4°C. Acrescentamos 500 μL de etanol 70% gelado e agitamos até o precipitado desgrudar do fundo do tubo. Centrifugamos novamente a 12.500 rpm por 5 minutos a 4°C, deixamos o precipitado secar a temperatura ambiente e ressuspendemos o precipitado em 50 μL de TE.

5.9. Transformação de BL21 competentes por CaCl_2

Incubamos 100 μL de células competentes com 0,5 μL de plasmídeo pRSET B-IDO (500 ng) em gelo por 30 minutos. Logo incubamos por 2 minutos a 42°C e colocamos no gelo por mais 5 minutos. Após, adicionamos 400 μL de meio SOC, misturamos e deixamos os tubos à 37°C por 1 hora. Plaqueamos todo o volume da reação em ágar LB com 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina e deixamos incubando por 18 horas à 37°C.

5.10. Expressão de proteína recombinante em pequena escala

Incubamos uma colônia isolada da bactéria recombinante BL-21, contendo o plasmídeo pRSET B-IDO em 4,0 mL de caldo LB/ampicilina 100 $\mu\text{g/mL}$ por 18 horas, a 37°C sobre agitação (200 rpm). Inoculamos 1,5 mL do meio saturado em 15 mL de caldo LB/ampicilina 100 $\mu\text{g/mL}$ e deixamos atingir $\text{DO}_{600} = 1,2$ (aproximadamente 1 hora). Induzimos a cultura com IPTG 0,1 mM e a deixamos por 18 horas, a 30°C e 200 rpm. Centrifugamos este material a 8000 rpm por 15 minutos a 4°C e ressuspendemos as bactérias em 0,5 mL de tampão de lise bacteriana. Sonicamos durante 30 segundos por 3 vezes na intensidade 4, sempre imersos em gelo. Centrifugamos a 10.000 g por 15 minutos e ressuspendemos o precipitado em 0,5 mL de PBS. Realizamos SDS-PAGE (12%) para verificação da presença da proteína desejada.

IPTG (*Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*) é um composto molecularmente

semelhante à alolactose, um metabólito da lactose que inicia a transcrição do operon lac. O IPTG induz a atividade da enzima beta-galactosidase, que promove a utilização da lactose, pela ligação e inibição do repressor lac.

5.11. Expressão de proteína recombinante em média escala

Incubamos uma colônia isolada de bactéria recombinante BL-21 (DE3), contendo pRSET B-IDO, em 20 mL de caldo LB/ampicilina 100 µg/mL por 18 horas a 37°C sobre agitação (200 rpm). Inoculamos 20 mL da solução bacteriana saturada em 180 mL de caldo LB/ampicilina 100 µg/mL (diluição 1:10). Deixamos atingir $DO_{600} = 1,1\sim 1,3$ (aproximadamente 2:30 horas). Induzimos a expressão com IPTG 0,1 mM e deixamos expressando durante 18 horas a 30°C sob agitação. Centrifugamos a 3.500 rpm por 15 minutos a 4°C, ressuspendemos as bactérias em 10 mL de tampão de lise bacteriana e incubamos no gelo por 30 minutos. Sonicamos 2 vezes por 1 minuto e 2 vez por 30 segundos evitando que a temperatura ultrapassasse 40°C. Em seguida centrifugamos o material a 14.000 rpm por 1 hora e o sobrenadante foi utilizado para a purificação da proteína de interesse.

5.12. Purificação da proteína recombinante humana IDO

Para purificação da enzima IDO recombinante humana utilizamos coluna de Níquel Sepharose (GE). Para purificação de 10 mL de sobrenadante utilizamos 0,5 mL de volume de coluna (VC) em um sistema de empacotamento da resina em coluna e o fluxo controlado por bomba peristáltica. Lavamos a resina com 10 VC (5,0 mL) de água ultrapura. Em seguida adicionamos 10 VC de tampão de equilíbrio. A solução de proteína interagiu com a coluna com fluxo de 0,3 mL/min e coletamos o eluente da coluna. Lavamos a resina com 20 VC (10 mL) e frações de 1 mL foram coletadas. Utilizamos um gradiente de concentração de imidazol (10 mM a 300 mM) para a eluição da proteína de

interesse. Cada concentração teve um volume de 5 VC (2,5 mL) e, a cada concentração, coletamos frações de 0,5 ml para posterior análise. Após a purificação analisamos todas as frações em gel de poliacrilamida 12% e identificamos a banda de interesse.

5.13. Ensaio de atividade de IDO

Analisamos a atividade da enzima IDO monitorando a formação de QUIN, o segundo produto da via das quinureninas. Para isso utilizamos o ensaio de atividade previamente descrito por Yamamoto, S. e Hayaishi, O. (9). Cada reação continha o tampão de fosfato de potássio pH 6,5 (50 mM), o substrato L-TRP (200 μ M), os ativadores da enzima ascorbato (20 mM) e azul de metileno (10 μ M), a catalase (100 μ g/mL) para degradação de H₂O₂ formado por ascorbato/azul de metileno e enzima IDO (2,2 μ g/mL). Iniciamos a reação adicionando a enzima e após 30 minutos a 37°C cessamos a reação com 6% de ácido tricloroacético. Degradamos toda a NFK, primeiro produto da via das quinureninas, a QUIN deixando a reação por 15 minutos a 65°C. Centrifugamos as amostras a 13.000 g a 4°C por 10 minutos e as filtramos em membranas de 0,22 μ m de poro para posterior análise em HPLC. Realizamos ainda um branco de reação sem a presença da enzima para monitorarmos principalmente a contaminação de QUIN.

5.14. Ensaios cinéticos da enzima IDO

Para os ensaios cinéticos da enzima IDO recombinante humana, utilizamos o protocolo clássico somente com a alteração da concentração de substrato e de inibidor, de acordo com Segel, I.H. (212). Para o cálculo de K_m de L-TRP, utilizamos 0,2 K_m – 2 K_m do K_m descrito na literatura (K_m=35 μ M), ou seja, as concentrações de 17,5 μ M, 35 μ M, 70 μ M e 105 μ M. Para o cálculo de K_i é exigido também a faixa de 0,2 K_i - 2 K_i, sendo assim, para 1MT cujo K_i médio é de 35 μ M, utilizamos as mesmas concentrações de TRP. Já para os outros estudos cinéticos, utilizamos inicialmente as mesmas

condições já estudadas para o 1MT, e quando calculamos um K_i aproximado por esse ensaio inicial, realizamos ensaios mais precisos nas concentrações mais próximas ao K_i calculado. A formação de QUIN foi monitorada por HPLC.

Analizados os dados cinéticos (velocidade de reação ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1}$) x concentração de substrato (μM)) e pelo gráfico de Lineweaver-Burk ($1/\text{velocidade de reação}$ ($\text{nmol}^{-1} \cdot \text{min}$) x $1/\text{concentração de substrato}$ (μM^{-1})).

5.15. Identificação e quantificação de TRP, NFK e QUIN

Analizamos as reações descritas anteriormente contendo TRP, NFK e QUIN por HPLC. Injetamos 40 μL da amostra em coluna C18 e analisamos por 25 minutos em fluxo de fase móvel de 1 mL/min. Após a separação dos componentes da amostra, analisamos as substâncias pelos detectores de arranjo de diodos e de fluorescência. A fase móvel foi composta por ACN:água em um método gradiente realizado pelas duas bombas. Mantivemos 100% de água durante 0,02 minutos de corrida. Aumentamos linearmente a concentração de ACN atingindo 10% em 22 minutos. A partir desse tempo a concentração de ACN diminuiu linearmente à 0% até o minuto 25. Os comprimentos de ondas (λ) 280 nm, 325 nm e 365 nm foram monitorados pelo detector de arranjo de diodos e eles correspondem ao TRP, NFK e QUIN, respectivamente. O limite de detecção ($S/N = 3:1$) foi de 244 nM e o limite de quantificação ($S/N = 10:1$) foi de 488 nM tanto para TRP quanto para QUIN. Nas condições utilizadas a relação do sinal com a concentração se mostrou linear na faixa analisada ($2,44 \times 10^{-4} - 1 \text{ mM}$) (figura 8)

Figura 8: Curva padrão de TRP e QUIN. Os compostos foram analisados entre as concentrações de $2,44 \times 10^{-4}$ e 1,0 mM. Os dois compostos se mostraram lineares nas concentrações avaliadas.

5.16. Ensaio de adição de superóxido dismutase (SOD) em ensaio enzimático

Analizamos a ação da SOD sobre a atividade enzimática de IDO. O protocolo clássico foi mantido, porém em uma das reações adicionamos SOD ($10 \mu\text{M}$) nos tempos 0, 5 ou 15 minutos após iniciado a reação. O protocolo subsequente foi mantido. Monitoramos a formação de QUIN por HPLC.

5.17. Síntese de AFMK e AMK

Sintetizamos AFMK e AMK a partir de MLT (1 mM) em 100 mL de H_2O_2 30%. Incubamos esta reação por 2 horas a temperatura ambiente sob agitação constante. Após este período, extraímos com 50 mL de diclorometano (repetida três vezes). Evaporamos o solvente utilizando rotaevaporador e ressuspendemos o produto bruto em H_2O milliQ. Purificamos os produtos (AFMK e AMK) usando HPLC preparativo, acoplado a um coletor de frações e um detector UV-VIS (254 nm). Injetamos as amostras ($500 \mu\text{L}$) em uma coluna preparativa C18, usando ACN: H_2O (25:75) como fase móvel e fluxo de 10 mL/min. Coletamos os picos correspondentes ao AFMK e AMK, e submetemos a secagem à vácuo. Ressuspendemos em PBS e realizamos a identificação por espectrofotometria UV-

visível (AFMK $\lambda_{\text{max}} = 340 \text{ nm}$, AMK $\lambda_{\text{max}} = 380 \text{ nm}$) (figura 9) (67). Determinamos as concentrações de AFMK e AMK usando absorção em 338 nm ($\epsilon_{338} = 3600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e 377 nm ($\epsilon_{377} = 4500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) respectivamente (67) (figura 9).

Figura 9: Espectro UV-VIS de AFMK and AMK. AFMK $\lambda_{\text{max}} = 340 \text{ nm}$, AMK $\lambda_{\text{max}} = 380 \text{ nm}$.

5.18. Ensaios de inibição da atividade de IDO

Realizamos os ensaios de inibição de acordo com a atividade de IDO descrita anteriormente na presença ou ausência de 0,1 mM do inibidor clássico 1MT ou dos possíveis inibidores 5-HT, MLT, AFKM ou AMK. Monitoramos a formação de QUIN por HPLC.

5.19. Identificação de TRP, QUIN, SER, MLT, AFMK, AMK

Analizamos as reações descritas anteriormente contendo TRP, QUIN, MLT, AFMK e AMK por um sistema de HPLC. Injetamos 40 μL da amostra em coluna C18 e analisamos por 45 minutos com um fluxo de fase móvel de 1 mL/min. Após a separação dos componentes da amostra, analisamos as substâncias pelos detectores de arranjo de diodos e de fluorescência. A fase móvel foi composta por metanol:ácido trifluoracético 0,05% em um método gradiente. A corrida inicia-se com 5% de metanol e durante 30 minutos há um aumento de metanol gradativo e linear até 70%. Do minuto 30 ao 31 a concentração de metanol aumenta para 90% e assim permanece por 5 minutos. No minuto 36 a concentração de metanol cai para 5% e permanece assim até o minuto 45. Monitoramos os comprimentos de ondas (λ) 240 nm, 280 nm, 325 nm e 360 nm pelo

detector de arranjo de diodos. Na fluorescência iniciamos monitorando a emissão de 340nm, com a excitação em 280 nm. Por volta do minuto 20 trocamos os comprimentos de onda de excitação (340 nm) e emissão (460 nm) para monitorar o AFMK. Em seguida os comprimentos de onda de excitação e emissão iniciais são retomados.

5.20. Ensaio de 5-HT, MLT, AFMK e AMK como substrato de IDO

Analizamos a possibilidade de SER, MLT, AFMK e AMK serem substratos da IDO. Utilizamos o ensaio clássico para IDO com a modificação do substrato, ao invés de TRP, adicionamos ou 5-HT ou MLT ou AFMK ou AMK (0,05 mM) como substrato. A reação ocorreu a 37°C por 30 minutos e os passos subsequentes foram seguidos de acordo com protocolo inicial. A análise ocorreu observando o consumo de 5-HT, MLT, AFMK e AMK ou a formação de novos picos em análise por HPLC.

5.21. Ensaio de atividade de HRP

Avaliamos a atividade da enzima HRP tipo VI monitorando a formação de AFMK o primeiro produto da oxidação de MLT, como previamente descrito por Silva, S. O. e colaboradores (5). A cada reação adicionamos tampão fosfato salina pH 7,4 (10 mM), MLT como substrato (0,1 ou 1 mM), H₂O₂ (0,5 mM) e a enzima HRP tipo VI (1 µM). Iniciamos a reação adicionando a enzima e após 60 minutos a 37°C cessamos a reação com o mesmo volume de ACN gelado. Centrifugamos as amostras a 12.000 g a 4°C por 15 minutos e as filtramos em membrana de 0,22 µm de poro. Realizamos ainda um brando de reação sem a presença da enzima e avaliamos a presença de AFMK por HPLC.

5.22. Ensaio de inibição da atividade de HRP

Realizamos os ensaios de inibição de acordo com a atividade de HRP descrita anteriormente na presença ou ausência de 1,0, 0,1 ou 0,05 mM dos possíveis inibidores

TRP ou QUIN. Monitoramos a formação do AFMK por HPLC.

5.23. Ensaio de QUIN como substrato de HRP

Analizamos a possibilidade de QUIN ser substrato de HRP. Utilizamos o ensaio descrito anteriormente com a modificação do substrato, ao invés de MLT, adicionamos QUIN (0,1 ou 0,05 mM) como substrato. A reação ocorreu à 37°C por 60 minutos e os passos subsequentes foram de acordo com protocolo inicial. A análise ocorreu observando o consumo de QUIN ou a formação de novos picos em análise por HPLC e LC-MS.

5.24. Ensaios cinéticos da enzima HRP

Para os ensaios cinéticos da enzima HRP utilizamos o protocolo clássico somente com a alteração da concentração de substrato e de inibidor, de acordo com Segel, I.H. (212). Como os compostos testados não apresentam valores de K_m e K_i já determinados, determinaremos estes parâmetros através de testes de concentrações e o K_i exato será determinado através dos cálculos recomendados na literatura. A formação de AFMK foi monitorada por HPLC.

Os dados foram analisados pelos gráficos de velocidade de reação (velocidade de formação de produto ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1}$) x concentração de substrato (μM)) e pelo gráfico de Lineweaver-Burk ($1/\text{velocidade de reação}$ ($\text{nmol}^{-1} \cdot \text{min}$) x $1/\text{concentração de substrato}$ (μM^{-1}))

5.25. Obtenção de granulócitos humanos de sangue periférico

Obtivemos neutrófilos de sangue periférico humanos segundo Boyum, A (213)

Coletamos 10 mL de sangue total em tubos heparinizados e o diluímos em 10 mL de PBS. O material resultante foi cuidadosamente adicionado sobre 10 mL de um gradiente

de densidade 1,077 g/mL. Centrifugamos 2.500 rpm a 25°C por 20 minutos. Após o gradiente formado coletamos a camada rica em eritrócitos e granulócitos. Homogeneizamos 20 mL de dextran 4%, mantivemos o tubo inclinado a 45° em gelo por 30 minutos para a sedimentação dos eritrócitos. Recuperamos o sobrenadante, centrifugamos 2.500 rpm por 5 minutos e lisamos os eritrócitos restantes com 10 mL de água gelada por 1 minuto em agitação branda. Restabelecemos a isotonicidade com 5 mL de NaCl 2,7% e centrifugamos novamente por 5 minutos. Ressuspendemos os granulócitos isolados em 1 mL de PBS.

5.26. Ensaio de atividade de MPO

Avaliamos a atividade da enzima MPO monitorando a formação de AFMK o primeiro produto da oxidação de MLT, como previamente descrito por Silva, S. O. e colaboradores (5). A cada reação adicionamos tampão fosfato salina pH 7,4 (10 mM), MLT como substrato (1,0 mM), H₂O₂ (0,5 mM) e a enzima MPO (homogenato de 2x10⁶ células/reação). Iniciamos a reação adicionando a enzima e após 60 minutos a 37°C cessamos a reação com o mesmo volume de ACN gelado. Centrifugamos as amostras a 12.000 g a 4°C por 15 minutos e as filtramos em membrana de 0,22 µm de poro. Realizamos ainda um brando de reação sem a presença da enzima e avaliamos a presença de AFMK por HPLC.

5.27. Identificação e isolamento de produtos de oxidação da MLT

Monitoramos a formação ou consumo de MLT, AFMK e AMK por HPLC. Injetamos alíquotas de 40 µL em coluna LC-18. Eluímos as amostras com fluxo de 1,0 mL/minuto em fase móvel de ACN:H₂O (25:75). Detectamos o AFMK por fluorescência (excitação 340 nm e emissão 460 nm) e AMK por UV-VIS absorbância (254 nm). O limite de detecção (S/N = 3:1) foi 0,15 e 0,10 µM e o limite de quantificação (S/N = 10:1) foi 0,5 e

0,33 μ M, para AFMK e AMK respectivamente (5). Nas condições utilizadas a relação do sinal com a concentração se mostrou linear para os dois compostos na faixa analisada (0,001 - 0,025 mM).

5.28. Animais

Utilizamos camundongos C57BL/6 controle e tratados com Con A por injeção intraperitoneal e Balb/C (*wild type*) controle. Os animais foram obtidos junto ao Biotério de camundongos isogênicos do Departamento de Imunologia, ICB-USP ou do Biotério do Conjunto das Químicas USP.

5.29. Obtenção células peritoneais e esplênicas de camundongo.

Os animais receberam, via intraperitoneal, 15 μ g de Con A e o grupo controle 100 μ L de PBS estéril. Os animais foram sacrificados 72 horas após receberem o estímulo. Os animais foram anestesiados para lavagem da cavidade peritoneal com 6,0 mL de PBS estéril e em seguida sacrificados por deslocamento cervical. A suspensão celular foi obtida por aspiração com seringa e agulha. Contamos o “pool” de células e os mantivemos em banho de gelo até a realização dos ensaios. A contagem de células foi feita em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi avaliada com azul de tripan 0.1%. Uma lâmina corada pelo método MGG modificado por Rosenfeld foi utilizada para avaliação da morfologia celular e contagem diferencial.

Para obtenção de células esplênicas, retiramos o baço, colocamos em RPMI 1640 sem vermelho de fenol e com 3% de soro fetal bovino e maceramos o tecido entre duas lamina ásperas. Filtramos a suspensão em membrana de náilon (40 μ M) e as hemácias foram eliminadas por hemólise com tampão ACK. Os leucócitos livres de hemácias foram lavados, filtrados novamente e ressuspensionado em meio RPMI – 1640 sem vermelho de fenol com 3% de SFB.

5.30. Expressão de IDO (Western blotting)

Padronizamos a detecção da proteína IDO pela técnica de *Western blotting* usando anticorpo poli clonal específico. Utilizamos gel de poliacrilamida de 12%, 40 µg de proteínas totais e corremos o gel a 150 V por aproximadamente 1 hora. Transferimos as proteínas em membrana de nitrocelulose, por 1:50 horas em banho de gelo. Bloqueamos a membrana por 2 horas a temperatura ambiente com leite 1% + soro fetal bovino 2% em TBS + tween 20 a 0,1%. Lavamos a membrana 3 vezes de 10 minutos cada com TBS + tween 20 0,1%. Incubamos o anticorpo primário anti-IDO em uma diluição 1:800 diluído em TBS/tween 20 0,1% com 1% de leite por 18 horas a 4°C. Lavamos a membrana com TBS/tween 20 0,1% 3 vezes de 10 minutos cada. Incubamos a membrana com o anticorpo secundário anticabra marcado com HRP para por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. A diluição deste anticorpo foi de 1:3000 em TBS/tween 20 0,1% contendo 1% de leite e 2% de soro fetal bovino. Lavamos a membrana novamente 3 vezes e a revelação foi realizada com Kit de revelação ECL[®].

5.31. Quimiluminescência amplificada por luminol e lucigenina (*Burst oxidativo*)

Acompanhamos a intensidade de quimiluminescência em luminômetro de microplacas brancas em um volume final de 0,3 mL. Realizamos a atividade peroxidásica com células homogeneizadas ($6,0 \times 10^5$ células/ensaio) e iniciamos a reação com H₂O₂ (0,5 mM/ensaio). Utilizamos o luminol como substrato na concentração final de 1mM. Realizamos todas as reações em PBS com glicose, pH 7,4 e acompanhamos por 30 minutos à 37°C.

5.32. Reações imunocitoquímicas e microscopia de luz, confocal: (dupla marcação)

As células de interesse foram coletadas em PBS, centrifugadas a 2000 rpm por 5

minutos a 4°C e uma gota (20 µL) foi aplicada sobre cada lâmina silanizada. Deixamos aderindo por 45 minutos e fixando em paraformaldeído 4% por mais 45 minutos em câmara úmida.

Lavamos as lamínas com PBS e em seguida incubamos as células aderidas com cloreto de amônio 50 mM em PBS por 30 minutos. Logo após, bloqueamos as células com PGN por 40 minutos e permeabilizamos com PGN/saponina por 45 minutos.

Para a dupla marcação utilizamos primeiramente os anticorpos anti-F4/80 (macrófagos) e o anti-CD19 (linfócitos B) por 18 horas a 4°C. Em seguida incubamos as lamínas com o anticorpo secundário específico marcado (anti-IgG de rato marcado com Texas red®) durante 1 hora a temperatura ambiente. Logo após incubamos com anticorpo anti-MPO ou anti-IDO (1:100) por 18 horas a 4°C. Lavamos e incubamos as lâminas com conjugado fluorescente (anti-IgG de cabra acoplado a fluoresceína isotiocianato (FITC)) (1:100) e DAPI para corar o DNA do núcleo das células durante 1 hora a temperatura ambiente. Após lavagem com PBS, montamos as lâminas em lamínulas contendo glicerol tamponado com pH alcalino e 0,1% de parafenileno-diamino, um inibidor do decaimento de fluorescência.

Quando realizamos uma única marcação, utilizamos somente a segunda parte da marcação, realizando somente a marcação das enzimas de interesse, IDO e MPO.

Visualizamos a fluorescência em microscopia confocal com laser de UV (363 nm) e visível (488, 567 e 657 nm).

5.33. Imunocitoquímica para microscopia eletrônica de transmissão

Centrifugamos as células coletadas do peritônio de camundongos por 2000 rpm por 5 minutos e tratamos com tampão cacodilato. Centrifugamos as células novamente e após a retirada do sobrenadante, as fixamos com paraformaldeído 4%, glutaraldeído 0,5%, e ácido pícrico 0,1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7.4. Após

desidratação em concentrações crescentes de etanol, incluímos o material em resina LR White e polimerizamos a 56°C por 72 horas.

Colhemos cortes ultra-finos em telas de níquel de 300 *mesh* revestidas com formvar/carbono. Incubamos os cortes em cloreto de amônio/PBS por 15 minutos. E bloqueamos na seguinte sequência: PBS pH 8.3 + 1% BSA por 10 minutos; PBS + 3% BSA por 15 minutos (2 vezes); PBS + 3% BSA + 0,02% tween 20 por 10 minutos. Logo após incubamos com o anticorpo anti-MPO ou anti-IDO (1:100) diluídos no primeiro tampão de bloqueio por 2 horas. Após este período, lavamos por 10 minutos cada em PBS + 3% BSA, PBS + 1% BSA e PBS + 3% BSA e incubamos com proteína A-ouro, com partículas de diâmetro de 10 nm. na diluição de 1:10 em tampão PBS 1% BSA por 1 hora. Após lavagem nos tampões acima, refizemos as telas em glutaraldeído 2,5% e tetróxido de ósmio 1% por 15 minutos cada. Após duas horas coramos as com acetato de uranila e citrato de chumbo e observamos ao microscópio eletrônico de transmissão.

5.34. Análise de células peritoneais por citometria de fluxo

Utilizamos células de peritônios de camundongos controle e baço de animais controle para análise de citometria de fluxo. Incubamos $1,0 \times 10^6$ células/ensaio primeiramente com 3 anticorpos de superfície com diferentes marcadores como descrito: F4/80–ficoeritrina (PE), IgM–aloficocianina (APC) e CD5–cianina 5/ficoeritrina (Cy5PE) ou CD11b-PE, CD5-Cy5PE e IgM-APC. Em seguida, fixamos e permeabilizamos as células de acordo com o protocolo do kit Cytotfix/Cytoperm[®]. A permeabilização da célula foi acompanhada da incubação das amostras com o anticorpo anti-MPO policlonal e em seguida do anticorpo secundário específico marcado com FITC ou Alexa 488 ou anticorpo anti-MPO monoclonal marcado diretamente com FITC. Uma vez que utilizamos anticorpo secundário, realizamos controles para nos certificarmos que não haveria interação inespecífica do segundo anticorpo. Um dos controles foi a realização da marcação de

superfície, porém sem a fixação e permeabilização, assim acrescentamos iodeto de propídio (PI) (10 µg/mL) para analisarmos a porcentagem de células mortas no ensaio. Outro controle foi a incubação da célula somente com o anticorpo secundário (com fixação e permeabilização), para verificar a sua especificidade. Após todas as marcações e tratamentos, centrifugamos as amostras e ressuspendemos o precipitado em meio RMPI-1640 + 3% de SFB. Todas as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo, utilizamos 4 canais de leitura e os dados foram analisados com auxílio do *software* FlowJo (Treestar.com, EUA).

Para distinguir células auto-fluorescentes das células que expressa pouca, porém reais concentrações de marcadores de superfície, utilizamos a metodologia de *fluorescence-minus-one* (FMO) (214). Determinamos controles FMO através da marcação das células com todos os anticorpos/marcadores exceto aquele que será analisado. Os valores obtidos nessa análise foram considerados “limite FMO das células” e todos os valores de fluorescência acima deste limite foram considerados verdadeiros positivos. O nível de fluorescência (limite FMO), da população de interesse, obtido no canal no qual foi medido um determinado marcador revelará a auto-fluorescência inerente daquela população alvo. Esse valor permitiu estabelecer um limite com o qual se faz a distinção entre células auto-fluorescentes e aquelas que expressam um determinante que se ligará ao anticorpo fluorescente usado para detectá-lo.

5.35. Análise estatística dos dados

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média, de no mínimo três experimentos feitos em duplicata. As análises foram realizadas através de comparações entre o grupo controle e os grupos que adicionamos os compostos de interesse.

Capítulo I

6. Capítulo I - Regulação cruzada entre as vias de metabolização de triptofano

A metabolização do TRP é complexa e contem várias ramificações. Este trabalho teve como interesse avaliar a interferência cruzada entre as duas principais vias de metabolização descritas para este aminoácido: a via das quinureninas e a via serotoninérgica. Esta última pode, em alguns tecidos, levar à formação de MLT. Assim, avaliamos também o efeito de MLT e de seus produtos de oxidação (compostos gerados na oxidação de MLT por peroxidases) na via das quinureninas. A nossa hipótese é a de que as duas vias de metabolização de TRP e a via de oxidação de MLT interagem, levando a uma regulação cruzada deste sistema. Neste capítulo mostraremos os efeitos de alguns dos compostos da via das quinureninas, via serotoninérgica e dos compostos de oxidação de MLT sobre as enzimas IDO e peroxidases (HRP e MPO).

5.25. Obtenção de IDO recombinante humana

Para iniciarmos os estudos dos efeitos de compostos indólicos e seus produtos de oxidação sobre a enzima IDO realizamos a clonagem, a expressão e a purificação da IDO recombinante humana (rIDO). Utilizamos a sequência de rIDO presente no plasmídeo pGEX-IDO -1 λ T cedido pelo professor Tone (Wakayama Medical Colledge, Japão) e realizamos um PCR utilizando como modelo os *primers* descritos por Littlejohn, T.K. e colaboradores (215). A amplificação e o sequenciamento da rIDO foram bem sucedidas e confirmamos que a sequência cedida era a sequência da rIDO humana (figura 10).

Length: **403 aa**

```
23 atg gca cac gct atg gaa aac tcc tgg aça atc agt aaa gag tac
   M  A  H  A  M  E  N  S  W  T  I  S  K  E  Y
68 cat att gat gaa gaa gtg ggc ttt gct ctg cca aat cca cag gaa
   H  I  D  E  E  V  G  F  A  L  P  N  P  Q  E
113 aat cta cct gat ttt tat aat gac tgg atg ttc att gct aaa cat
    N  L  P  D  F  Y  N  D  W  M  F  I  A  K  H
158 ctg cct gat ctc ata gag tct ggc cag ctt cga gaa aga gtt gag
    L  P  D  L  I  E  S  G  Q  L  R  E  R  V  E
203 aag tta aac atg ctc agc att gat cat ctc aça gac cac aag tca
    K  L  N  M  L  S  I  D  H  L  T  D  H  K  S
248 cag cgc ctt gca cgt cta gtt ctg gga tgc atc acc atg gca tat
    Q  R  L  A  R  L  V  L  G  C  I  T  M  A  Y
293 gtg tgg ggc aaa ggt cat gga gat gtc cgt aag gtc ttg cca aga
    V  W  G  K  G  H  G  D  V  R  K  V  L  P  R
338 aat att gct gtt cct tac tgc caa ctc tcc aag aaa ctg gaa ctg
    N  I  A  V  P  Y  C  Q  L  S  K  K  L  E  L
383 cct cct att ttg gtt tat gca gac tgt gtc ttg gca aac tgg aag
    P  P  I  L  V  Y  A  D  C  V  L  A  N  W  K
428 aaa aag gat cct aat aag ccc ctg act tat gag aac atg gac gtt
    K  K  D  P  N  K  P  L  T  Y  E  N  M  D
473 ttg ttc tca ttt cgt gat gga gac tgc agt aaa gga ttc ttc ctg
    L  F  S  F  R  D  G  D  C  S  K  G  F  F  L
518 gtc tct cta ttg gtg gaa ata gca gct gct tct gca atc aaa gta
    V  S  L  L  V  E  I  A  A  A  S  A  I  K  V
563 att cct act gta ttc aag gca atg caa atg caa gaa cgg gac act
    I  P  T  V  F  K  A  M  Q  M  Q  E  R  D
608 ttg cta aag gcg ctg ttg gaa ata gct tct tgc ttg gag aaa gcc
    L  L  K  A  L  L  E  I  A  S  C  L  E  K  A
653 ctt caa gtg ttt cac caa atc cac gat cat gtg aac cca aaa gca
    L  Q  V  F  H  Q  I  H  D  H  V  N  P  K  A
698 ttt ttc agt gtt ctt cgc ata tat ttg tct ggc tgg aaa ggc aac
    F  F  S  V  L  R  I  Y  L  S  G  W  K  G  N
743 ccc cag cta tca gac ggt ctg gtg tat gaa ggg ttc tgg gaa gac
    P  Q  L  S  D  G  L  V  Y  E  G  F  W  E  D
```

```

788 cca aag gag ttt gca ggg ggc agt gca ggc caa agc agc gtc ttt
    P K E F A G G S A G Q S S V F
833 cag tgc ttt gac gtc ctg ctg ggc atc cag cag act gct ggt gga
    Q C F D V L L G I Q Q T A G G
878 gga cat gct gct cag ttc ctc cag gac atg aga aga tat atg cca
    G H A A Q F L Q D M R R Y M P
923 cca gct cac agg aac ttc ctg tgc tca tta gag tca aat ccc tca
    P A H R N F L C S L E S N P S
968 gtc cgt gag ttt gtc ctt tca aaa ggt gat gct ggc ctg cgg gaa
    V R E F V L S K G D A G L R E
1013 gct tat gac gcc tgt gtg aaa gct ctg gtc tcc ctg agg agc tac
    A Y D A C V K A L V S L R S Y
1058 cat ctg caa atc gtg act aag tac atc ctg att cct gca agc cag
    H L Q I V T K Y I L I P A S Q
1103 cag cca aag gag aat aag acc tct gaa gac cct tca aaa ctg gaa
    Q P K E N K T S E D P S K L
1148 gcc aaa gga act gga ggc act gat tta atg aat ttc ctg aag act
    A K G T G G T D L M N F L K
1193 gta aga agt aça act gaa aaa tcc ctt ttg aag gaa ggt taa 1234
    V R S T T E K S L L K E G *

```

Figura 10 – Sequência de rIDO a partir do sequenciamento do produto de PCR amplificado a partir do plasmídeo pGEX-IDO-1 λ T. A sequência contém os ATGs, inclusive o inicial (azul) e o códon de parada (rosa).

Para a clonagem e expressão, utilizamos como referência o mesmo trabalho de Littlejohn T.K. e colaboradores (215) com pequenas alterações: plasmídeo pRSET B, sítio de restrição clonado (XhoI e EcoRI), e bactéria utilizada para expressar a proteína de interesse (*E. coli* BL21 (DE3)). Adicionamos um sítio de restrição diferente em cada um dos primers, a XhoI em 5' - 3' e a EcoRI em 3' - 5' para tornar a clonagem do inserto de interesse eficiente e direcionada. A *E.coli* BL21 (DE3) foi transformada com pRSET B-IDO e um clone da bactéria transformada foi induzida com IPTG para a expressão da proteína.

Verificamos o aumento de uma banda próxima a 45 kDa, mesmo peso da IDO, após a expressão. Apesar da presença desta banda também em corpos de inclusão, utilizamos somente o sobrenadante para a purificação da enzima de interesse. Esta purificação foi realizada em resina de níquel utilizando um gradiente entre 0 e 300 mM de imidazol e a rIDO-his eluiu entre 150 e 200 mM.

Realizamos o ensaio clássico de atividade de rIDO (9) com a enzima recém purificada e verificamos a formação de QUIN, seu principal produto, por HPLC (figura 11). Este pico não foi observado na reação sem a enzima (dado não mostrado).

Figura 11 – Cromatograma de TRP e QUIN após reação de rIDO recombinante humana em um meio contendo 20 mM de ascorbato, 10 μ M de azul de metileno, 200 μ g/ml de catalase, 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,5) e 100 μ M de L-TRP. A reação ocorreu a 37°C. TRP e QUIN foram monitorados por HPLC nos comprimentos de onda de 280 nm e 365 nm, respectivamente. O tempo de retenção do TRP é próximo de 21 minutos e o da QUIN de 14,5 minutos.

Enfrentamos algumas dificuldades na concentração e estabilidade de rIDO nos primeiros lotes expressados, assim realizamos algumas modificações para a otimização da expressão. Como primeira modificação, iniciamos o processo de indução da expressão da proteína recombinante com IPTG no final da fase log, início da fase estacionária do crescimento das bactérias, ao invés de somente na fase log. Esta escolha foi baseada em um trabalho que reporta a vantagem da indução tardia, para algumas proteínas facilitando o enovelamento e reduzindo a formação de corpos de inclusão (216). Inicialmente a indução era realizada quando as culturas de bactérias atingiam uma densidade óptica em 600 nm ($D.O_{600\text{ nm}}$) de 0,6 a 0,8, já neste lote, induzimos a expressão de rIDO quando a cultura atingiu uma $D.O_{600\text{ nm}}$ próxima a 1,2. Desta forma conseguimos uma maior quantidade de proteína por litro de cultura (passou de 2,5 mg/L de cultura em média nos primeiros lotes para 12,3 mg/L de cultura). As figuras 12 e 13 mostram o gel da purificação da banda de rIDO em diferentes frações coletadas da coluna de níquel e o *imunoblot* com anticorpo específico para IDO, demonstrando a presença da enzima de interesse.

Figura 12: Gel de poliacrilamida de 12% com as bandas de rIDO recombinante humana purificada (45 kDa) por coluna de níquel. As frações correspondem a eluição de 150 a 200 mM de imidazol.

Figura 13: *Western blotting* da proteína rIDO. **1)** Sobrenadante de *E.coli* BL21 (DE3) induzida com 0,1 mM de IPTG. **2)** Sobrenadante de *E.coli* BL21 (DE3) não induzida.

Como segunda modificação do método de obtenção da rIDO, adicionamos a etapa de concentração e purificação pela utilização de Microcon[®] (filtro de 30 kDa) após a purificação com coluna de níquel. Esta etapa trouxe como vantagem, além da concentração da amostra, a possibilidade da retirada de imidazol da solução. Como resultante destas modificações, garantimos um grande lote de rIDO com alta atividade por miligrama de proteína para a finalização de nosso estudo (Tabela I). Para que se tenha uma ideia da eficiência destas últimas modificações, mostramos na figura 14, cromatogramas da reação final após incubação de TRP com os dois lotes de rIDO.

Tabela I: Parâmetros de rendimento e de atividade de IDO dos dois lotes da enzima recombinante humana produzida no nosso laboratório.

Enzima IDO	mg de proteína/L de cultura	Consumo de TRP (nmol/reação/30min)	Produção de QUIN (nmol/reação/30min)	Atividade específica de IDO (μmol QUIN/h/mg de proteína)
Lote 1	2,50	4,03	0,84	2,55
Lote 2	12,30	10,90	5,23	15,85

Consumo de TRP

Produção de QUIN

Figura 14: Consumo de TRP e produção de QUIN na presença do primeiro **(a1 e a2)** e do segundo lote **(b1 e b2)** de rIDO. As análises de TRP e QUIN foram realizadas em HPLC com detecção nos comprimentos de onda de 280 e 365 nm, respectivamente.

A expressão e purificação da enzima rIDO nos possibilitou realizar diversos estudos enzimáticos com compostos de interesse para o nosso grupo. A expressão desta enzima foi otimizada a partir do protocolo descrito por Littlejohn e colaboradores (215). As modificações realizadas estão centradas na diminuição da temperatura de expressão (de 37°C para 30°C), aumento do tempo de indução (de 4 para 18 horas) e indução de expressão em D.O. superior a 1,1. Apesar das tentativas e modificações a maior parte da enzima ainda se situa em vesículas. Esta localização muito possivelmente é resultado da toxicidade de rIDO para a bactéria, uma vez que a IDO catalisa a oxidação de TRP. A armazenagem da proteína minimiza o efeito toxico. Em nossas preparações recolhemos

somente a parcela de rIDO solúvel no citoplasma, pois qualquer alteração no enovelamento da proteína pode acarretar perda de atividade enzimática. A enzima produzida em nosso laboratório possui uma qualidade comparável àquela obtida por outros grupos de pesquisa (215).

5.26. Indóis e quinuraminas como inibidores de IDO

Iniciamos nossos estudos com a rIDO verificando os parâmetros cinéticos da enzima. Verificamos primeiramente a estabilidade da enzima a 37°C nos tempos 15, 30, 45 e 60 minutos (figura 15). O gráfico aparenta ser linear, porém há uma leve tendência de diminuição da formação de QUIN a partir do 45º minuto, por este motivo adotamos o tempo de 30 minutos para a realização dos nossos experimentos.

Figura 15 – Efeito do tempo sobre a atividade de rIDO. A taxa de formação do produto de catalise da rIDO (QUIN) foi determinada por HPLC em um meio contendo 20 mM de ascorbato, 10 μ M de azul de metileno, 200 μ g/ml de catalase, 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,5) e 100 μ M de L-TRP. A reação ocorreu a 37°C. Gráfico de produção de QUIN (nmol) x tempo (minutos).

Realizamos as curvas de velocidade de reação x concentração de substrato para obtermos a cinética de reação e também calcularmos o K_m do L-TRP para a rIDO. Observamos a inibição da reação pelo substrato a partir de 175 μ M de TRP (figura 16A), como já relatado por Yamamoto e Hayaishi e Ferry e colaboradores (8, 68). O K_m encontrado foi de 21,62 μ M também próximos aos dados da literatura (figura 16B) (68, 87, 215).

A **B**

Figura 16: Efeito da concentração de TRP sobre a atividade de rIDO. A taxa de formação do produto de catalise da IDO (QUIN) foi determinada por HPLC em um meio contendo 20 mM de ascorbato, 10 μM de azul de metileno, 200 μg/ml de catalase, 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,5) e L-TRP (25, 50, 100, 175, 200, 300, 400 μM). A reação ocorreu a 37°C durante 30 minutos. **A)** Gráfico de velocidade x substrato (velocidade de formação de QUIN (nmol.min⁻¹) x concentração de TRP (μM)). As concentrações de TRP utilizados foram. **B)** Gráfico de Lineweaver-Burk (1/ velocidade de formação de QUIN (nmol⁻¹.min) x 1/concentração de TRP (μM⁻¹)).

Realizamos também ensaios cinéticos para 1MT, o inibidor clássico da IDO. O gráfico de Lineweaver-Burk confirmou que este composto é um inibidor competitivo reversível para IDO (figura 17). O K_i calculado para essa molécula é de 58,63 μM, semelhante ao valor encontrado na literatura (27, 112, 217).

Figura 17: Efeito de 1MT sobre a atividade de rIDO. A taxa de formação do produto de catalise da rIDO (QUIN) foi determinada por HPLC em um meio contendo diferentes concentrações de 1MT (0 μM , 17,5 μM , 35 μM e 70 μM), 20 mM de ascorbato, 10 μM de azul de metileno, 200 $\mu\text{g/ml}$ de catalase, 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,5) e L-TRP (17,5 μM , 35 μM , 70 μM e 105 μM). Gráfico de velocidade x substrato (velocidade de formação de QUIN (nmol.min^{-1}) x concentração de TRP (μM)), gráfico de Lineweaver-Burk ($1/\text{velocidade de formação de QUIN (nmol}^{-1}.\text{min)} \times 1/\text{concentração de TRP (}\mu\text{M}^{-1}\text{)}$) e Gráfico de K_m/V_{max} ($\mu\text{M.min.nmol}^{-1}$) x concentração de inibidor (μM).

Como os compostos de interesse (alguns compostos indólicos), incluindo MLT e seus produtos de oxidação AFMK e AMK, mostraram atividade antioxidante (218, 219), e, sabendo que a reação catalisada por IDO possivelmente utiliza ânions superóxido ou outra espécie reativa de oxigênio (ERO) como cofator, nós nos preocupamos em excluir a possibilidade de que um possível efeito inibitório destes compostos não fosse uma atividade indireta sobre sistemas geradores de ERO. Na reação de IDO *in vitro* adiciona-se azul de metileno (AM) e ascorbato (ASC), que geram espécies redutoras que ativam a IDO da sua forma nativa (Fe^{3+}) para seu estado ativado (Fe^{2+}). Como a adição de SOD na reação não interferiu na reação (figura 18), consideramos que possíveis efeitos antioxidantes dos compostos a serem testados não interfeririam na nossa análise.

Figura 18: Efeito de SOD (10 µM) sobre a atividade de IDO recombinante humana. SOD foi adicionada em diferentes momentos da reação (tempos zero, 5 e 15 minutos). A quantidade de QUIN refere-se àquela determinada aos 30 minutos. Resultado referente a três experimentos independentes.

Assim, realizamos um perfil de interação de compostos da via serotoninérgica sobre a atividade de rIDO. Verificamos que tanto MLT quanto SER não interferem na atividade da enzima nas condições ensaiadas. Entretanto AFMK e AMK parecem inibir a atividade da enzima em diferentes intensidades. O AFMK parece inibir a rIDO na mesma intensidade de 1MT, já o AMK, parece inibir a enzima em uma intensidade bem maior (figura 19).

Figura 19: Efeito dos compostos 1MT, MLT, AFMK, AMK e SER sobre a atividade de rIDO. A formação do produto de catalise da rIDO (QUIN) foi determinada por HPLC em um meio contendo 20 mM de ascorbato,

10 μ M de azul de metileno, 200 μ g/ml de catalase, 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,5) e 100 μ M de L-TRP. A reação ocorreu a 37°C. Todos os compostos testados estavam na concentração de 0,1 mM. A produção de QUIN foi avaliada por HPLC. Resultado referente a três experimentos independentes. O 1MT (**p<0,001) e o AMK (* p<0,05) foram significativamente diferente do controle.

Apesar de acharmos estes bons resultados para AFMK e AMK, observamos que diferentes lotes de AMK apresentavam diferentes intensidades de inibição. Consideramos a possibilidade da presença de contaminantes interferindo nos primeiros ensaios de inibição de AMK. A figura 20 mostra um cromatograma em corrida analítica após o isolamento em condições preparativas de AMK. Nota-se que AMK representa um pico majoritário com tempo de retenção de 17,3 minutos. Na ampliação deste cromatograma verificamos a presença de alguns picos de baixa intensidade; um deles antecedendo o pico de AMK e pequenos sinais posteriores ao AMK que estão contidos numa faixa abrangente de tempo de retenção (17,8 a 30 minutos).

Figura 20: Cromatograma da solução de AMK recém purificada por HPLC preparativo. Cromatogramas ampliados do cromatograma original onde foram coletadas as frações analisadas posteriormente.

Para que pudéssemos repetir os ensaios de inibição em condições de máxima pureza de AMK, foram coletados picos de AMK em corridas analíticas. Após várias corridas, conseguimos material suficiente para a realização do ensaio apresentado na figura 21. Verificamos que o AMK obtido por isolamento em coluna preparativa (AMK preparativo) e AMK que teve uma etapa adicional em coluna analítica apresentou baixa atividade de inibição sobre a enzima IDO (medida pela formação de QUIN). Entretanto, os conjuntos das frações coletadas inibiram a formação de QUIN em 65,8%.

Figura 21: Efeito de AMK (preparativo), AMK (analítico) e das frações coletadas da solução de AMK purificado do HPLC preparativo sobre a atividade de rIDO. A formação do produto de catalise da rIDO (QUIN) foi determinada por HPLC em um meio contendo 20 mM de ascorbato, 10 μ M de azul de metileno, 200 μ g/ml de catalase, 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,5) e 100 μ M de L-TRP. As concentrações dos compostos foram de 17,5 μ M. A reação ocorreu a 37°C por 30 minutos.

Este resultado nos faz crer que nos ensaios anteriores de inibição de IDO por AMK, algum dos compostos coletados nas frações 16 - 17 e 17.8 - 30 minutos estivessem numa concentração maior. Este estudo foi realizado somente para o AMK, pois este composto é mais estável que o AFMK nas condições de análise. Além disto, o AMK pode ser adquirido sem a contaminação do AFMK e o oposto não ocorre.

Este provável contaminante, ou contaminantes, devem ser eficientes em baixas concentrações e de qualquer modo são produtos originados da oxidação de MLT, uma vez que na síntese só há MLT e H₂O₂. Apesar da possibilidade de um novo e potente inibidor de IDO focamos nossos esforços na purificação de AMK e responder a seguinte pergunta: O produto de oxidação de MLT, o AMK, é inibidor de IDO?

Após a nova purificação do AMK, reavaliamos a ação deste composto sobre a atividade de IDO. Verificamos que o AMK inibe a formação de QUIN e a intensidade de inibição é semelhante ao 1MT (figura 22).

Figura 22: Efeito de AMK e do 1MT sobre a atividade de rIDO. A formação do produto de catalise da rIDO (QUIN) foi determinada por HPLC em um meio contendo 20 mM de ascorbato, 10 μ M de azul de metileno, 200 μ g/ml de catalase, 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,5) e 100 μ M de L-TRP. A concentração dos compostos foi de 0,1 mM. A reação ocorreu a 37°C por 30 minutos. Resultado referente a três experimentos independentes. Tanto 1MT quanto AMK (** p< 0,01) foram significativamente diferentes do controle.

Logo realizamos a cinética enzimática deste composto e, apesar da baixa inibição observada no gráfico, foi possível verificar que o AMK é um inibidor competitivo clássico para rIDO e o K_i calculado foi de 0,98 mM (figura 23).

Figura 23: Efeito de AMK sobre a atividade de rIDO. A taxa de formação do produto de catalise da rIDO (QUIN) foi determinada por HPLC em um meio contendo diferentes concentrações de AMK (0 μM, 20 μM, 40 μM, 70 μM e 100 μM), 20 mM de ascorbato, 10 μM de azul de metileno, 200 μg/ml de catalase, 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,5) e L-TRP (8,33 μM, 12,5 μM, 25 μM e 50 μM). Gráfico de velocidade x substrato (velocidade de formação de QUIN (nmol.min⁻¹) x concentração de TRP (μM)), gráfico de Lineweaver-Burk (1/velocidade de formação de QUIN (nmol⁻¹.min) x 1/concentração de TRP (μM⁻¹)) e Gráfico de Km/V_{max} (mM.min.nmol⁻¹) x concentração de inibidor (μM).

Mostramos que o AMK é um inibidor de rIDO. Esta inibição não é de mesma ordem daquela observada para 1MT, mas poderia estar relacionada a uma possível regulação entre as vias de metabolização de MLT e a de metabolização de TRP, conforme nossa hipótese de trabalho. Adicionalmente, observamos que produtos secundários da oxidação de AMK podem ser inibidores eficientes e, portanto a continuidade destes estudos via identificação desses compostos, deve ser feita.

5.27. Quinurenina como inibidor de peroxidase

Verificamos anteriormente que a via de oxidação de MLT por MPO interfere na reação de IDO, neste capítulo verificaremos se QUIN teria ação em uma reação catalisada por uma peroxidase modelo, a HRP. Para tanto escolhemos a reação de oxidação de MLT. MLT é consumida nas condições de 1,0 mM de MLT, 1,0 μ M de HRP, 0,5 mM de H_2O_2 incubados a 37°C por 60 minutos sendo que o principal produto é AFMK (figura 24).

Figura 24: Consumo de MLT e formação de AFMK através da reação MLT/HRP/ H_2O_2 . **A)** Consumo de MLT pela enzima HRP. **B)** Formação de AFMK pela enzima HRP. A reação ocorreu durante 60 minutos a 37°C na presença de MLT (1,0 mM), HRP (1,0 μ M) e H_2O_2 (0,5 mM). Resultado referente a três experimentos independentes. *** $p < 0,001$.

Para efeito comparativo, utilizamos TRP, um conhecido substrato de HRP. Tanto TRP quanto QUIN, na concentração de 0,1 mM não interferiram nem no consumo de MLT, nem na formação de AFMK quando analisamos a reação após 60 minutos (figura 25). Ao avaliarmos as cinéticas de reação, verificamos que ambos compostos interferem tanto no consumo do substrato MLT quanto na formação do produto AFMK (figura 26). Nota-se que o TRP diminui o consumo de MLT durante todo o tempo de reação e diminui a formação de AFMK entre os tempos 15 e 30 minutos, entretanto a reação volta a formar AFMK

equivalente a reação sem o composto testado. Quando adicionamos QUIN, verificamos um aumento de consumo de MLT, entretanto não houve aumento na formação de AFMK. Verificamos a diminuição da formação de AFMK entre os tempos 15 e 45 minutos, mas no tempo 60 a quantidade de AFMK formada foi o equivalente ao da reação sem o composto.

Figura 25: Efeito de TRP e QUIN sobre a atividade de HRP. **A)** Concentração de MLT após 60 minutos de reação na ausência ou presença de TRP ou QUIN; **B)** Concentração de AFMK após 60 minutos de reação na ausência ou presença de TRP ou QUIN. A reação ocorreu a 37°C na presença de MLT (1,0 mM), HRP (1,0 μ M) e H_2O_2 (0,5 mM) e TRP ou QUIN (0,1 mM) durante 60 minutos. O produto da reação AFMK foi monitorado por HPLC. Resultado referente a três experimentos independentes. A formação de AFMK na presença de TRP (* $p < 0,05$) e de QUIN (** $p < 0,01$) foi significativamente diferente do controle.

Figura 26: Efeito de TRP e QUIN sobre a atividade de HRP em relação ao tempo. **A)** Cinética de consumo de MLT na ausência ou presença de TRP ou QUIN. **B)** Cinética de formação de AFMK na ausência ou

presença de TRP ou QUIN. A reação ocorreu durante 0, 15, 30 45 e 60 minutos a 37°C na presença de MLT (1,0 mM), HRP (1,0 μ M) e H₂O₂ (0,5 mM) e TRP ou QUIN (0,1 mM). O produto da reação AFMK foi monitorado por HPLC. Resultado referente a três experimentos independentes. * p<0,05; ** p<0,01.

Avaliamos também a interferência dos compostos TRP e QUIN na concentração de 1,0 mM. Nestas condições ambos os compostos inibiram a formação de AFMK (29,3% para TRP e 46,8% para QUIN) (figura 27) após 60 minutos de reação. O consumo de MLT na presença de TRP foi menor do que o controle, fato este esperado, mas na presença de QUIN este consumo ficou semelhante ao controle. Observando a cinética de consumo de MLT verificamos que TRP aumenta a concentração deste composto em todos os tempos analisados. A presença da QUIN aumenta o consumo de MLT nos primeiros 15 minutos de reação e depois estagna até o tempo 60 minutos. Com relação à formação de AFMK, verificamos que TRP diminui a velocidade de reação depois de 30 minutos de reação e depois se mantém constante. Quando avaliamos a presença de QUIN na reação, verificamos que este composto inibe a formação de AFMK já nos primeiros 15 minutos de reação e os tempos seguintes a reação se mantém constante. (figura 28).

Figura 27: Efeito de TRP e QUIN sobre a atividade de HRP. **A)** Concentração de MLT após 60 minutos de reação na ausência ou presença de TRP ou QUIN **B)** Concentração de AFMK após 60 minutos de reação na ausência ou presença de TRP ou QUIN. A reação ocorreu a 37°C na presença de MLT (1,0 mM), HRP (1,0 μ M) e H₂O₂ (0,5 mM) e TRP ou QUIN (1,0 mM) durante 60 minutos. O produto da reação AFMK foi monitorado por HPLC. Resultado referente a três experimentos independentes. O TRP diminuiu

significativamente o consumo de MLT (* $p < 0,05$). A formação de AFMK foi significativamente diferente do controle na presença de TRP (* $p < 0,05$) e QUIN (** $p < 0,001$).

Figura 28: Efeito de TRP e QUIN sobre a atividade de HRP em relação ao tempo. **A)** Cinética de consumo de MLT na ausência ou presença de TRP ou QUIN. **B)** Cinética de formação de AFMK na ausência ou presença de TRP ou QUIN. A reação ocorreu durante 0, 15, 30 45 e 60 minutos a 37°C na presença de MLT (1,0 mM), HRP (1,0 μ M) e H₂O₂ (0,5 mM) e TRP ou QUIN (1,0 mM). Resultado referente a três experimentos independentes. * $p < 0,05$

Realizamos todos os controles de reação entre MLT, HRP, H₂O₂ e QUIN para verificar qual a interferência de QUIN na reação. Devido ao consumo de MLT na reação contendo QUIN, realizamos ainda reações controle de QUIN na presença de AFMK, para descartarmos a possibilidade de uma interação direta entre AFMK e QUIN. Não observamos a diminuição dos picos de QUIN ou de AFMK ou aparecimento de picos em nenhuma das análises realizadas.

Sabendo que TRP é um substrato de HRP e que ele interfere na reação de formação de AFMK de modo semelhante ao observado com QUIN, fomos verificar se QUIN era substrato de HRP. Não foi observado o consumo de QUIN em uma reação de HRP, H₂O₂ e QUIN nas concentrações de 0,05 e 0,1 mM (figura 29). Também não foi observado nem por detector UV-Vis e nem por detector de massas a formação de novos picos após 60 minutos de reação (dado não mostrado), sugerindo que QUIN não é substrato de HRP.

A **B**

Figura 29: Consumo de QUIN por meio da reação HRP/H₂O₂. Os picos de QUIN foram analisados pelo detector UV-Vis no comprimento de onda de 365 nm. **A)** QUIN (0,1 mM)/HRP/H₂O₂ ; **B)** QUIN (0,05 mM)/HRP/H₂O₂. A reação ocorreu a 37°C, durante 60 minutos, com QUIN (0,1 ou 0,05 mM), HRP (1 µM) e H₂O₂ (0,5 mM). Resultado referente a três experimentos independentes.

Frente às evidências, realizamos os ensaios cinéticos de inibição de HRP por QUIN (figura 30). Verificamos que o K_m para MLT foi de 7,8 mM. Observamos que a QUIN inibe o HRP de forma acompetitiva clássica e o K_i encontrado foi de 0,1 mM.

Figura 30: Efeito de QUIN sobre a atividade de HRP. A taxa de formação do produto de catalise da HRP (AFMK) foi determinada por HPLC em um meio contendo diferentes concentrações de QUIN (0 mM, 0,2 mM, 0,4 mM e 0,6 mM), 0,5 mM de H₂O₂, 100 mM de PBS (pH 7,4), 1,0 μ M de HRP e MLT (0,33 mM, 0,84 mM, 1,67 mM, 2,5 mM e 3,34 mM). Gráfico de velocidade x substrato (velocidade de formação de AFMK (nmol.min⁻¹) x concentração de MLT (mM)), gráfico de Lineweaver-Burk (1/velocidade de formação de AFMK (nmol⁻¹.min) x 1/concentração de MLT (mM⁻¹)) e Gráfico de $V_{\max}$ (min.nmol⁻¹) x concentração de inibidor (mM).

Como o intuito do estudo era verificar se QUIN interferia na reação catalisada por MPO, realizamos um ensaio na presença de MPO humano derivado de neutrófilos de sangue periférico (homogenato celular de $2,0 \times 10^6$ células/reação). Observamos que ambas as concentrações testadas inibiram a formação de AFMK. A concentração de 0,1 mM foi capaz de inibir a formação de AFMK em 17,6%, já a concentração de 1,0 mM foi capaz de inibir a formação de AFMK em 49,4%. Não observamos o consumo de MLT durante os 60 minutos (figura 31). Não observamos consumo de MLT em nenhuma das reações realizadas.

Figura 31: Consumo de AFMK por meio da reação MPO/H₂O₂. Os picos de AFMK foram analisados pelo detector de fluorescência (excitação 340 nm e emissão 460 nm). A reação ocorreu a 37°C, durante 60 minutos, com QUIN (0,1 ou 1,0 mM), MPO (2,0 x 10⁶ células/reação) e H₂O₂ (0,5 mM). Resultado referente a três experimentos independentes. A formação de AFMK foi significativamente diferente do controle na presença de 0,1 (***) p<0,001) e 1,0 mM (**) p<0,01) de QUIN.

Mostramos que a QUIN é um inibidor da formação de AFMK, mas não observamos o mesmo comportamento do substrato, sendo consumido na mesma intensidade da reação controle. Apesar desta divergência é possível haver uma regulação entre as vias oxidação de TRP e de MLT.

6. Discussão:

Nossos estudos se concentraram nas enzimas IDO e MPO juntamente com seus substratos, inibidores, moduladores, possíveis interações e regulações entre elas. Ambas as enzimas são hemoproteínas tendo como grupo prostético a protoporfirina IX e podem ser expressas em células do sistema imune, estando envolvidas no processo inflamatório. Há semelhanças entre estas enzimas como a capacidade da IDO de atuar como uma peroxidase na presença de H_2O_2 , gerando os mesmos produtos da MPO. Esta por sua vez pode catalisar reações de oxidação em compostos indólicos semelhantes à IDO. Neste último caso há a geração de produtos de oxidação com estruturas muito próximas umas das outras. A IDO tem TRP como um substrato bastante específico e sua oxidação gera NFK. Por outro lado a MPO é bastante inespecífica atuando sobre TRP e outros indóis, por exemplo, MLT, e neste caso há a formação de AFMK. NFK e AFMK assim como outros produtos gerados da oxidação de indóis têm estruturas similares e genericamente chamados de produtos de abertura de anel indólico.

A reação da IDO foi descrita no final da década de 60 e desde então o ascorbato juntamente com o azul de metileno tem sido utilizados como cofatores para os ensaios *in vitro* (9). Inicialmente supunha-se que estes compostos serviriam como fonte de $O_2^{\cdot -}$ necessário à conversão da forma férrica da IDO inativa ($IDO-Fe^{3+}$) para a forma ferrosa ativa ($IDO-Fe^{2+}O_2$) (220), mas se reconheceu que a forma como eles atuam é complexa e ainda não totalmente entendida. Um possível mecanismo sugerido em 1989 está apresentado na figura 32. Apesar dos vários estudos, o mecanismo detalhado da reação da IDO com azul de metileno e ascorbato, assim como os cofatores necessários *in vivo* são questões em aberto.

Figura 32: Proposta do mecanismo de como o sistema ascorbato/azul de metileno levaria a redução do Fe^{3+} da IDO para o Fe^{2+} gerando a formação do completo catalítico com TRP. Esquema alterado de 221.

Dado ao mecanismo de catálise da IDO não estar completamente elucidado, corre-se o risco de que alguns aparentes inibidores realmente não o sejam, pois ao invés de atuar sobre a enzima eles poderiam atuar sobre o sistema azul de metileno - ascorbato; especialmente para os compostos que estávamos testando que possuíam uma reconhecida atividade antioxidante. Para avaliar o efeito que antioxidantes teriam sobre a reação, observamos o efeito da SOD sobre a reação de oxidação do TRP catalisada pela IDO. A adição de SOD ao ensaio de atividade de IDO não acarretou nenhuma modificação na quantidade de QUIN produzida (figura 18). Este fato coincide com relatos anteriores de outros autores (25, 222).

Avaliamos a interferência dos indóis 5-HT e MLT e dos produtos de oxidação AFMK e AMK sobre a formação de QUIN em um ensaio clássico de IDO. É evidente que para avaliarmos se estes compostos são ou não inibidores de IDO, é preciso primeiramente reconhecer se eles são substratos desta enzima. Apesar de MLT ter sido considerada um substrato de IDO a partir dos primeiros trabalhos de Hayaishi e colaboradores (67, 87), esta ideia foi revista recentemente a partir do trabalho de Boutin e colaboradores (68) que

mostraram que MLT não é oxidada por IDO recombinante. Estes autores sugerem que o equívoco em relação a considerar MLT um substrato de IDO deveu-se, muito possivelmente, a falha no processo de purificação de IDO nos primeiros trabalhos. Eles consideraram que estas preparações poderiam estar contaminadas com peroxidases. Nós também não observamos qualquer consumo de MLT na presença de IDO/AM/ASC. Assim como não há qualquer interferência de MLT na oxidação de TRP catalisada por IDO.

Observamos que 5-HT, AFMK e AMK também não são substratos de rIDO. Há alguns relatos demonstrando que a 5-HT é substrato de IDO. Nós não observamos nem o consumo de 5-HT nem a formação de novos picos. Este composto é facilmente degradado e a sua detecção também não é trivial dificultando as nossas análises. Nem a 5-HT nem o AFMK interferiram na atividade de IDO.

O AMK mostrou ser um inibidor de IDO e, apesar de não apresentar um K_i próximo do 1MT, poderia ser um regulador entre as vias de oxidação de TRP e de MLT (figura 33). Estas duas vias poderiam atuar em um sítio inflamatório. Células mononucleares são capazes de sintetizar MLT a partir de TRP (223). Neutrófilos e monócitos apresentam grandes quantidade de MPO, enzima capaz de oxidar MLT à seus produtos de oxidação, AFMK e AMK. A presença de AFMK já foi descrito em liquor de pacientes com meningites e altas concentrações deste composto associou-se com parâmetros inflamatórios próximos ao controle, sugerindo uma ação anti-inflamatória deste composto (7). O AMK não foi encontrado, entretanto este composto é o produto de deformilação de AFMK. Monócitos, macrófagos e células dendríticas expressam a enzima IDO, enzima que oxida o TRP a QUIN. No sítio inflamatório vemos a presença de todas estas células interagindo e, através dos produtos gerados, são capazes de modular a inflamação.

Há a possibilidade de todos estes componentes estarem envolvidos em um processo inflamatório, em que a concentração de AMK fosse suficiente para iniciar a inibição de IDO. Inicialmente, verificaríamos uma diminuição da formação de QUIN e por

consequência uma diminuição das suas ações em processos de tolerância. Frente a isto, haveria uma maior disponibilidade de TRP e este composto poderia ser metabolizado pela via serotoninérgica. Seria possível verificar um aumento da concentração de 5-HT e de MLT e este último poderia ser então oxidado a AFMK e AMK por MPO, aumentando a concentração destes compostos no sítio envolvido. Seria possível verificar um aumento na inibição de IDO (retroalimentação positiva) e ao mesmo tempo verificaríamos um aumento nas ações de MLT e seus produtos bioativos. Observaríamos um deslocamento de ações regada pelo processo de tolerância causado pela ação da IDO, consumo excessivo de TRP e produção de QUIN, para um processo anti-inflamatório envolvendo as ações de MLT, AFMK e AMK.

Figura 33: Esquema simplificado das vias de metabolização de TRP. Destaque para a inibição de IDO por AMK.

Inibidores de IDO vêm sendo bastante estudados, principalmente após a utilização de 1MT juntamente com agentes quimioterápicos levando a uma regressão tumoral (101, 120). Além da ação sobre tumores, o uso de inibidores de IDO também tem sido sugerido em outras doenças como distúrbios psicológicos associados a inflamações sistêmicas. O fato de termos observado que o AMK é um inibidor da IDO também nos levou a pensar na possibilidade de utilização deste composto com fins terapêuticos. A vantagem seria a baixa toxicidade deste composto (24) e o fato dele ser endógeno. Entretanto o K_i encontrado para o AMK é alto em relação ao inibidor clássico 1MT (980 μM versus 58 μM). Mesmo não sendo um inibidor eficiente, o núcleo estrutural do AMK pode ser utilizado como base para o desenvolvimento de novos inibidores. Este composto mantém o anel benzênico como o apresentado para os inibidores de IDO da classe dos fenil imidazóis, mas não apresenta o grupo imidazólico (figura 34). A inserção de um grupo SH- no anel benzênico do grupo 4-fenil imidazol na posição *meta* ou *para* em relação ao grupo imidazol diminuiu o K_i destas moléculas frente a enzima IDO (116). O AMK apresenta um grupo metoxi na posição *meta* em relação a cadeia alifática e parece que a presença de um substituinte nesta posição é importante para a inibição da enzima IDO. Estes resultados demonstram que o núcleo estrutural do AMK pode ser um novo grupo farmacofórico para desenvolvimento de novos inibidores de IDO.

Figura 34: Estrutura química dos compostos AMK e fenil imidazol com o SH- na posição para do beneno. Destaque para as semelhanças estruturais como o grupo benzênico e a presença de um substituinte na posição meta do anel aromático.

Nós ainda encontramos outros possíveis inibidores de IDO derivados da oxidação de MLT. Estes compostos parecem ser inibidores mais eficientes, uma vez que parecem inibir a enzima em uma intensidade maior que a de 1MT. Neste trabalho não conseguimos isolar os possíveis compostos de interesse e com atividade inibitória de IDO e este é o objetivo de trabalho em andamento

Com a possível interação encontrada entre as vias de oxidação de MLT sobre a via de oxidação de TRP, testamos a possibilidade da via de TRP interferir na via de MLT. Verificamos que QUIN foi um inibidor da formação de AFMK, mas não inibiu o consumo de MLT. Observamos também que a QUIN não é substrato de HRP e nem reage diretamente com o AFMK. Não observamos a formação de novos picos em nenhuma das condições avaliadas. A presença de QUIN na reação de MLT, H_2O_2 e HRP pode gerar subprodutos não detectáveis pelo HPLC como compostos voláteis, de características cromatográficas muito diferentes das avaliadas ou ainda ter sido formada em baixas concentrações. A reação de formação deste (s) produto (s) compete tanto pelo substrato quanto pela enzima na formação de AFMK, diminuindo a sua concentração.

A QUIN foi capaz também de inibir a formação de AFMK em reação com MPO de maneira dose dependente (figura 31). Apesar de não realizarmos estudos cinéticos com esta enzima, pode-se dizer que o comportamento frente à QUIN seja semelhante ao encontrado para a enzima HRP, uma vez que suas estruturas são similares. Estes resultados demonstraram que a QUIN é capaz de diminuir a formação de AFMK e por consequência de AMK (figura 35), entretanto esta diminuição pode ser devido à formação de outros produtos. Apesar das considerações, a diminuição de formação de AFMK sugere uma regulação cruzada entre as vias de oxidação de MLT e TRP.

Figura 35: Esquema simplificado das vias de metabolização de TRP. Destaque para a inibição de MPO/HRP por QUIN.

A IDO é regulada pela ação de IFN- γ , enquanto que a oxidação de MLT parece não estar relacionada a esta citocina. Evidenciando a interação entre uma via dependente e outra independente de IFN- γ gerado produtos com ações similares sobre o sistema imune foi de grande importância e nos fez entender um pouco melhor a bioquímica e a regulação entre as vias de metabolização de TRP (figura 36).

Figura 36: Esquema resumido das vias de metabolização de TRP. Destaque para as interações entre as vias serotoninérgica e das quinureninas.

Capítulo II

7. Capítulo II - Localização das enzimas mieloperoxidase e indolamina 2,3 dioxigenase em células residentes e ativadas por concanavalina A de peritônio de camundongo

O capítulo anterior demonstrou que as vias que envolvem as enzimas MPO e IDO interagem entre si e possivelmente se auto-regulam de acordo com a situação do sítio inflamatório. Neste capítulo tivemos o intuito de demonstrar a localização destas enzimas em células do sistema imune residentes e ativadas com Con A. Demonstramos que a localização destas enzimas são diferentes quando ativamos as células e esta diferença de localização pode estar relacionada com uma alteração na função celular.

7.1. Localização da enzima mieloperoxidase em células residentes e ativadas por concanavalina A de peritônio de camundongo

Nosso grupo, através do trabalho de Rodrigues, M. R. e colaboradores (138), demonstrou que as células coletadas de peritônios de camundongos ativados com Con A continham mais MPO quando comparadas às células de camundongos controle. Neste novo estudo tivemos o intuito de complementar o trabalho já descrito pelo grupo avaliando a localização desta enzima nestas células de peritônio de camundongo controle e ativados com Con A.

Antes de iniciarmos nossos estudos, verificamos se encontraríamos os mesmos parâmetros de ativação de *burst* oxidativo e recrutamento de MPO realizados por Con A encontrados no trabalho anterior. Para isto utilizamos a reação de quimiluminescência amplificada por lucigenina e luminol. Nossos resultados foram condizentes com os resultados anteriores (138), demonstrando que Con A aumenta o *burst* oxidativo e também a capacidade de recrutar MPO para as células peritoneais de camundongos. Esta ativação foi comparada ao LPS (figura 37).

Figura 37: *Burst* oxidativo de células de peritônio de camundongo C57BL/6 ($1,0 \times 10^5$ células/ensaio) de animais controle, animais que receberam Con A (15 μ g) ou animais que receberam LPS (1 μ g) no peritônio. **A)** Gráfico de *burst* oxidativo amplificado por lucigenina para as células residentes, ativadas com LPS e ativadas com Con A. **B)** Gráfico de *burst* oxidativo amplificado por luminol para as células residentes,

ativadas com LPS e ativadas com Con A. As concentrações utilizadas foram de PMA (16 ng/ensaio), luminol e lucigenina de 1,0 mM em um volume final de reação de 300 μ L

Realizamos várias tentativas para obtermos boas imagens de *Western blotting* de MPO para células de peritônio de camundongo, mas infelizmente não foi possível. Apesar disto, conseguimos notar um aumento na concentração de MPO em células ativadas com Con A quando comparamos com as células residentes, dado este encontrado anteriormente pelo grupo (138).

Em seguida, avaliamos a localização de MPO em células peritoneais murinas utilizando as microscopias confocal e eletrônica de transmissão.

O conjunto de imagens a seguir representa marcação de MPO + núcleo (figura 38 e 40) e marcação de MPO + contraste de fase (figura 39 e 41) por microscopia confocal. Há marcação nítida de MPO nos dois grupos analisados (residente e Con A).

Na população residente observamos células individuais e agrupadas marcadas com MPO (figura 38). Dentre estas células foi possível observar três padrões de marcação: a) marcação intensa, bem definida e próxima a membrana plasmática; b) marcação com menor intensidade, também bem definida e próxima a membrana plasmática e c) marcação dispersa por toda a célula, inclusive próxima e sobre o núcleo (figura 39). Há ainda intensa marcação em células agrupadas, fato este discutido mais adiante. O que nos chamou a atenção é que não observamos marcação evidente de MPO na região de contato entre as células em alguns grupos celulares.

Figura 38: Imunodeteção de MPO em células residentes de peritônio de camundongo C57BL/6. Utilizamos anticorpo anti MPO (1:100), e um secundário específico (1:100) marcado com FITC que fluoresce em 518 nm (ciano) para ser analisado em microscópio confocal. O núcleo está marcado com DAPI. As microscopias representam 3 campos diferentes.

Figura 39: Imunodeteção de MPO em células de peritônio de camundongo C57BL/6 controle. Utilizamos anticorpo anti MPO (1:100), e um secundário específico (1:100) marcado com FITC que fluoresce em 518 nm (ciano) para ser analisado em microscópio confocal. Sobreposição de marcação sobre microscopia de contraste de fase. As microscopias representam 3 campos diferentes.

Nas células primada com Con A (figura 40 e 41) há maior número de células marcadas e em algumas células a marcação parece ser mais intensa do que as células residentes. Observamos novamente três padrões de marcação: a) alta intensidade de marcação com maior concentração próxima a membrana plasmática e dispersa pelo

citoplasma até próximo ao núcleo; b) marcação com menor intensidade e somente próxima a membrana e c) marcação difusa e com menor intensidade (figura 39). Há também marcação de células agrupadas, mas observamos uma diminuição de marcação de MPO na região de contato entre essas células.

Figura 40: Imunodeteção de MPO em células de peritônio de camundongo C57BL/6 primados com Con A. Utilizamos anticorpo anti MPO (1:100), e um secundário específico (1:100) marcado com FITC que fluoresce em 518 nm (ciano) para ser analisado em microscópio confocal. O núcleo está marcado com DAPI. As microscopias representam 4 campos diferentes.

Figura 41: Imunodeteção de MPO em células de peritônio de camundongo C57BL/6 primados com Con A. Utilizamos anticorpo anti MPO (1:100), e um secundário específico (1:100) marcado com FITC que fluoresce em 518nm (ciano) para ser analisado em microscópio confocal. Sobreposição de marcação sobre a microscopia de contraste de fase. As microscopias representam 4 campos diferentes.

Em trabalho recente (224) foi mostrado que, em células de cavidade peritoneal murino, há a formação de *doublets* celulares entre linfócitos B1 e outras células. Essa informação nos levou a reavaliar os nossos resultados de imagem, principalmente após observarmos que a marcação de MPO na microscopia confocal parecia mais frequente

nas células agrupadas duas a duas. Este fato nos conduziu a realização de análises por citometria de fluxo com marcadores de superfície para macrófagos e linfócitos B-1, juntamente com a marcação de MPO. Com isso, reconheceríamos com mais propriedade qual (is) o (s) tipo (os) celular (es) que apresentariam marcação para a enzima de interesse.

As células do peritônio foram marcadas com anticorpos que juntamente com dados de granulosidade e tamanho ajudaram a definir as subpopulações, especialmente macrófagos, linfócitos T e B. Realizamos a análise das amostras pelo programa Flowjo® (figura 42). Primeiramente, analisamos as células de acordo com o seu tamanho e sua granulosidade (Fsc x Ssc). Esta análise permitiu a separação de 3 grupos distintos de células: $Fsc^{low} \times Ssc^{low}$ que representa as células linfóides (linfócitos B e T), $Fsc^{high} \times Ssc^{high}$ que incluem macrófagos e *doublets* e $Fsc^{low} \times Ssc^{high}$ que contém células NK. Dentre estes 3 grupos, analisamos somente os dois primeiros, devido os marcadores utilizados.

Na janela representativa de linfócitos, analisamos a presença de CD5. As células que tiveram alta marcação com esse marcador foram consideradas linfócitos T. Em uma análise subsequente, dessas células T, analisamos a presença de MPO e observamos que não houve marcação da enzima para esse tipo celular. Voltando para a janela dos linfócitos, analisamos em seguida a presença de IgM que caracterizam os linfócitos B. Em seguida analisamos a presença de CD5 nas células que apresentam IgM, essa dupla marcação caracteriza linfócitos B-1a. Essas células foram analisadas para a presença de MPO, e foi possível verificar a marcação da enzima.

A janela de macrófagos e *doublets* de B-1 foi, então, analisada. A primeira verificação foi Fsc x F4/80. Nesta análise, observamos dois grupos distintos de células. Uma análise subsequente de F4/80 x IgM mostra que as células positivas para F4/80 e negativas para IgM são os macrófagos. Essas células foram então analisadas para a

presença de MPO e observamos a marcação dessa enzima. Retornando a janela inicial de granulócitos, analisamos a presença de IgM, e há uma grande porcentagem de células IgM⁺. Essa marcação nos permite afirmar que essas células são *doublets* de B-1. Novamente analisamos essas células para a presença de MPO, e observamos a marcação da enzima.

Figura 42: Citometria de fluxo para os subtipos de células presentes na cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 não estimulados. Avaliando a população de menor tamanho e menor granulosidade células CD5+/ IgM- são linfócitos T. Células CD5low/ IgM+são linfócitos B1a e CD5- são linfócitos B1. Avaliando as células de baixa e média granulosidade e de grande tamanho, as células F4/80+ são macrófagos. Células F4/80-/ IgM+ são os *doublets* de B-1. Em todas as células foram avaliadas a presença de MPO.

Ao final verificamos a presença ou ausência de MPO nos diferentes grupos celulares de peritônio de camundongo murino conjuntamente (figura 43).

Verificamos nas células residentes que macrófagos, linfócitos B-1 e *doublets* de linfócitos B-1 apresentam marcação para MPO, o que foi um dado surpreendente. Linfócitos T não marcaram para MPO, mostrando que a ação do anticorpo não era inespecífica. A figura 43 mostra os histogramas em escala logarítmica (eixo x) da reação controle com a reação na presença de anti MPO para os tipos celulares analisados por esse experimento.

A)

B)

C)

D)

Figura 43: Histograma da presença ou ausência de MPO nos diferentes tipos celulares presentes no peritônio de camundongos C57BL/6 controle ($1,0 \times 10^6$ células/ análise) analisado através de citometria de fluxo. Grupo controle (vermelha) e marcados com MPO (azul). **A)** macrófagos **B)** *Doublets* de linfócitos B-1; **C)** Linfócitos B-1 a; **D)** Linfócitos T.

A análise com células peritoneais de animais tratados com LPS mostrou diferenças na relação entre os diferentes tipos celulares, mas não evidenciou alteração no conteúdo de MPO.

Como controle para marcação de células B, foi realizado a marcação de células do baço (rico em linfócitos B-2 e pobre em B-1). Não observamos marcação nestas células com o anticorpo monoclonal para MPO.

Avaliamos também as células de peritônio de camundongo por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Verificamos que as condições de fixação e contratação

estavam satisfatórias, pois foi possível observar com nitidez nas imagens a carioteca, as cristas mitocondriais e os ribossomos, marcadores principalmente de boa conservação das amostras (figura 44).

Na figura 36, observamos duas imagens, uma referente às células residentes (A) e outra referente às células ativadas com Con A (B). É possível notar a alta heterogeneidade celular nesta cavidade, e isto independe do tratamento. Notamos ainda células interagindo entre si e essa interação parece ser intensa, não sendo possível ter sido gerada artificialmente. Morfologicamente é possível notar linfócitos e macrófagos nessas interações e essas imagens confirmam a presença de *doublets*, recentemente descritos (223).

Figura 44: Microscopia eletrônica de transmissão de células de peritônio de camundongo C57BL/6. **A)** residentes e **B)** ativadas com Con A (15 µg). Barra de escala 2 µm.

Para uma melhor análise da localização de MPO, realizamos a marcação desta

enzima na presença de um anticorpo secundário marcado com ouro coloidal de 10 nm.

Nos macrófagos de camundongos controle, observamos que a MPO no citoplasma, em mitocôndrias, em vesículas, em grânulos e no núcleo. Apesar de esta enzima encontrar-se dispersa no citoplasma ela parece estar associada a organelas importantes de liberação de proteínas como vesículas e retículo endoplasmático, além de estar presente no complexo de Golgi (CG) e em vesículas próximas, sendo este um indício de síntese de MPO em macrófagos (figura 45). Observamos ainda uma tendência de marcação de MPO mais próxima à membrana plasmática do que próxima ao núcleo.

A

B

C **D**

Figura 45: Microscopia eletrônica de transmissão de macrófago de peritônio de camundongo controle marcada com ouro coloidal para MPO. **A)** Macrófago controle, barra de escala 2 μ m. **B)** Há marcação para MPO em vesículas (V, seta grossa cinza), mitocôndrias (M, seta fina branca) e citoplasma (seta grossa preta). Barra de escala 200 nm. **C)** Há marcação de MPO em vesículas (V, seta grossa cinza), mitocôndrias (M, seta fina branca), citoplasma (seta grossa preta) e núcleo (N, seta fina preta). Barra de escala 200 nm. **D)** Há marcação de MPO em vesículas (V, seta grossa cinza), mitocôndrias (M, seta fina branca), citoplasma (seta grossa preta) e complexo de Golgi (CG, seta grossa branca). Barra de escala 200 nm.

A presença de MPO em linfócitos, achado descrito neste estudo, foi confirmada por MET. Encontramos MPO no citoplasma, em mitocôndrias e no núcleo de linfócitos (figura 46). Estas imagens confirmam que linfócitos de peritônio de camundongo controle contêm MPO.

Figura 46: Microscopia eletrônica de transmissão de linfócito de peritônio de camundongo controle marcada com ouro coloidal para MPO. Há marcação para MPO em mitocôndrias (M, seta fina branca), citoplasma (seta grossa preta) e núcleo (N, seta fina preta). Barra de escala 200 nm

Verificamos a presença de interação entre duas ou mais células (*doublets*) e muitas vezes os linfócitos estão envolvidos. Avaliamos algumas interações e verificamos uma distribuição de marcação muito semelhante ao apresentado tanto para os macrófagos quanto para os linfócitos residentes (figura 47). Foi interessante notar poucos *doublets* na população controle e para parte destes não observamos marcação para MPO próximo ao local de interação entre as células. Em parte destas interações verificamos a presença de MPO próximo ao local de interação. Estes dados já haviam sido observados na microscopia confocal de células controle.

A **B**

Figura 47: Microscopia eletrônica de transmissão de *doublets* de macrófago e linfócito de peritônio de camundongo controle marcada com ouro coloidal para MPO. **A)** Interação entre dois linfócitos residentes. Há marcação para MPO em citoplasma (seta grossa preta) e núcleo (N, seta fina preta). Vemos marcação de MPO próximo ao local de interação entre as células. Barra de escala 200 nm. **B)** Interação entre dois macrófagos residentes. Há marcação de MPO em vesículas (V, seta grossa cinza), mitocôndrias (M, seta fina branca), citoplasma (seta grossa preta) e núcleo (N, seta fina preta). Vemos ainda marcação de MPO próximo ao local de interação entre as células. Barra de escala 200 nm.

Avaliamos também os macrófagos de peritônio de camundongo ativados com Con A e encontramos MPO novamente em vesículas, em mitocôndrias, no citoplasma e também no núcleo (figura 48). Observamos a enzima próxima ao complexo de Golgi (CG) também em macrófagos ativados com Con A, mas havia menor concentração quando comparadas as células residentes. Avaliando as imagens, a MPO tende a encontrar-se mais próxima do núcleo do que próxima a membrana plasmática.

A **B**

Figura 48: Microscopia eletrônica de transmissão de macrófago de peritônio de camundongo tratado com Con A marcado com ouro coloidal para MPO. **A)** Há marcação para MPO em vesículas (V, seta grossa cinza), mitocôndrias (M, seta fina branca), citoplasma (seta grossa preta) e núcleo (N, seta fina preta). Barra de escala 200 nm. **B)** Complexo de Golgi de macrófago ativado com Con A. Há marcação para MPO citoplasma (seta grossa preta) e próximo do complexo de Golgi. Barra de escala 200 nm.

Encontramos MPO em linfócitos ativados com Con A. Há marcação de MPO no citoplasma, na mitocôndria, em vesículas e no núcleo (figura 49). Não observamos nenhuma diferença de localização entre os linfócitos controle e os linfócitos ativados com Con A.

Figura 49: Microscopia eletrônica de transmissão de linfócitos de peritônio de camundongo tratado com Con A marcado com ouro coloidal para MPO. Há marcação para MPO em vesículas (V, seta grossa cinza), mitocôndrias (M, seta fina branca), citoplasma (seta grossa preta) e núcleo (N, seta fina preta). Barra de escala 200 nm.

Encontramos os *doublets* também entre as células ativadas com Con A e há MPO distribuídas no citoplasma, em mitocôndrias, em vesículas e no núcleo novamente (figura 50). Verificamos a presença de MPO próximo e no local de interação entre as células e esta localização se faz mais frequente nesta população ativada com Con A. Foi curioso notar a presença de mais *doublets* nesta população ativada do que na população de células residentes.

A **B**

Figura 50: Microscopia eletrônica de transmissão de *doublets* de linfócitos e macrófagos peritônio de camundongo tratado com Con A marcados com ouro coloidal para MPO. **A)** Interação entre linfócitos. Há marcação de MPO em núcleo (N, seta fina preta) e citoplasma (seta grossa preta) nos linfócitos e marcação no citoplasma na interação linfócito-linfócito (seta grossa preta). Barra de escala 0,5 μ m. **B)** Interação entre linfócito e macrófago. Há marcação de MPO no núcleo (N, seta fina preta) e no citoplasma (seta grossa preta) no linfócito, há ainda marcação em mitocôndria (M, seta fina branca), vesículas (V, seta grossa cinza), citoplasma (seta grossa preta) e no núcleo (N, seta fina preta) no macrófago e também há marcação de MPO na interação linfócito-macrófago (seta grossa preta). Barra de escala 0,5 μ m.

A presença de MPO no núcleo e na mitocôndria nos chamou atenção, pois esta enzima é associada a danos envolvendo espécies reativas de oxigênio. Uma busca na literatura mostrou o primeiro trabalho que descreve a presença de MPO em núcleo de linhagens imortalizadas e de células do sistema imune humano. Este trabalho ainda demonstrou a capacidade de MPO em ligar-se a fragmentos de DNA, também de atuar como um protetor de dano no DNA causados por radicais de oxigênio.

Acreditamos que a MPO, além de atuar como sinalizador celular por intermédio dos seus produtos pode atuar diretamente. Outra função que esta enzima pode desenvolver é

como uma proteína de reparo de DNA. Com isto, verificamos se HRP (modelo de peroxidase *in vitro*) seria capaz de demetilar bases nitrogenadas. Realizamos estes ensaios nas condições previamente descritas por Gomes, M.M. (225) para a análise de demetilação de LSD na presença de HRP. Utilizamos bases nitrogenadas metiladas na amina livre, no oxigênio e no carbono do anel (figura 51). Dentro das condições analisadas, não observamos nem o consumo e nem a formação de produtos referentes as bases não metiladas na presença de HRP. (dados não mostrados)

Figura 51: Bases nitrogenadas metiladas no nitrogênio, carbono e oxigênio.

Encontramos MPO em macrófagos e linfócitos residentes e ativados com Con A. Observamos que a localização desta enzima é diferente dependendo do estado de ativação das células. Em células ativadas, encontramos maior marcação de MPO mais próximo ao núcleo quando comparamos às células residentes. Encontrar MPO em linfócitos foi um achado surpreendente e foi confirmado por três diferentes técnicas. Observamos ainda MPO em núcleo, um dado interessante, apesar de já descrito. Tentamos identificar uma possível função para esta enzima no núcleo, mas nas condições utilizadas não encontramos nenhuma ação sobre bases nitrogenadas metiladas. Apesar disto, acreditamos que a MPO está envolvida diretamente com eventos de sinalização celular.

7.2. Localização da indolamina 2,3 dioxigenase em células residentes e ativadas por concanavalina A de peritônio de camundongo

Devido ao interesse na enzima IDO também verificamos a presença e localização desta proteína em células residentes e ativadas com Con A de peritônio de camundongo. Observamos que tanto as células residentes quanto as células ativadas com Con A apresentam IDO (figura 52), entretanto não verificamos alteração na concentração da enzima entre os grupos analisados mesmo após o tratamento.

Figura 52: Presença da proteína IDO em células de peritônio de camundongo residentes e ativadas com Con A.

Em seguida avaliamos a localização da enzima nestas células em ensaios de microscopia confocal e o próximo conjunto de imagens representa marcação de IDO + núcleo (figura 53 e 55) e marcação de IDO + contraste de fase (figura 54 e 56). Há nítida marcação de IDO nos dois grupos analisados (residente e ativado).

Nas duas populações de células observamos que somente parte das células marcou para IDO e que há marcação tanto células individuais quanto agrupadas (figura 53 e 54). Nas células residentes identificamos três padrões de marcação: **a)** marcação intensa por todo o citoplasma, ocorrendo em células isoladas e em algumas células há marcação sobre o núcleo; **b)** marcação de menor intensidade com preferência pela membrana celular, ocorrendo tanto em células isoladas quanto células agrupadas, não há

marcação sobre o núcleo, quando há IDO nas células agrupadas, não vemos a marcação desta enzima na região de interação entre as células; **c)** marcação de baixa intensidade localizadas próxima a membrana celular ocorrendo em células individuais.

Figura 53: Imunodeteção de IDO em células de peritônio de camundongo C57BL/6. Utilizamos células residentes. Utilizamos anticorpo anti IDO (1:100), e um secundário específico (1:100) marcado com FITC que fluoresce em 518 nm (verde) para ser analisado em microscópio confocal. O núcleo está marcado com DAPI.

Figura 54: Imunodeteção de IDO em células de peritônio de camundongo C57BL/6. Utilizamos células

residentes. Utilizamos anticorpo anti IDO (1:100), e um secundário específico (1:100) marcado com FITC que fluoresce em 518 nm (verde) para ser analisado em microscópio confocal. Sobreposição de marcação sobre microscopia de contraste de fase.

Já na população de células ativadas com Con A (figuras 55 e 56) observamos quatro padrões de marcação: **a)** marcação intensa com preferência pela membrana celular, tendo ainda uma dispersão de marcação para próximo ao núcleo, não há marcação de IDO sobre o núcleo; **b)** marcação de menor intensidade com uma leve preferência pela membrana celular e uma maior distribuição intracelular, ocorre tanto em células isoladas quanto em células agrupadas, há menos células agrupadas marcadas com IDO e quando há células marcadas aparentemente vemos marcação de IDO no local de interação entre as células, mas em menor intensidade do que o restante da célula; **c)** marcação dispersa por todo o citoplasma e núcleo, as células parecem ser de pequeno tamanho e estão isoladas ou agrupadas com células de tamanho maior; **d)** marcação de baixa intensidade e localizada bem próximo a membrana celular.

Figura 55: Imunodeteção de IDO em células de peritônio de camundongo C57BL/6. Utilizamos células ativadas com Con A (15 µg). Utilizamos anticorpo anti IDO (1:100), e um secundário específico (1:100) marcado com FITC que fluoresce em 518 nm (verde) para ser analisado em microscópio confocal. O núcleo está marcado com DAPI.

Figura 56: Imunodeteção de IDO em células de peritônio de camundongo C57BL/6. Utilizamos células ativadas com Con A (15 μ g). Utilizamos anticorpo anti IDO (1:100), e um secundário específico (1:100) marcado com FITC que fluoresce em 518 nm (verde) para ser analisado em microscópio confocal. Sobreposição de marcação sobre microscopia de contraste de fase.

Realizamos, em seguida, ensaios de imunocitoquímica para IDO e avaliamos a localização por MET. Verificamos que nos macrófagos residentes, a IDO está no citoplasma, em vesículas, grânulos, mitocôndrias e no núcleo (figura 57). É interessante notar que a marcação parece estar muito bem localizada próxima da carioteca e grande parte das marcações estão dentro de vesículas ou grânulos. Observamos a presença de IDO próximo ao complexo de Golgi. Aparentemente há marcação tanto na face *cis* quanto na face *trans* do complexo de Golgi, demonstrando a chegada e a saída de IDO desta organela. Há bastantes vesículas marcadas com a enzima na região bem próxima deste complexo.

Figura 57: Microscopia eletrônica de transmissão de macrófago de peritônio de camundongo controle marcada com ouro coloidal para IDO. Há marcação em vesículas (V, seta grossa cinza), no citoplasma (seta grossa preta), mitocôndria (M, seta fina branca) e no núcleo (N, seta fina preta). Há marcação de IDO no próximo ao Complexo de Golgi, tanto na face cis, quanto na face trans. Barra de escala 200 nm.

Observamos a presença de IDO em linfócitos residentes e observamos esta enzima somente no citoplasma e no núcleo destas células (figura 58).

Figura 58: Microscopia eletrônica de transmissão de linfócito de peritônio de camundongo controle marcada com ouro coloidal para IDO. Há marcação no citoplasma (seta grossa preta) e no núcleo (N, seta fina preta). Barra de escala 200 nm.

Verificamos que a IDO também está presente em *doublets* de células residentes. Encontramos IDO no citoplasma, no núcleo, em vesículas e em mitocôndrias (figura 59). Há ainda IDO próxima ao local de interação entre as células, mas esta presença não ocorreu em todas as interações encontradas. Este dado pode ser confirmado por microscopia confocal, pois verificamos que algumas interações celulares aparentam não ter a enzima em seu local de interação.

A **B**

Figura 59: Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos e linfócitos de peritônio de camundongo controle marcada com ouro coloidal para IDO. **A)** Interação entre macrófagos. Há marcação em vesículas (V, seta grossa cinza), no citoplasma (seta grossa preta) e no núcleo (N, seta fina preta). Barra de escala 200 nm. **B)** Interação entre linfócitos. Há marcação no citoplasma (seta grossa preta) e no núcleo (N, seta fina preta). Vemos ainda marcação de IDO próximo ao local de interação. Barra de escala 200 μ M.

Há ainda marcação de IDO em macrófagos ativados com Con A e encontramos esta enzima no citoplasma, vesículas, grânulos e núcleo (figura 60). Ao contrario do observado nos macrófagos residentes, a grande parte das marcações observadas estavam no citoplasma, não encontramos muitas marcações de IDO dentro de vesículas. Este é um dado interessante, pois o aumento de enzima fora de vesículas pode ser um dos fatores do aumento da atividade de IDO frente a uma ativação celular.

Figura 60: Microscopia eletrônica de transmissão de macrófago de peritônio de camundongo tratado com Con A marcado com ouro coloidal para IDO. Há marcação em vesículas (V, seta grossa cinza), no citoplasma (seta grossa preta), em mitocôndrias (M, seta fina branca) e no núcleo (N, seta fina preta). Barra de escala 200 nm.

Verificamos a presença de IDO também em linfócitos ativados com Con A. Nestas células encontramos a marcação desta enzima no núcleo, no citoplasma e também em

mitocôndria, organela esta que não foi verificado IDO nos linfócitos residentes (figura 61).

Figura 61: Microscopia eletrônica de transmissão de linfócitos de peritônio de camundongo ativados com Con A marcado com ouro coloidal para IDO. Há marcação em vesículas (V, seta grossa cinza), no citoplasma (seta grossa preta) e no núcleo (N, seta fina preta). Barra de escala 200 nm.

Observamos a presença de IDO em *doublets* de linfócitos (figura 62) e macrófagos (figura 63) ativados com Con A. Nestas duas células esta enzima está dispersa no citoplasma, no núcleo e na mitocôndria. Nos *doublets* tanto de linfócitos quanto de macrófagos ativados com Con A encontramos IDO também no local de interação entre as células, fato este já observado na microscopia confocal e também na marcação com MPO.

A **B** **C**

Figura 62: Microscopia eletrônica de transmissão de *doublets* de linfócitos de peritônio de camundongo controle marcadas com ouro coloidal para IDO. **A)** Interação entre linfócitos. Barra de escala 0,5 μm . **B e C)** Há marcação no citoplasma (seta grossa preta), na mitocôndria (M, seta fina branca) e no núcleo (N, seta fina preta). Verificamos a marcação de IDO também no local de interação das células. Barra de escala 200 nm.

A **B**

Figura 63: Microscopia eletrônica de transmissão de doublets de macrófago de peritônio de camundongo ativados com Con A marcados com ouro coloidal para IDO. **A)** Interação entre macrófagos. Barra de escala 1 μ m. **B)** Interação entre macrófagos. Há marcação no citoplasma (seta grossa preta), na mitocôndria (M, seta fina branca) e no núcleo (N, seta fina preta). Barra de escala 200 nm.

Encontramos IDO em macrófagos e linfócitos de camundongos controle e ativados com Con A. Nos macrófagos residentes, observamos uma maior concentração de IDO dentro de vesículas, fato este não encontrado nos macrófagos ativados com Con A. Acreditamos que esta diferença de localização entre os macrófagos residentes e ativados indica o estado de ativação da célula. Encontrar IDO em linfócitos também foi um dado interessante, pois há poucos trabalhos na literatura descrevendo expressão de IDO em linfócitos. Verificamos também a presença de IDO no núcleo celular, um dado surpreendente. Apesar disto não buscamos nenhuma atividade sobre o DNA neste trabalho, entretanto acreditamos que esta enzima esteja atuando como um gerador de produtos antioxidantes ou ainda como sinalizador celular.

8. Discussão:

Entendemos que a localização intracelular das proteínas diz muito sobre sua função, por isso analisamos a localização de IDO e MPO em modelo experimental de células de peritônio de camundongo controle e ativado com injeção intraperitoneal de Con A. Para isto, utilizamos dois tipos de microscopia, a microscopia confocal, na qual permite observar localizações das proteínas de interesse tomando a célula como um todo e a microscopia eletrônica de transmissão, técnica esta que possibilita observar a presença de proteína nas diferentes organelas.

Encontramos MPO em mitocôndria e núcleo, além de encontrá-la no citoplasma e na vesícula de células residentes e ativadas. A presença de MPO no núcleo de neutrófilos e monócitos já foi descrita em humanos (226), inclusive sabe-se que esta enzima é capaz de ligar-se ao DNA. Encontrar no núcleo celular uma enzima reconhecidamente envolvida no *killing* de patógenos, principalmente em células ativadas, nos direciona a diferentes funções de MPO. Algumas ações para a enzima e seus produtos na sinalização celular vêm sendo descrita. A MPO gera grandes quantidades de produtos oxidantes capazes de danificar as células. Deve-se supor, portanto que a sua atividade deva ser bem controlada. Uma vez que produtos derivados da ação de MPO possuem meia vida curta e são altamente reativos, a localização de MPO no núcleo pode definir reações de HOCl e de $^1\text{O}_2$ com componentes nucleares. Neste sentido é conhecido que HOCl é capaz de ativar o fator nuclear kB (NF-kB) e a fosforilação de tirosina, aumentando a sinalização por cálcio e a produção de TNF- α em linfócitos B e T (227, 228). O $^1\text{O}_2$ foi capaz de iniciar os sinais de transdução ativando a transcrição do fator AP-2 (229).

Alguns experimentos mostraram que, apesar de MPO ser uma enzima capaz de gerar compostos que danificam biomoléculas como o DNA, a sua presença está associada a proteção do dano de DNA causado por radicais de oxigênio (226). Há algumas descrições de MPO em mitocôndria (230, 231), mas não se sabe ao certo que

esta enzima faz nesta organela, mas a exemplo do que ocorre no núcleo, é possível que este fato represente uma proteção. Além da ação catalítica de MPO, há relatos da atuação direta da proteína. A interação desta enzima com a integrina CD11b/CD18 aumentou a fosforilação de tirosina, ativou MAPK p38 e aumentou a translocação nuclear de NF- κ B (232). A MPO foi capaz de retardar a apoptose de neutrófilos atuando sobre a integrina CD11b/CD18, de ativar as vias de ERK e Akt, prevenindo as disfunções mitocondriais (23) e de induzir a produção de citocinas em macrófagos e células epiteliais independente de atividade catalítica (20-22).

A MPO apresentou diferenças em sua localização quando comparamos as células residentes e as células ativadas. Em microscopia confocal, observamos uma maior dispersão da enzima em células ativadas, encontrando-a inclusive próximo ao núcleo e sobre ele, enquanto que nas células residentes a MPO encontrava-se localizada preferencialmente próxima a membrana plasmática (figura 64). Esta diferença de localização foi observada também em microscopia eletrônica de transmissão.

Figura 64: Esquema da presença de MPO em macrófagos de peritônio de camundongo controle e ativado com Con A. O verde representa a marcação de MPO. Observa-se a mobilização de MPO para todo o citoplasma e próximo ao núcleo quando a célula foi ativada com Con A.

Encontramos MPO próximo ao local de interação entre duas ou mais células tanto

por microscopia confocal como por microscopia eletrônica de transmissão. É curioso notar que nos agrupamentos de células observados na microscopia confocal há um padrão de diminuição da presença da enzima no local de interação, o que poderia indicar depleção de MPO. Quando avaliamos estes grupos celulares por microscopia eletrônica de transmissão observamos uma marcação na região de contato entre as células. Não sabemos se esta divergência de resultados é uma limitação da técnica de microscopia confocal. Por outro lado na microscopia eletrônica de transmissão não há a quantificação de MPO e também não foi possível saber se a quantidade desta enzima foi maior, menor ou igual no restante da célula. De qualquer forma há descrição de que MPO estaria envolvida na adesão de leucócitos mediada pelas integrinas CD11b e CD18 (Mac-1) podendo auxiliar na adesão destas células em locais de inflamação (233).

Como já mencionado a expressão de MPO inicia-se nas células progenitoras de neutrófilos e monócitos, os prómielócito e promielomonócito, respectivamente. Os neutrófilos contêm uma grande quantidade de MPO; aproximadamente $2 - 4 \mu\text{g} / 10^6$ células. Os monócitos e macrófagos também contêm MPO, mas em menor quantidade. Assim, MPO é um marcador da presença das células provenientes destes precursores, não sendo esperada a presença desta enzima em células provenientes de prólinfócitos, apesar de alguns poucos relatos da presença de MPO em linfócitos imaturos (234) e alguns linfomas (235-237). Em peritônio de camundongo há uma população heterogênea de células que inclui neutrófilos, linfócitos T, dendrítica, NK, mas que é formada basicamente por duas subpopulações de macrófagos (30% subdivididos em 27% de LPM e 3% SPM) e linfócitos B (40%) (183).

Por citometria de fluxo verificamos (figura 44), além da esperada presença de MPO em macrófagos, a presença desta enzima em linfócitos B-1 e principalmente grupamentos celulares contendo linfócitos B-1. Apesar de observarmos um deslocamento destas populações na presença de MPO-FITC, a intensidade de marcação foi relativamente

baixa. A microscopia eletrônica de transmissão confirmou a presença de MPO em linfócitos controle e ativados. Encontramos esta enzima no citoplasma, na mitocôndria e no núcleo e a concentração encontrada foi aparentemente menor quando comparada aos macrófagos. Linfócitos B-1 derivados de fagócitos mononucleares de peritônio de camundongo foram capazes de fagocitar e matar os fungos *Cryptococcus neoformans* e a morte foi mediada por NO (238). A presença de MPO nestes linfócitos deve auxiliar na morte de patógenos fagocitados.

Frente aos nossos dados da presença de MPO em linfócitos de camundongo, iniciamos alguns ensaios para verificar se linfócitos humanos de sangue periférico também poderiam apresentar conteúdo desta enzima (apêndice). Os dados encontrados até o momento indicam a presença da MPO em linfócitos humanos maduros. Apesar dos resultados serem preliminares, encontrar RNAm e proteína nestas células é um fato surpreendente. A função reconhecida para MPO é gerar grandes quantidades de agentes oxidantes e espécies reativas de oxigênio como o HOCl atuando principalmente em na morte de patógenos. Encontrar MPO em células não fagocíticas como os linfócitos confirma diferentes funções para a MPO como modular da resposta imune como já descrito anteriormente.

Em relação à localização de IDO, fizemos um estudo análogo ao apresentado acima para MPO. Em células de peritônio de camundongo, não há diferença significativa aparente nas concentrações desta enzima entre os grupos controle e ativado. Este resultado foi de certa forma surpreendente, pois Con A é um ativador de linfócitos T e estes por consequência expressam IFN- γ , um conhecido indutor da expressão de IDO. Em nosso protocolo, sacrificamos os camundongos 72 horas após a injeção de 15 μ g/peritônio de Con A. Talvez a concentração de Con A administrada e o tempo de sacrifício dos animais não tenha sido suficiente para detectar uma diferença de IDO. Em cultura celular a adição de 10 μ g/mL de Con A leva a produção de aproximadamente 200

U/mL de IFN- γ em 48 horas de cultura (239, 240). Esta concentração de IFN- γ eleva a concentração de IDO para aproximadamente 20,1 nmol/mg de proteína total de cultura em 24 h (241). A Con A é uma lectina capaz de ligar-se a superfície de diversas células, inclusive eritrócitos. Em nossos estudos utilizamos 15 μ g de Con A por peritônio de camundongo, sendo este ambiente mais complexo do que uma cultura celular, podendo haver a dispersão da Con A por diversas células e tecidos.

Apesar de não termos evidenciado modificação na quantidade de IDO em peritônio tratado com Con A, observamos um aparente aumento na marcação para IDO no citoplasma, mas não em vesículas (figura 65). A mobilização de IDO de vesículas para o citoplasma pode estar relacionada aos primeiros eventos necessários para a disponibilização de IDO na ativação celular promovida por Con A.

Figura 65: Esquema marcação de IDO em células de peritônio de camundongo controle e ativado com Con A. O verde representa a marcação de IDO, os círculos representam as vesículas ou grânulos, marcados ou não pela IDO. Observa-se uma mobilização de IDO de dentro de vesículas para o citoplasma quando as células estão ativadas.

Além de encontrarmos IDO no citoplasma e em vesículas, encontramos-la em mitocôndrias e núcleo. A localização de IDO em núcleo já foi relatada anteriormente em células endoteliais de placenta (242) e gengiva (243), mas não em núcleo de leucócitos.

Apesar destes relatos, até o momento não se sabe como ocorre a translocação de IDO para o núcleo e nem qual é a sua função neste local. A IDO contém uma sequência de aminoácidos muito similar a sequência clássica de sinal de localização nuclear, tendo 5 resíduos de aminoácidos a mais que o conhecido (kklelppilvyadcvlanwkkk) (244). Além disto, nós só fomos capazes de observar a presença de IDO no núcleo nas análises de microscopia eletrônica de transmissão. Esta é uma técnica muito mais sensível quando comparamos com a microscopia óptica.

Do mesmo modo observado nas células marcadas para a MPO, observamos um padrão de apagamento de marcação de IDO em locais de interação entre as células, podendo indicar um padrão de depleção de IDO. Já em microscopia eletrônica de transmissão verificamos a presença de IDO próximo aos locais de interação entre células em um grupamento celular. Como já discutido para a MPO, não sabemos se esta divergência de resultados seja devido a uma limitação da técnica de microscopia confocal. Já na microscopia eletrônica de transmissão não foi possível avaliar se haveria uma diminuição ou aumento da quantidade de proteína neste local quando comparado com o resto da célula.

Como já mencionado a IDO é encontrada principalmente em células apresentadoras de antígenos como macrófagos e células dendríticas. Há poucos trabalhos que demonstram a presença de IDO em linfócitos e os que o fazem normalmente demonstram IDO em células dendríticas plasmocitárias com fenótipo de linfócitos B (245). Há um trabalho que demonstra a capacidade de linfócitos T CD4⁺ de expressar IDO na presença de IFN- α (246). Nossos resultados mostraram que não só macrófagos, mas também linfócitos expressam IDO, apesar de não sabermos qual o tipo de linfócito. Entendemos que o ambiente em que os linfócitos se encontravam antes das análises permitiu a interação entre as diferentes células do sistema imune podendo iniciar uma expressão de IDO nos diversos tipos de linfócitos.

9. Conclusões

Uma interação possível entre as vias de oxidação de TRP e MLT poderia ocorrer, via AMK, um produto de oxidação de MLT. AMK diminuiu a formação de QUIN, produto de oxidação de TRP via IDO. A QUIN também foi capaz de inibir a formação de AFMK via HRP-MPO. Há algumas semelhanças entre estas vias que envolvem a IDO e a MPO, pois há a utilização de compostos indólicos gerando produtos de abertura de anel indólico similares e com ações sobre o sistema imune. A via de oxidação de TRP pode ser induzida por IFN- γ , enquanto que a oxidação de MLT parece não sofrer efeito desta citocina e assim entendemos que estas duas vias poderiam ser complementares.

Acredita-se que a principal função de MPO é gerar HOCl, agente microbicida importante. Em neutrófilos a MPO está localizada em grânulos azurófilos e são mobilizadas para o fagolisossomo durante a fagocitose. Em macrófagos observamos a localização desta enzima próxima à membrana plasmática, mas se torna dispersa em células ativadas com Con A. Observamos ainda que tanto em células residentes quanto em células ativadas encontramos MPO no núcleo e na mitocôndria, além de estar presente no citoplasma e em vesículas. Estes dados sugerem que além da atividade microbicida, a MPO poderia ter outras funções na célula. Esta ideia é reforçada pelo fato de que as peroxidases não têm especificidade por substratos, pois já foram identificados diversos substratos endógenos para MPO. Nós também encontramos MPO em linfócitos peritoneais murinos e em linfócitos de sangue periférico humano. Todos estes dados sugerem que a MPO pode apresentar novas funções.

A localização intracelular de IDO deve estar associada às suas diversas ações. A principal função descrita para a IDO é o seu envolvimento no processo de tolerância imunológica. Em macrófagos de peritônio de camundongo verificamos que a IDO localiza-se próximo a membrana plasmática. Entretanto, observamos uma possível mobilização de

IDO de dentro de vesículas para o citoplasma nos macrófagos ativados. Tanto em células residentes quanto em células ativadas apresentaram IDO no núcleo e em mitocôndria, além de em vesículas e no citoplasma. Estes dados podem indicar novas funções da IDO como um possível envolvimento da IDO em processos de sinalização celular.

10.Referências

1. SPRENGER, J., HARDELAND, R., FUHRBERG, B., HAN, S.-Z. Melatonin and other 5-methoxylated indoles in yeast. Presence in high concentrations and dependence on tryptophan availability. *Cytologia*. 64: 209-213. 1999
1. MAYO, J. C., SAINZ, R. M., TAN, D. X., HARDELAND, R., LEON, J., RODRIGUEZ, C., REITER, R. J. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J. Neuroimmunol*. 165: 139–149. 2005.
2. PUGAZHENTHI, K., KAPOOR, M., CLARKSON, A. N., HALL, I., APPLETON, I. Melatonin accelerates the process of wound repair in full-thickness incisional wounds. *J. Pineal Res*. 44: 387–396. 2008
3. ALLEGRA, M, FURTMÜLLER, P. G., REGELSBERGER, G., TURCO-LIVERI, M. L., TESORIERE, L., PERRETTI, M., LIVREA, M. A., OBINGER, C. Mechanism of Reaction of Melatonin with Human Myeloperoxidase. *Biochem. Biophys. Res. Comm*. 282: 380–386. 2001.
4. SILVA, S. O., XIMENES, V. F., CATALANI, L. H., CAMPA, A. Myeloperoxidase-catalyzed oxidation of melatonin by activated neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 279 (2): 657-662. 2000.
5. SILVA, S. O., RODRIGUES, M. R., CARVALHO, S. R. Q., CATALANI, L. H., CAMPA, A., XIMENES, V. F. Oxidation of melatonin and its catabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine and N1-acetyl-5-methoxykynuramine, by activated leukocytes. *J. Pineal. Res*. 37: 171–175. 2004
6. SILVA, S. O., XIMENES, V. F., LIVRAMENTO, J. A., CATALANI, L. H., CAMPA, A. High concentrations of the melatonin metabolite, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, in cerebrospinal fluid of patients with meningitis: a possible immunomodulatory mechanism. *J. Pineal Res*. 39: 302–306. 2005.
7. HAYAISHI, O., ROTHBERG, S., MEHLER, A. H., SAITO, Y. Studies on oxygenases: enzymatic formation of kynurenine from tryptophan. *J. Biol. Chem*. 229: 889–896. 1957.
8. YAMAMOTO, S., HAYAISHI, O. Tryptophan pyrrolase of rabbit intestine. D- and L-tryptophan-cleaving enzyme or enzymes. *J. Biol. Chem*. 242: 5260-5266.1967.
9. BALL, H. J., YUASA, H. J., AUSTIN, C. J., WEISER, S., HUNT, N. H. Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 41 (3): 467-471. 2008
10. MELLOR, A. Indoleamine 2, 3 dioxygenase and regulation of T cell immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 338: 20–24. 2005.
11. GAJEWSKI, T. F., MENG, Y., HARLIN, H. Immune Suppression in the Tumor Microenvironment. *J. Immunother*. 29 (3): 223-240. 2006.
12. KATZ, J. B., MULLER, A. J., PRENDERGAST, G. C. Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. *Immunol. Rev*. 222: 206–221. 2008.

13. LARSSON, M., HAGBERG, L., NORKRANS, G., FORSMAN, A. Indoleamine deficiency in blood and cerebrospinal fluid from patients with human immunodeficiency virus infection. *J. Neurosci. Res.* 23: 441-446. 1989.
14. FUCHS, D., MÖLLER, A. A., REIBNEGGER, G., STÖCKLE, E., WERNER, E. R., WACHTER, H. Decreased serum tryptophan in patients with HIV-1 infection correlates with increased serum neopterin and with neurologic/psychiatric symptoms. *J. Acquir. Immune Defic Syndr.* 3: 873-876. 1990.
15. MUNN, D. H. and MELLOR, A. L. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance *J. Clin. Invest.* 117 (5): 1147-1154. 2007
16. MALLE, E., FURTMÜLLER, P. G., SATTLER, W., OBINGER, C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? *Brit. J. Pharmacol.* 152 (6): 838-854. 2007.
17. NICHOLLS, S. J., HAZEN, S. L. Myeloperoxidase and Cardiovascular Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25: 1102-1111. 2005
18. PAN, K., WANG, H., CHEN, M., ZHANG, H., WENG, D., ZHOU, J., HUANG, W., LI, J., SONG, H., XIA, J. Expression and prognosis role of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatocellular carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 134 (11): 1247-1253. 2008.
19. LEFKOWITZ, D. L., MILLS, K., MORGAN, D., LEFKOWITZ, S. S. Macrophage activation and immunomodulation by myeloperoxidase. *P. S. E. B. M.* 199: 204-210. 1992.
20. LEFKOWITZ, D. L., MILLS, K. C., MOGUILEVSKY, N., BOLLEN, A., VAZ, A., LEFKOWITZ, S. S. Regulation of macrophage function by human recombinant myeloperoxidase. *Immunol. Lett.* 36: 43-50. 1993.
21. LEFKOWITZ, D. L., ROBERTS, E., GRATTENDICK, K., SCHWAB, C., STUART, R., LINCOLN, J., ALLEN, R. C., MOGUILEVSKY, N., BOLLEN, A., LEFKOWITZ, S. S. The endothelium and cytokine secretion: the role of peroxidases as immunoregulators. *Cell. Immunol.* 202: 23-30. 2000.
22. EL KEBIR, D., JÓZSEF, L., PAN, W., FILEP, J. G. Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation. *Circ. Res.* 103: 352-359. 2008.
23. SILVA, S. O., CARVALHO, S. R., XIMENES, V. F., OKADA, S. S., CAMPA, A. Melatonin and its kynurenin-like oxidation products affect the microbicidal activity of neutrophils. *Microbes Infect.* 8 (2): 420-425. 2006.
24. KUMAR, A. P., PIEDRAFITA, F. J., REYNOLDS, W. F. Peroxisome Proliferator-activated Receptor - Ligands Regulate Myeloperoxidase Expression in Macrophages by an Estrogen-dependent Mechanism Involving the - 463GA Promoter Polymorphism. *J. Biol. Chem.* 279 (9): 8300-8315. 2004.
25. YOSHIDA, R., IMANISHI, J., OKU, T., KISHIDA, T., HAYAISHI, O. Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by interferon. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 78 (1): 129-132. 1981.
26. SONO, M. 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. *JBC.* 264 (3): 1616-1622. 1989.

27. MAGHZAL, G. J., Thomas, S.R., Hunt, N.H. and Stocker, R. Cytochrome b5, not superoxide anion radical, is a major reductant of indoleamine 2,3 dioxygenase in human cells. *JBC*. 283 (18): 12014-12025. 2008.
28. TAKIKAWA, O. Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338: 12–19. 2005.
29. UYTENHOVE, C., PILOTTE, L., THEATE, I., STROOBANT, V., COLAU, D., PARMENTIER, N., BOON, T., & EYNDE, B. J. V. D. Evidence for tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3 dioxygenase. *Nat. Med.* 9 (10): 1269-1274. 2003.
30. COWEN, P. J. Serotonin and depression: pathophysiological mechanism or marketing myth? *Trends. Pharmacol. Sci.* 29 (9): 433-6. 2008.
31. MUNN, D. H., SHARMAMD, B., HARDING, H. P., ZHANG, Y., RON, D., MELLOR, A. L. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity*. 22 (5): 633–642. 2005.
32. MACKENZIE, C. R., HESELER, K., MÜLLER, A., DÄUBENER, W. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immuno-regulation: tryptophan depletion versus production of toxic kynurenines. *Curr Drug Metab.* 8 (3): 237-44. 2007.
33. COPPEN, A., ECCLESTON, E. G., PEET, M. Total end free tryptophan concentration in the plasma of depressive patients. *Lancet*. 2:60-63. 1973.
34. COWEN, P. J., PARRY-BILLINGS, M., NEWSHOLME, E. A. Decreased plasma tryptophan levels in major depression. *J. Affect. Disord.* 16: 27-31. 1989.
35. PETERS, J. C. Tryptophan nutrition and metabolism: an overview. *Adv. Exp. Med. Biol.* 294: 345–358. 1991.
36. HAYAISHI, O., ROTHBERG, S., MEHLER, A. H., SAITO, Y. Studies on oxygenases: enzymatic formation of kynurenine from tryptophan. *J. Biol. Chem.* 229: 889–896. 1957.
37. FALLARINO, F., GROHMANN, U., VACCA, C., BIANCHI, R., ORABONA, C., SPRECA, A., FIORETTI, M. C., PUC CETTI, P. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ.* 9 (10): 1069–1077. 2002.
38. TERNESS, P., BAUER, T. M., ROSE, L., DUFTER, C., WATZLIK, A., SIMON, H., OPELZ, G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med.* 196 (4): 447–457. 2002.
39. BELLADONNA, M. L., GROHMANN, U., GUIDETTI, P., VOLPI, C., BIANCHI, R., FIORETTI, M. C., SCHWARCZ, R., FALLARINO, F., PUC CETTI, P. Kynurenine pathway enzymes in dendritic cells initiate tolerogenesis in the absence of functional IDO. *J Immunol.* 177 (1): 130–7. 2006.
40. STONE, T. W., PERKINS, M. N. Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. *Eur. J. Pharmacol.* 72: 411–412. 1981.
41. SCHWARCZ, R., WHETSELL, W. O. JR MANGANO, R. M. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science*. 219: 316–318. 1983.
42. BORDELON, Y. M., CHESSELET, M.-F., NELSON, D., WELSH, F., ERECINSKA, M. Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum. *J. Neurochem.* 69: 1629–1693. 1997.

43. BARAN, H., STANIEK, K., KEPPLINGER, B., GILLE, L., STOLZE, K., NOHL, H. Kynurenic acid influences the respiratory parameters of rat heart mitochondria. *Pharmacology* 62: 119–123. 2001.
44. SANTAMARIA, A., JIMÉNEZ-CAPDEVILLE, M. E., CAMACHO, A., RODRIGUES-MARTINEZ, E., FLORES, A., GALVÁN-ARZATE, S. In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. *Neuroreport*. 12: 2693–2696. 2001.
45. BEHAN, W. M. H., MCDONALD, M., DARLINGTON, L. G., STONE, T. W. Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenyl. *Br. J. Pharmacol.* 128: 1754–1760. 1999.
46. PERKINS, M. N., STONE, T. W. An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenines and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain Res.* 247: 184–187. 1982.
47. HENDERSON, G., JOHNSON, J. W., ASCHER, P. Competitive antagonists and partial agonists at the glycine modulatory site of the mouse NMDA receptors. *J. Physiol.* 430: 189–212. 1990.
48. BIRCH, P. J., GROSSMAN, C. J., HAYES, A. G. Kynurenic acid antagonises responses to NMDA via an action at the strychnine-insensitive glycine receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 154: 85–87. 1988.
49. SCHWARCZ, R., CERESOLI-BORRONO, G., WU, H. Q., RASSOULPOUR, A., POEGGELER, B., HODQKINS, P. S., GUIDETTI, P. Modulation and function of kynurenic acid in the immature rat brain. *Adv. Exp. Med. Biol.* 467: 113–123. 1999.
50. EASTMAN, C. L., GUILARTE, T. R. The role of hydrogen peroxide in the in vitro cytotoxicity of 3-hydroxykynurenine. *Neurochem. Res.* 15: 1101–1107. 1990.
51. OKUDA, S., NISHIYAMA, N., SAITO, H., KATSUKI, H. 3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity. *J. Neurochem.* 70: 299–307. 1998.
52. FURNESS, J. B., COSTA, M. Neurons with 5-hydroxytryptamine-like immunoreactivity in the enteric nervous system: Their projections in the guinea-pig small intestine. *Neuroscience* 7: 341–349. 1982.
53. MAURER – SPUREJ, E., PITTENDREIGH, C., SOLOMONS, K., The influence of selective serotonin reuptake inhibitors on human platelet serotonin. *Thromb. Haemost.* 91: 119–128. 2004.
54. MOLINOFF, P. B., AXELROD, J. Biochemistry of catecholamines. *Ann. Rev. Biochem.* 40: 465–500. 1971.
55. GREEN, A. R., CURZON, G. Decrease of 5-hydroxytryptamine in the brain provoked by hydrocortisone and its prevention by allopurinol. *Nature.* 220: 1095–1097. 1968.
56. AZMITIA, E. C., GANNON, P. J., KHECK, N. M., WHITAKER-AZMITIA, P. M. Cellular localization of the 5-HT_{1A} receptor in primate brain neurons and glial cells. *Neuropsychopharmacology.* 14: 35–46. 1996.
57. BELLIVER, F., LEBOYER, M., COURTET, P., BURESI, C., NEAUFILS, B., SAMOLYK, D., ALLILAIRE, J. F., FEINGOLD, J., MALLET, J., MALAFOSSE, A. Association between the tryptophan hydroxylase gene and manic-depressive illness. *Arch. Gen. Psychiatry.* 55: 33–37. 1998.
58. LUCKI, I. The spectrum of behaviours influenced by serotonin. *Biol. Psychiatry.* 44: 151–162. 1998.
59. MANN, J. J., BRENT, D. A., ARANGO, V. The neurobiology and genetics of suicide and attempted suicide: A focus on the serotonergic system. *Neuropsychopharmacology.* 24: 467–477. 2001.

60. TECOTT, L., SHTROM, S., JULIUS, D. Expression of serotonin-gated ion channel in embryonic neural and non neural tissues. *Nik. Cell. Neurosci.* 6: 43-55. 1995.
61. EATON, M. J., STALEY, J. K., GLOBUS, M. Y., WHITTEMORE, S. R. Developmental regulation of early serotonergic neuronal differentiation: The role of brain-derived neurotrophic factor and membrane depolarization. *Dev. Biol.* 170: 169-182. 1995.
62. MANN, J. J., MCBRIDE, P. A., ANDERSON, G. M., MIECZKOWSKI, T. A. Platelet and whole blood serotonin content in depressed inpatients: correlation with acute and life-time psychopathology. *Biol. Psychiatry.* 32: 243-257. 1992.
63. MOSSNER, R., LESCH, K. P. Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. *Brain Behav Immun.* 12: 249–271. 1998.
64. ASKENASE, P. W.; SZCZEPANIK, M.; ITAKURA, A.; KIENER, C.; CAMPOS, R. A. Extravascular T-cell recruitment requires initiation begun by V α 14+ NKT cells and B-1 B cells. *Trends Immunol.* 25: 441–449. 2004.
65. SPRENGER, J., HARDELAND, R., FUHRBERG, B., HAN, S.-Z. Melatonin and other 5-methoxylated indoles in yeast: Presence in high concentrations and dependence on tryptophan availability. *Cytologia.* 64: 209–213. 1999.
66. HARDELAND, R. Antioxidative protection by melatonin—Multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine.* 27: 119–130. 2005.
67. HIRATA, F., HAYAISHI, O., TOKUYAMA, T., SENOH, S. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J. Biol.Chem.* 249: 1311–1313. 1974.
68. FERRY, G., UBEAUD, C., LAMBERT, P. H., BERTIN, S., COGE, F., CHOMARAT, P., DELAGRANGE, P., SERKIZ, B., BOUCHET, J. P., TRUSCOTT, R. J., BOUTIN, J .A. Molecular evidence that melatonin is enzymatically oxidized in a different manner than tryptophan: Investigations with both indoleamine 2, 3-dioxygenase and myeloperoxidase. *Biochem. J.* 388: 205–215. 2005.
69. REITER, R. J. The melatonin rhythm: Both a clock and a calendar. *Experientia.* 49: 654–664. 1993.
70. GUERRERO, J. M., REITER, R. J. Melatonin-immune system relationships. *Curr. Top. Med. Chem.* 2: 167–179. 2002.
71. LISSONI, P., ROVELLI, F., MALUGANI, F., BUCOVEC, R., CONTI, A., MAESTRONI, G. J. Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 22: 45-47. 2001.
72. BARTSCH, C., BARTSCH, H., KARASEK, M. Melatonin in clinical oncology. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 23: 30-38. 2002.
73. SAINZ, R. M., MAYO, J. C., RODRIGUEZ, C., TAN, D. X., LOPEZ-BURILLO, S., REITER, R. J. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 1407-1426. 2003.
74. HARDELAND, R., FUHRBERG, B. Ubiquitous melatonin - Presence and effects in unicells, plants and animals. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 2: 25. 1996.
75. POEGGELER, B., THUERMAN, S., DOSE, A., SCHOENKE, M., BURKHARDT, S., HARDELAND, R. Melatonin's unique radical scavenging properties—Roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. *J. Pineal Res.* 33: 20. 2002.

76. SRINIVASAN, V., PANDI-PERUMAL, S. R., MAESTRONI, G. J. M., ESQUIFINO, A. I., HARDELAND, R., CARDINALI, D. P. Role of melatonin in neurodegenerative diseases. *Neurotox. Res.* 7: 293–318. 2005.
77. SILVA, S. O., RODRIGUES, M. R., XIMENES, V. F., BUENO-DA-SILVA, A. E., AMARANTE-MENDES, G. P., CAMPA, A. Neutrophils as a specific target for melatonin and kynuramines: effects on cytokines release. *J Neuroimmunol.* 156 : 146–152. 2004.
78. RODRIGUES, M. R.; RODRIGUEZ, D.; CATALANI, L. H. Interferon-gamma independent oxidation of melatonin by macrophage. *J. Pineal Res.* 34: 69–74. 2003.
79. TAN, D. X., MANCHESTER, L. C., BURKHARDT, S., SAINZ, R. M., MAYO, J. C., KOHEN, R., SHOHAMI, E., HUO, Y.S., HARDELAND, R., REITER, R. J. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J.* 15 (12): 2294-2296. 2001.
80. THAN, N. N., HEER, C., LAATSCH, H., HARDELAND, R. Reactions of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK) with the ABTS cation radical: identification of new oxidation products. *Redox Report.* 11 (1):15-24. 2006.
81. PEDROSA, A. M. C. Triptofano, melatonina e seus produtos de oxidação: ações sobre os linfócitos T. São Paulo, 2006. 157p. Tese de doutorado– Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
82. HIGUCHI, K. AND HAYAISHI, O. Enzymic formation of D-kynurenin from D-tryptophan. *Arch. Biochem. Biophys.* 120: 397-403. 1967.
83. SUGIMOTO, H., ODA, S., OTSUKI, T., HINO, T., YOSHIDA, T., SHIRO, Y. Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: Catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase. *Biophysics.* 103 (8): 2611–2616. 2006.
84. Dai, X., Zhu, B. T. Indoleamine 2,3 dioxygenase tissue distribution and cellular localization in mice: implications for its biological functions. *J. Histochem. Cytochem.* 58 (1): 17-28. 2010.
85. OHNISHI, T., HIRATA, F., HAYAISHI, O. Indoleamine 2,3 dioxygenase. Potassium superoxide as substrate. *J. Biol. Chem.* 252: 4643-4647. 1977.
86. SONO, M., TANIGUCHI, T., WATANABE, Y., HAYAISHI, O. Indoleamine 2, 3 dioxygenase. Equilibrium studies of the tryptophan binding to the ferric, ferrous and CO-bound enzymes. *J. Biol. Chem.* 255: 1339-1345. 1980.
87. SHIMIZU, T., NOMIYAMA S., HIRATA, F., HAYAISHI, O. Indoleamine 2, 3 dioxygenase: purification and some properties. *J. Biol. Chem.* 253 (13): 4700-4706. 1978.
88. TERENTIS, A. C., THOMAS, S. R., TAKIKAWA, O., LITTLEJOHN, T. K., TRUSCOTT, R. J., ARMSTRONG, R. S., YE, S. R., STOCKER, R. The heme environment of recombinant human indoleamine 2, 3 dioxygenase. Structural properties and substrate-ligand interactions. *J. Biol. Chem.* 277 (18): 15788-15794. 2002.
89. TAKIKAWA, O., YOSHIDA, R., HAYAISHI, O. Monooxygenase activities of dioxygenases. Benzphetamine demethylation and aniline hydroxylation reactions catalyzed by indoleamine 2, 3-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 258: 6808–6815. 1983.

90. POLJAK, A., GRANT, R., AUSTIN, C. J., JAMIE, J. F., WILLOWS, R. D., TAKIKAWA, O., LITTLEJOHN, T. K., TRUSCOTT, R. J., WALKER, M. J., SACHDEV, P., SMYTHE, G. A. Inhibition of indoleamine 2, 3 dioxygenase activity by H₂O₂. *Arch. Biochem. Biophys.* 450: 9-19. 2006.
91. MUNN, D. H., ZHOU, J. T., ATTWOOD, J. T., BONDAREV, I., CONWAY, S. J., MARSHALL, B., BROWN, C., MELLOR, A. L. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*. 281: 1191-1193. 1998.
92. MELLOR, A. L., MUNN, D. H. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation. *Immunol. Today*. 20 (10): 469-473. 1999.
93. MULLER A. J., MALACHOWSKI, W. P., PRENDERGAST, G. C. Indoleamine 2, 3 dioxygenase in cancer: targeting pathological immune tolerance with small-molecule inhibitors. *Expert. Opin. Ther. Targets*. 9: 831-849. 2005.
94. MELLOR, A. L., BABAN, B., CHANDLER, P., MARSHALL, B., JHAVER, K., HANSEN, A., KONI, P. A., IWASHIMA, M., MUNN, D. H. Cutting edge: induced indoleamine 2, 3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. *J. Immunol.* 15:1 (4): 1652-5. 2003.
95. POPOV, A., SCHULTZE, J. L. IDO-expressing regulatory dendritic cells in cancer and chronic infection. *J. Mol. Med.* 86: 145–160. 2008.
96. CONDEELIS, J., POLLARD, J. W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*. 124: 263-266. 2006.
97. YEH, K., SILBERMAN, D., GONZALEZ, D., RIGGS, J. Complementary suppression of T cell activation by peritoneal macrophages and CTLA-4-Ig. *Immun.* 212: 1-10. 2007.
98. FALLARINO, F., GROHMANN, U., YOU, S., MACGRATH, B. C., CAVENER, D. R., VACCA, C., ORABONA, C., BIANCHI, R., BELLADONNA, M. L., VOLPI, C., SANTAMARIA, P., FIORETTI, M. C., PUC CETTI, P. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites downregulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J. Immunol.* 176 (11): 6752–61. 2006.
99. JIA, L., TIAN, P., DING, C. Immunoregulatory effects of indoleamine 2, 3-dioxygenase in transplantation. *Transp. Immun.* 21: 18–22. 2009.
100. MULLEY, W. R., NIKOLIC-PATERSON, D. J. Indoleamine 2, 3-dioxygenase in transplantation *Nephrology*. 13: 204–211. 2008.
101. MULLER, A. J., DUHADAWAY, J. B., DONOVER, P. S., SUTANTO-WARD, E., PRENDERGAST, G. C. Inhibition of indoleamine 2,3 dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nature Med.* 11: 312-319. 2005.
102. CHEN, W., LIANG, X., PETERSON, A. J., MUNN, D. H., BLAZAR, B. R. The indoleamine 2,3 dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptative T cell regulatory cell generation. *J. Immunol.* 181: 5396-5404. 2008.
103. ALVARO, T., LEJEUNE, M., SALVADÓ, M.T., BOSCH, R., GARCIA, J.F., JAÉN, J., BANHAM, A. H., RONCADOR, G., MONTALBÁN, C., PIRIS, M. A. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin. Cancer Res.* 11: 1467–1473. 2005.

104. ISHIO, T., GOTO, S., TAHARA, K., TONE, S., KAWANO, K., KITANO, S. Immunoactivative role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in human hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 19: 319–326. 2004.
105. WANG, Y. T., LIU, H. Z., MCKENZIE, G., WITTING, P. K., STASCH, J. P., HAHN, M., CHANGSIRIVATHANATHAMRONG, D., WU, B. J., BALL, H. J., THOMAS, S. R., KAPOOR, V., CELERMAJER, D. S., MELLOR, A. L., KEANEY, J. F., HUNT, N. H., STOCKER, R. Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation. *Nature Medicine.* 16 (3): 279-U72. 2010.
106. BALL, H. J., SANCHEZ-PEREZ, A., WEISER, S., AUSTIN, C. J., ASTELBAUSER, F., MIU, J., MCQUILLAN, J. A., STOCKER, R., JERMIIN, L. S., HUNT, N. H. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene.* 396: 203–213. 2007.
107. MURRAY, M. F. The human indoleamine 2, 3-dioxygenase gene and related human genes. *Curr. Drug. Metab.* 8: 197–200. 2007.
108. METZ, R., DUHADAWAY, J. B., KAMASANI, U., LAURY-KLEINTOP, L., MULLER, A. J., PRENDERGAST, G. C. Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the anti-tumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. *Cancer Res.* 67: 7082–7087. 2007.
109. HANSEN, A. M., BALL, H. J., MITCHELL, A. J., MIU, J., TAKIKAWA, O., HUNT, N. H. Increased expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase in murine malaria infection is predominantly localized to the vascular endothelium. *Int. J. Parasitol.* 34 (12): 1309–1319. 2004.
110. TAKIKAWA, O., KUROIWA, T., YAMAZAKI, F., KIDO, R. Mechanism of interferon-gamma action. Characterization of indoleamine 2, 3-dioxygenase in cultured human cells induced by interferon-gamma and evaluation of the enzyme-mediated tryptophan degradation in its anti cellular activity. *J. Biol.Chem.* 263: 2041–2048. 1988.
111. KUDO, Y., BOYD, C. A. R. Human placental indoleamine 2,3 dioxygenase: cellular localization and characterization of an enzyme preventing fetal rejection. *Biochim Biophys Acta.* 1500: 119-124. 2000.
112. CADY, S. G., SONO, M. 1-methyl-DL-tryptophan, □-(3-benzofuranyl)-DL-alanine (the oxygen analog of tryptophan), and □-[3-benzo(b)thienyl]-DL-alanine (the sulfur analog of tryptophan) are competitive inhibitors for indoleamine 2,3 dioxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 291 (2): 326-333. 1991.
113. GASPARI, P., BENERJEE, T., MALACHOWSKI, W. P., MULLER, A. J., PRENDERGAST, G. C., DUHADAWAY, J., BENNETT, S., DONOVAN, A. M. Structure-activity study of brassinin derivatives as indoleamine 2,3 dioxygenase inhibitors. *J. Med. Chem.* 49: 684-692. 2006.
114. BANERJEE, T., DUHADAWAY, J. B., GASPARI, P., SUTANTO-WARD, E., MUNN, D. H., MELLOR, A. L., MALACHOWSKI, W. P., PRENDERGAST, G. C., MULLER, A. J. A key in vivo antitumor mechanism of action of natural product-based brassinins is inhibition of indoleamine 2,3 dioxygenase. *Oncogene.* 27: 2851-2857. 2008.

115. SONO, M., CADY, S. G. Enzyme kinetic and spectroscopic studies of inhibitor and effector interactions with indoleamine 2,3 dioxygenase. 1. Norharman and 4-phenylimidazole binding to the enzyme as inhibitors and heme ligands. *Biochemistry*. 28: 5392-5399. 1989.
116. KUMAR, S., JALLER, D., PATEL, B., LALONDE, J. M., DUHADAWAY, J. B., MALACHOWSKI, W. P., PRENDERGAST, G. C., MULLER, A. J. Structure Based Development of Phenylimidazole-Derived Inhibitors of Indoleamine 2,3-Dioxygenase *J. Med. Chem.* 51: 4968–4977. 2008.
117. PEREIRA, A., VOTTERO, E., ROBERGE, M., A. MAUK, G., ANDERSEN, R. J. Indoleamine 2,3-Dioxygenase Inhibitors from the Northeastern Pacific Marine Hydroid *Garveia annulata*. *J. Nat. Prod.* 69: 1496-1499. 2006.
118. FRIBERG, M., JENNINGS, R., ALSARRAJ, M., DESSUREAULT, S., CANTOR, A., EXTERMANN, M., MELLOR, A. L., MUNN, D. H., ANTONIA, S. J. Indoleamine 2, 3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection. *Int. J. Cancer*. 101: 151–155. 2002.
119. MULLER, A.J., DUHADAWAY, J.B., DONOVER, P.S., SU-TANTO-WARD, E., PRENDERGAST, G.C. Inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat. Med.* 11: 312–319. 2005.
120. HOU, D., MULLER, A. J., SHARMA, M. D., DUHADAWAY, J., BENERJEE, T., JOHNSON, M., MELLOR, A. L., PRENDERGAST, G. C., MUNN, D. H. Inhibition of indoleamine 2,3 dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. *Cancer Res.* 67 (2): 792-801. 2007.
121. WEIL, S.C., ROSNER, G.L., REID, M.S., CHISHOLM, R.L., FARBER, N.M., SPITZNAGEL, J.K., SWANSON, M.S. cDNA cloning of human myeloperoxidase: decrease in myeloperoxidase mRNA upon induction of HL-60 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84: 2057–2061. 1987.
122. CHANG, K.S., SCHROEDER, W., SICILIANO, M.J., THOMPSON, L.H., MC-CREDIE, K., BERAN, M., FREIREICH, E.J., LIANG, J.C., TRUJILLO, J.M., STASS, S.A. The localization of the human myeloperoxidase gene is in close proximity to the translocation break point in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*. 1: 458–462. 1987.
123. INAZAWA, J., INOUE, K., NISHIGAKI, H., TSUDA, S., TANIWAKI, M., MISAWA, S., ABE, T. Assignment of the human myeloperoxidase gene (MPO) to bands q21.3–q23 of chromosome 17. *Cytogenet. Cell Genet.* 50: 135–136. 1989.
124. ZAKI, S.R., AUSTIN, G.E., CHAN, W.C., CONATY, A.L., TRUSLER, S., TRAPPIER, S., LINDSEY, R.B., SWAN, D.C. Chromosomal localization of the human myeloperoxidase gene by in situ hybridization using oligonucleotide probes. *Gen. Chrom. Cancer*. 2: 266–270. 1990.
125. JOHNSON, K.R., NAUSEEF, W.M. Molecular biology of MPO. In *Peroxidases in Chemistry and Biology*, vol. I (J. Everse, K. E. Everse, and M. B. Grisham, eds.), Boca Raton, FL, CRC, 63–81. 1991.
126. NAUSEEF, W.M., OLSSON, I., ARNLJOTS, K. Biosynthesis and processing of myeloperoxidase a marker for myeloid cell differentiation. *Eur. J. Haematol.* 40: 97–110. 1988.

127. STROMBERG, J., PERSSON, A.-M., OLSSON, I. The processing and intracellular transport of myeloperoxidase. Modulation by lysosomotropic agents and monensin. *Eur. J. Cell Biol.* 39: 424–431. 1986.
128. HELENIUS, A., TROMBETTA, E.S.D., HEBERT, N., SIMONS, J.F. Calnexin, Calreticulin and the folding of glycoproteins. *Trends Cell Biol.* 7: 193–200. 1997.
129. OLSSON, I., PERSSON, A.M., STROMBERG, K. Biosynthesis, transport and processing of myeloperoxidase in the human leukaemic promyelocytic cell line HL-60 and normal marrow cells. *Biochem. J.* 223: 911–920. 1984.
130. KOEFFLER, H.P., RANYARD, J., PERTCHECK, M. Myeloperoxidase: its structure and expression during myeloid differentiation. *Blood.* 65: 484–491. 1985.
131. AKIN, D.T., KINKADE JR., J.M. Processing of a newly identified intermediate of human myeloperoxidase in isolated granules occurs at neutral pH. *Biol. Chem.* 261: 8370–8375. 1986.
132. ANDREWS, P.C., KRINSKY, N.I. The reductive cleavage of myeloperoxidase in half, producing enzymatically active hemi-myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* 256: 4211–4218. 1981.
133. FIEDLER, T.J., DAVEY, C.A., FENNA, R.E. X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8 Å resolution. *J. Biol. Chem.* 275: 11964–11971. 2000.
134. HANSSON, M., OLSSON, I., NAUSEEF, W.M. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch. Biochem., Biophys.* 445: 214–224. 2006.
135. FENNA, R., ZENG, J., DAVEY, C. Structure of the Green heme in myeloperoxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 316 (1): 653–656. 1995.
136. WINTERBOURN, C.C., VISSERS, M.C., KETTLE, A.J. Myeloperoxidase. *Curr. Opin. Hematol.* 7 (1): 53–8. 2000.
137. NAGRA, R.M., BECHER, B., TOURTELLOTT, W.W., ANTEL, J.P., GOLD, D., PALADINO, T., SMITH, R.A., NELSON, J.R., REYNOLDS, W.F. Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 78 (1–2): 97–107. 1997.
138. RODRIGUES, M. R., RODRIGUEZ, D., RUSSO, M., CAMPA, A. Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292 (4): 869–73. 2002.
139. GREEN, P. S., MENDEZ, A. J., JACOB, J. S., CROWLEY, J. R., GROEDON, W., HYMAN, B. T., HEINECKE, J. W. Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 90 (3):724–33. 2004.
140. HARRISON, J. E., SCHULTZ J. Studies on the Chlorinating Activity of Myeloperoxidase. *JBC.* 251 (5): 1371–1374. 1976.
141. HAMILTON, G. in: Hayaishi, O. (Ed.), Chemical Models and Mechanism for Oxygenases, Academic Press, New York, 1974, pp. 405–451.
142. GRISHAM, M. B., JEFFERSON, M. M., MELTON, D. F., THOMAS, E. L. Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils. Ammonia-dependent bactericidal, cytotoxic, and cytolytic activities of the chloramines. *J. Biol. Chem.* 259 (16): 10404–13. 1984.

143. MARQUEZ, L. A., DUNFORD, H. B. Kinetics of oxidation of tyrosine and dityrosine by myeloperoxidase compounds I and II. Implications for lipoprotein peroxidation studies. *J. Biol. Chem.* 270: 30434–30440. 1995.
144. MARQUEZ, L. A., DUNFORD, H. B., VAN WART, H. Kinetic studies on the reaction of compound II of myeloperoxidase with ascorbic acid. Role of ascorbic acid in myeloperoxidase function. *J. Biol. Chem.* 265: 5666–5670. 1990.
145. BOLSCHER, B. G. J. M., ZOUTBERG, G. R., CUPERUS, R. A., WEVER, R. Vitamin C stimulates the chlorinating activity of human myeloperoxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 784: 189–191. 1984.
146. ZUURBIER, K. W. M., BAKKENIST, A. R. J., WEVER, R., MUIJSERS, A. O. The chlorinating activity of human myeloperoxidase: high initial activity at neutral pH value and activation by electron donors. *Biochim. Biophys. Acta.* 1037: 140–146. 1990.
147. KETTLE, A. J., ANDERSON, R. F., HAMPTON, M. B., WINTERBOURN, C. C. Reactions of superoxide with myeloperoxidase. *Biochemistry.* 46: 4888–4897: 2007.
148. FURTMULLER, P. G., ZEDERBAUER, M., JANTSCHKO, W., HELM, J., BOGNER, M., JAKOPITSCH, C., OBINGER, C. Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. *Arch. Biochem. Biophys.* 445: 199–213. 2006.
149. KETTLE, A. J., WINTERBOURN, C. C. Myeloperoxidase: a key regulator of neutrophil oxidant production. *Redox Rep.* 3: 3–15. 1997.
150. SUBRAHMANYAM, V. V., KOLACHANA, P., SMITH, M. T. Hydroxylation of phenol to hydroquinone catalyzed by a human myeloperoxidase-superoxide complex: possible implications in benzene-induced myelotoxicity. *Free Radic. Res. Commun.* 15: 285–296. 1991.
151. KETTLE, A. J., WINTERBOURN, C. C. Superoxide-dependent hydroxylation by myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* 269: 17146–17151. 1994.
152. XIMENES, V. F., SILVA, S. O., RODRIGUES, M. R., CATALANI, L. H., MAGHZAL, G. J., KETTLE, A. J., CAMPA, A. Superoxide-dependent oxidation of melatonin by myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* 280: 38160–38169. 2005.
153. ZGLICZYNSKI, J. M., STELMASZYNSKA, T., OSTROWISKI, W., NASKALSKI, J., SZNAJD, J. Myeloperoxidase of human leukaemic leucocytes. Oxidation of amino acids in the presence of hydrogen peroxidase. *Eur. J. Biochem.* 4: 540–547. 1968.
154. THOMAS, E. L., GRISHAM, M. B., JEFFERSON, M. M. Myeloperoxidase-dependent effect of amines on functions of isolated neutrophils. *J. Clin. Invest.* 72: 441–454. 1983.
155. TEST, S. T., LAMPERT, M. B., OSSANNA, P. J., THOENE, J. G., WEISS, S. J. Generation of nitrogen-chlorine oxidants by human phagocytes. *J. Clin. Invest.* 74: 1341–1349. 1984.
156. RYTER, S. W., TYRRELL, R. M. Singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$): A possible effector of eukaryotic gene expression. *Free Rad. Biol. Med.* 24 (9): 1520–1534. 1998.
157. SUGIYAMA, S., KUGIYAMA, K., AIKAWA, M., NAKAMURA, S., OGAWA, H., LIBBY, P. Hypochlorous acid, a macrophage product, induces endothelial apoptosis and tissue factor expression: involvement of myeloperoxidase-mediated oxidant in plaque erosion and thrombogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 (7): 1309–1314. 2004.

158. TSURUBUCHI, T., ARATANI, Y., MAEDA, N., KOYAMA, H. Retardation of early-onset PMA-induced apoptosis in mouse neutrophils deficient in myeloperoxidase. *J. Leukoc. Biol.* 70 (1): 52-58. 2001.
159. ENGLERT, R. P., SHACTER, E. Amino acyl chloramines mediate hypochlorous acid-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277 (23): 20518–20526. 2002.
160. SCHRECK, R., ALBERMANN, K., BAEUERLE, P. A. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic. Res. Commun.* 17 (4): 221-37. 1992.
161. JANTSCHKO, W., FURTMULLER, P.G., ZEDERBAUER, M., NEUGSCHWANDTNER, K., LEHNER, I., JAKOPITSCH, C., ARNHOLD, J., OBINGER, C. Exploitation of the unusual thermodynamix properties of human myeloperoxidase in inhibitor design. *Biochem. Pharmacol.* 69: 1149–1157. 2005.
162. WINTERBOURN, C. C., KETTLE, A. J. Reactions of myeloperoxidase with superoxide and hydrogen peroxide: significance for its function in the neutrophil. *Basic Life Sci.* 49: 823–827. 1988.
163. KETTLE, A. J., CANDAEIS, L. P. Oxidation of tryptophan by redox intermediates of myeloperoxidase and inhibition of hypochlorous acid production. *Redox Rep.* 5: 179–184. 2000.
164. CHIANG, C. L., LEDERMANN, J. A., RAD, A. N., KATZM D. R., CHAIN, B. M. Hypochlorous acid enhances immunogenicity and uptake of allogeneic ovarian tumor cells by dendritic cells to cross-prime tumor-specific T cells. *Cancer. Immunol. Immunother.* 55 (11): 1384-1395. 2006.
165. ODOBASIC, D., KITCHING, A. R., SEMPLE, T. J., HOLDSWORTH, S. R. Endogenous Myeloperoxidase Promotes Neutrophil-Mediated Renal Injury, but Attenuates T Cell Immunity Inducing Crescentic Glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18: 760–770. 2007.
166. NICHOLLS, S. J., ZHENG, L., HAZEN, S. L. Formation of Dysfunctional High-Density Lipoprotein by Myeloperoxidase. *Trends Cardiovasc. Med.* 15: 212–219. 2005.
167. KUTTER D., DEVAQUET, P., VANDERSTOCKEN G., PAULUS J. M., MARCHAL V., GOTHOT A. Consequences of total and subtotal myeloperoxidase deficiency: risk or benefit? *Acta. Haematol.* 104: 10-15. 2000.
168. DAUGHERTY, A., DUNN, J. L., RATARI, D. L., HEINECKE, J. W. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.* 94 (1): 437-444. 1994.
169. HEINECKE, J. W. Oxidative stress: new approaches to diagnosis and prognosis in atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 91: 12A-16A. 2003.
170. SPICKETT, C. M., JERLICH, A., PANASENKO, O. M., ARNHOLD, J., PITT, A. R., STELMASZYNSKA, T., SCHAUR, R. J. The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids. *Acta, Biochem. Pol.* 47: 889-899. 2000.
171. ZHANG, R., BRENNAN, M. L., FU, X., AVILES, R. J., PEARCE, G. L., PENN, M. S., TOPOL, E. J., SPRECHER, D. L., HAZEN, S. L. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA.* 286: 2136-2142. 2001.

172. BALDUS, S., HEESCHEN, C., MEINERTZ, T., ZEIHNER, A. M., EISERICH, J. P., MUNZELT., SIMOONS, M. L., HAMM, C. W. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 108: 1440-1445. 2003.
173. BRENNAN, M. L., PENN, M. S., VAN LENTE, F., NAMBI, V., SHISHEHBOR, M. H., AVILES, R. J., GOORMASTIC, M., PEPOY, M. L., MCERLEAN, E. S., TOPOL, E. J., NISSEN S. E., HAZEN, S. L. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N. Engl. J. Med.* 349: 1595-1604. 2003.
174. HARDY, R.R., HAYAKAWA, K., HAAIJMAN, J., HERZENBERG, L.A. B-cell subpopulations identified by two-color fluorescence analysis. *Nature*. 297: 589-591. 1982.
175. HERZENBERG, L. A., STALL, A. M., LALOR, P. A. SIDMAN, C., MOORE, W. A., PARKS, D. R., HERZENBERG, L. A. The LY-1 B cell lineage. *Immunol. Rev.* 93: 81-102. 1986.
176. MARCOS, M. A., HUETZ, F., PEREIRA, P., ANDREU, J. L., MARTINEZ, A. C., COUTINHO, A., Further evidence for coelomic-associated B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 19: 2031-2-35. 1989.
177. SCHLEICHER, U., HESSE, A., BODGAN, C. Minute numbers of contaminat CD8+ T cells or CD11b+ CD11c+ NK cells are the source of IFN-gamma in IL-12 IL-18-stimulated mouse macrophage populations. *Blood*. 105: 1319-1328. 2005.
178. COHN, Z.A., BENSON, B. The differentiation of mononuclear phagocytes. Morphology, cytochemistry, and biochemistry. *J. Exp. Med.* 121: 153-170. 1965.
179. VAN FURTH, R., CHON, Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp Med.* 128: 415-435. 1968.
180. AUSTYN, J. M., GORDON, S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur. J. Immunol.* 11: 805-815. 1981.
181. HIRSCH, S., AUSTYN, J. M., GORDONS, S., Expression of the macrophage-specific antigen F4/80 during differentiation of mouse bone marrow cells in culture. *J. Exp. Med.* 154: 713-725. 1981.
182. LIN, H. H., FAUNCE, D. E., STACEY, M. TERAJEWICZ, A., NAKAMURA, T., ZHANG-HOOVER, J., KERLEY, M., MUCENSKI, M. L., GORDON, S., STEIN-STREILEIN, J. The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *J. Exp. Med.* 210: 1615-1625. 2005.
183. GHOSN, E. E. B., CASSADO, A. A., GOVONI, G. R., FUKUHARA, T., YANG, Y., MONACK, D. M., BORTOLUCI, K. R., ALMEIDA, S. R., HERZENBERG, L. A., HERZENBERG, L. A. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *PNAS*. 107 (6): 2568-2573. 2010..
184. HAYAMA, K., HARDY, R.R., PARKS, D.R., HERZENBERG, L.A. The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodefective, and autoimmune mice. *J. Exp. Med.* 157: 202-218. 1983.
185. HARDY, R.R., HAYAKAWA, K., HERZENBERG, L.A., MORSE, H.C, DAVIDSON, W.F., HERZENBERG, L.A. Ly-1 as a differentiation antigen on normal and neoplastic B cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 113: 231-236. 1984

186. HAYAKAWA, K., HARDY, R.R., HONDA, M., HERZENBERG L.A., STEINBERG, A.D., HERZENBERG, L.A. LY-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81: 2492-2498. 1984.
187. HARDY, R.R. B-1 B cells: development, selection, natural auto-antibody and leukemia. *Curr. Opin. Immunol.* 18: 547-555. 2006
188. HARDY, R.R. Development of murine B cell subpopulations. *Semin. Immunol.* 2: 197-206. 1990.
189. HARDY, R.R., CARMACK, C.E., LI, Y.S., HAYAKAWA, K. Distinctive developmental origins and specificities of murine CD5+ B cells. *Immunol. Rev.* 137: 91-118. 1994.
190. HARDY, R.R., HAYAKAWA, K. CD5 B cells, a fetal B cell lineage. *Adv. Immunol.* 55: 297-339. 1994.
191. TUNG, J.M., HERZENBERG, L.A. Unravelling B-1 progenitors. *Curr. Opin. Immunol.* 19: 150-155. 2007.
192. KANTOR, A.B., STALL, A.M., ADAMS, S., WATANABE, K., HERZENBERG, L.A. De novo development and self-replenishment of B cells. *Int. Immunol.* 7 55-68. 1995.
193. HARDY, R.R. B-1 B cell development. *J. Immunol.* 177: 2749-2754. 2006.
194. HERZENBERG, L.A. B-1 cells: the lineage question revised. *Immunol. Rev.* 175: 9-22. 2000.
195. CASOLA, S. Control of peripheral B-cell development. *Curr. Opin. Immunol.* 19: 143-149. 2007.
196. LOPES-CARVALHO, T., FOOTE, J., KEARNEY, J. F. Marginal zone B cells in lymphocyte activation and regulation. *Curr. Opin. Immunol.* 17: 244-250. 2005.
197. WORTIS, H. H., TEUSTSCH, M. HIGER, M., ZHENG, J., PARKER, D. C. B-cell activation by crosslinking of surface IgM or ligation of CD40 involves alternative signal pathways and results in different B-cell phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 3348-3352. 1995.
198. TEUSTSCH, M. M HIGER, M., WANG, D., WORTIS, H. W. Induction of CD5 on B and T cells is suppressed by cyclosporin A, FK-520 and rapamycin. *Int. Immunol.* 7: 381-392. 1995.
199. HAUGHTON, G., ARNOLD, L. W., WHITMORE, A. C., CLARKE, S. H. B-1 cells are made, not born. *Immunol. Today*. 14:84-87, discussion 87-91. 1993.
200. LAM, K. P., RAJEWSKY, K. Rapid elimination of mature autoreactive B cells demonstrated by Cre-induced change in B cell antigen receptor specificity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 13171-13175. 1998.
201. LAM, K. P., RAJEWSKY, K. B cell antigen receptor specificity and surface density together determine B-1 versus B-2 cell development. *J. Exp. Med.* 190:471-477. 1999.
202. KANTOR, A. B., STALL, A. M., ADAMNS, S., HERZENBERG, L. A., HERZENBERG, L. A. Differential development of progenitor activity for three B-cell lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:3320-3324. 1992.
203. STALL, A. M., ADAMS, S., HERZENBERG, L. A., KANTOR, A. B. Characteristics and development of the murine B-1b (Ly-1 B sister) cell population. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 651:33-43. 1992.

204. KANTOR, A. B., HERZENBERG, L. A. Origin of murine B cell lineages. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 501-538. 1993.
205. MONTECINO-RODRIGUEZ, E., LEATHERS, H., DORSHKIND, K. Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nat. Immunol.* 7: 293-301. 2006.
206. MONTECINO-RODRIGUEZ, E., DORSHKIND, K. New Perspective in B-1 B cell development and function. *Trends Immunol.* 27: 428-433. 2006.
207. HERZENBERG, L. A., TUNG, J. M. B cell lineages: documented at last!. *Nat. Immunol.* 7: 225-226. 2006.
208. GHOSN, E. E. B. Revisando a cavidade peritoneal de camundongos: identificação de novos subtipos funcionais de linfócitos B-1 e macrófagos. 2008. 137p (doutorado em farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
209. AMBROSI, M., CAMERON, N. R., DAVIS, B. G. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *OBC.* 3: 1593-1608. 2005.
210. STAVY, L., TREVES, A. J., FELDMAN, M. Effect of concanavalin A on lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Nature.* 232: 56-58. 1971.
211. DEMAS, G. E. In vivo but not in vitro leptin enhances lymphocyte proliferation in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Gen. Comp. Endocrin.* 166: 314–319. 2010.
212. SEGEL, I.H. Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. New York: Wiley-Interscience, 1975. 957 p. Department of Biochemistry and Biophysics, University of California, Davis, CA.
213. BOYUM, A Isolation of mononuclear cells and granulocytes for human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* V.21, p.77-89, 1968.
214. ROEDERER, M. Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations and caveats. *Cytometry.* 45: 194-205. 2001.
215. LITTLEJOHN, T.K., TAKIKAWA, O., SKYLAS, D., JAMIE, J.F., WALKER, M.J., TRUSCOTT R.J.W. Expression and Purification of Recombinant Human Indoleamine 2, 3-Dioxygenase. *Prot. Exp. Pur.* 19: 22–29. 2000.
216. FLICK, K., AHUJA, S., CHENE, A. BEJARANO, M. T., CHEN, Q. Optimized expression of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 domains in Escherichia coli. *Mal. J.* 3 (50). 2004.
217. PETERSON, A. C., MIGAWA, M. T., MARTIN, M. J., HAMAKER, L. K., CZERWINSKI, K. M., ZHANG, W., AREND, R. A., FISETTE, P. L., OZAKI, Y., WILL, J. A., BROWN, R. R., COOK, J. M. Evaluation of functionalized tryptophan derivatives and related compounds as competitive inhibitors of indoleamine 2, 3 dioxygenase. *Med. Chem. Res.* 3: 531–544. 1994.
218. TAN, D. X., MANCHESTER, L. C., BURKHARDT, S., SAINZ, R. M., MAYO, J. C., KOHEN, R., SHOHAMI, E., HUO, Y. S., HARDELAND, R., REITER, R. J. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J.* 15 (12): 2294-2296. 2001

219. YAMASAKI, N., TSUJITA, T., SAKIYAMA, F., MASUDA, N. Preferential acid-actalyzed hydrolysis of the formamide linkage of n-formylkynurenine in frozen solutions. *J. Biochem.* 80: 1287-1292. 1976.
220. HIRATA, F., HAYAISHI, O. Studies on Indoleamine 2, 3-dioxygenase I. SUPEROXIDE ANION AS SUBSTRATE. *JBC.* 250 (15): 5960-5966. 1975.
221. COWEN, P. J., PARRY-BILLINGS, M., NEWSHOLME, E. A. Decreased plasma tryptophan levels in major depression. *J. Affect. Disord.* 16: 27-31. 1989.
222. WERNER, E.R., WERNER-FELMAYER, G. Substrate and cofactor requirements of indoleamine 2,3-dioxygenase in interferon gamma-treated cells: utilization of oxygen rather than superoxide. *Curr. Drug Metabol.* 8: 91-107. 2007.
223. CARRILLO-VICO, A., CALVO, J. R., ABREU, P., LARDONE, P. J., GARCIA-MAURIÑO, S., REITER, R. J., GUERRERO, J. M. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.* 18 (3): 537-539. 2004.
224. GHOSN, E.E.B., YANG, Y., TUNG, J., HERZENBERG, L.A. AND HERZENBERG, L.A. CD11b expression distinguishes sequential stages of peritoneal B-1 development. *PNAS.* 105 (13): 5195-5200. 2008.
225. GOMES, M. M. Dietilamida do ácido lisérgico (LSD) e *N,N*-dimetiltryptamina (DMT) como substratos de peroxidases: uma possível rota de metabolização. São Paulo, 2008. 102p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
226. MURAO, S. I., STEVENS, F. J., ITO, A., HUBERMAN, E. Myeloperoxidase: a myeloid cell nuclear antigen with DNA-binding properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 1232-1236. 1988.
227. SCHIEVEN, G. L., FEX, H., STEPHENSON, L. Hypochlorous acid activates tyrosine phosphorylation signal pathways leading to calcium signaling and TNF α production. *Antioxid. Redox Signal* 4: 501-507. 2002.
228. SCHOONBROODT S., LEGRAND-POELS, S., BEST-BELPOMME, M., PIETTE, J. Activation of the NF-kappaB transcription factor in T-lymphocytic cell line by hypochlorous acid. *Biochem. J.* 321: 777-785. 1997.
229. GREYER-BECK, S. , OLAIZOLA-HORN, S., SCHMITT, H., GREWE, M., JAHNKE, A., JOHNSON, J. P., BRIVIBA, K., SIES, H., KRUTMANN, J. Activation of transcription factor AP-2 mediates UVA radiation- and singlet oxygen-induced expression of the human intercellular adhesion molecule 1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 14586–14591. 1996.
230. CASTAÑEDA, V. L., PARMLEY, R. T., PINNIX, I. B., RAJU, S. G., GUZMAN, G. S., KINKADE, J. M. JR. Ultrastructural, immunochemical, and cytochemical study of myeloperoxidase in myeloid leukemia HL-60 cells following treatment with succinylacetone, an inhibitor of heme biosynthesis. *Exp Hematol.* 20 (7): 916-24. 1992.
231. Hirose, Y., Takiguchi, T., Konda, S., Konishi, F., Sanada, A., Nakagawa, T. Enzyme histochemical, immuno histochemical and electron microscopic studies of two cases of leukemic malignant histiocytosis. *Int J Hematol.* 54 (2): 125-35. 1991

232. LAU, D., MOLLNAU, H., EISERICH, J. P., FREEMAN, B. A., DAIBER, A., GEHLING, U. M., BRUMMER, J., RUDOLPH, V., MUNZEL, T., HEITZER, T., MEINERTZ, T., BALDUS, S. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102: 431-436. 2005.
233. JOHANSSON, M. W., PATARROYO, M., OBERG, F., SIEGBAHN, A., NILSSIN, K. Myeloperoxidase mediates cell adhesion via the alpha M beta 2 integrin (Mac-1, CD11b/CD18). *J. Cell. Sci.* 110: 1133-1139. 1997.
234. HYSTAD, M. E., MYKLEBUST, J. H., BØ, T. H., SIVERTSEN, E. A., RIAN, E., FORTANG, L., MUNTHE, E., ROSENWALD, A., CHIORAZZ, M., STAUDT, L. M., SMELAND, E. B. Characterization of early stages of human B cell development by gene expression profiling. *J. Immunol.* 179 (6): 3662-3671. 2007.
235. MIRRO, J., ZIPF, T. F., PUI, C.H., KITCHINGMAN, G., WILLIAMS, D., MELVIN, S., MURPHY, S. B., STASS, S. Acute mixed lineage leukemia: clinicopathologic correlations and prognostic significance. *Blood*. 66: 1115-1123. 1985.
236. CONLIN, P. A., ORDEN, M. B., HOUGH, T. R., MORGAN, D. L. Myeloperoxidase-positive intravascular large B cell lymphoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 125: 948-950. 2001.
237. HU, Z-B., MA, W., UPHOFF, C. C., METGE, K., GIGNAC, S. M., DREXLER, H. G. Myeloperoxidase: expression and modulation in a large panel of human leukemia-lymphoma cell lines. *Blood*. 82 (5): 1599-1607. 1993.
238. GHOSH, E. E. B., RUSSO, M., ALMEIDA, S. R. Nitric oxide-dependent killing of *Cryptococcus neoformans* by B-1 derived mononuclear phagocyte. *J. Leukoc. Biol.* 80: 36-44. 2006.
239. LE, J., VILCEK, J., SAXINGER, C., PRENSKY, W. Human T cell hybridomas secreting immune interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 79 (24): 7857-7861. 1982.
240. YIP, Y. K., PANG, R. H., OPPENHEIM, J. D., NACHBAR, M. S., HENRIKSEN, D., ZEREBECKYJ-ECKHARDT, I., VILCEK, J. Stimulation of human gamma interferon production by diterpene esters. *Infect. Immun.* 34 (1): 131-139. 1981.
241. WERNER-FELMAYER, G., WERNER, E. R., FUCHS, D., HAUSEN, A., REIBNEGGER, G., WACHTER, H. Neopterin formation and tryptophan degradation by a human myelomonocytic cell line (THP-1) upon cytokine treatment. *Cancer Res.* 50 (10): 2863-2867. 1990.
242. SANTOSO, D. I., ROGERS, P., WALLACE, E. M., MANUELPIILLAI, U., WALKER, D., SUBAKIR, S. B. Localization of indoleamine 2,3-dioxygenase and 4-hydroxynonenal in normal and pre-eclamptic placentae. *Placenta*. 23 (5): 373-379. 2002.
243. NISAPAKULTORN, K., MAKRUPTHONG, J., SA-ARD-IAM, N., RERKYEN, P., MAHANONDA, R., TAKIKAWA, O. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression and regulation in chronic periodontitis. *J. Periodontol.* 80 (1): 114-121. 2009.
244. NIGG, E. A. Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature*. 386 (6627): 779-87. 1997.
245. BABAN, B., HANSEN, A. M., CHANDLER, P. R., MANLAPAT, A., BINGAMAN, A., KAHLER, D. J., MUNN, D. H., MELLOR, A. L. A minor population of splenic dendritic cells expressing CD19

mediates IDO-dependent T cell suppression via type I IFN signaling following B7 ligation. *Int Immunol.* 17 (7): 909-919. 2005.

246. CURRELI, S., ROMERIO, F., MIRANDOLA, P., BARION, P., BEMIS, K., ZELLA, D. Human primary CD4 + T cells activated in the presence of IFN-alpha 2b express functional indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Interferon Cytokine Res.* 21 (6): 431-437. 2001.

Apêndice

Localização da enzima mieloperoxidase em neutrófilos, monócitos e linfócitos humanos de sangue periférico

Este estudo mostrou uma possível regulação entre as vias de oxidação de MLT e de TRP. Também observamos a localização das enzimas MPO e IDO em células de peritônio de camundongos controle e ativados com Con A e encontramos MPO em linfócitos, fato este não relatado anteriormente. Estudamos a possibilidade de trabalhar com células humanas isoladas para confirmar a presença de MPO em linfócitos. Até o momento obtivemos resultados de microscopia confocal, e resultados preliminares de Western blotting, RT-PCR e microscopia eletrônica de transmissão.

Na microscopia confocal, verificamos a localização de MPO em neutrófilos, monócitos e linfócitos humanos obtidos de sangue periférico. Em neutrófilos observamos uma marcação de MPO localizada próxima a membrana plasmática e com aparência granular (figura 1). Já a localização desta enzima em monócitos parece ser difusa estando por todo o citoplasma. A intensidade de marcação de MPO em monócitos é menor quando comparadas aos neutrófilos (figura 2). Nesta mesma imagem encontramos algumas células semelhantes aos linfócitos e estas também estavam marcadas para MPO. A marcação aparenta de baixa intensidade e dispersa pelo citoplasma.

Figura 1: Imunodeteção de MPO em neutrófilos humanos de sangue periférico. Utilizamos anticorpo anti MPO (1:100), e um secundário específico (1:100) marcado com FITC que fluoresce em 518nm (ciano) para ser analisado em microscópio confocal. O núcleo está marcado com DAPI. As microscopias representam 2 campos diferentes.

Figura 2: Imunodeteção de MPO em monócitos e linfócitos humanos de sangue periférico. Utilizamos anticorpo anti MPO (1:100), e um secundário específico (1:100) marcado com FITC que fluoresce em 518nm (ciano) para ser analisado em microscópio confocal. O núcleo está marcado com DAPI. As microscopias representam 2 campos diferentes.

Frente às evidências encontradas até o momento, realizamos outros experimentos para confirmar a presença de MPO em linfócitos. Primeiramente, verificamos a expressão do RNAm desta enzima em linfócitos, monócitos e neutrófilos. Surpreendentemente, as

três células apresentaram RNAm para MPO (figura 3).

Figura 3: Presença de RNAm de MPO em neutrófilos, monócitos e linfócitos humanos de sangue periférico, detectados por RT-PCR.

Em seguida analisamos a presença da proteína nestas três células por *Western blotting*. Encontramos MPO novamente nas três células, mas as intensidades das bandas estavam diferentes (figura 4). Avaliando as bandas observamos que neutrófilos apresentaram mais MPO do que monócitos e este por sua vez mais que linfócitos (neutrófilos > monócitos > linfócitos).

Figura 4: Presença da proteína MPO em neutrófilos, monócitos e linfócitos humanos de sangue periférico detectados por Western blot.

Realizamos ensaios de citometria de fluxo para verificar em qual população de linfócitos teríamos a MPO. Não foi possível verificar uma marcação confiável para estas células, mas planejamos dar continuidade ao estudo de população que expressa MPO.

(dados não mostrados).

Avaliamos os neutrófilos, monócitos e linfócitos humanos por microscopia eletrônica de transmissão (figura 5). Primeiramente adquirimos as imagens sem as marcações para observarmos as condições de fixação e coloração das amostras. Observamos que as amostras foram bem conservadas e contra coradas. A morfologia das células estavam bem próxima aos encontrados na literatura.

Figura 5: Microscopia eletrônica de transmissão de células de sangue periférico humano. **A)** residentes e **B)** ativadas com Con A (15 µg). Barra de escala 2 µm.

Em seguida realizamos as marcações para MPO + ouro coloidal de 10 nm. As imagens e as marcações ainda necessitam de ajustes, entretanto foi possível verificar uma pequena marcação de MPO tanto em neutrófilos quanto em monócitos.

Em neutrófilos, encontramos MPO no citoplasma, em vesículas e no núcleo. Não observamos nenhuma marcação em mitocôndria (figura 6).

Figura 6: Microscopia eletrônica de transmissão de neutrófilo humano coletado de sangue marcado com ouro coloidal para MPO. Há marcação em vesículas (V, seta grossa cinza), no citoplasma (seta grossa preta) e no núcleo (N, seta fina preta). Barra de escala 0,2 μ m

Em monócitos, encontramos a MPO nos mesmos locais encontrados em neutrófilos, no citoplasma, em vesículas e no núcleo. Não encontramos novamente marcação em mitocôndria (figura 7).

Figura 7: Microscopia eletrônica de transmissão de monócito humano coletado de sangue marcado com ouro coloidal para MPO. Há marcação em vesículas (V, seta grossa cinza), no citoplasma (seta grossa preta) e no núcleo (N, seta fina preta). Barra de escala 0,2 μ m

A localização de MPO em neutrófilos e em monócitos já foi relatada anteriormente. Estamos utilizando estas células para padronizar um melhor ensaio para a análise de linfócitos. Ainda não foi possível avaliar a presença de MPO em linfócitos humanos, pois mesmo em células que sabidamente apresentam grandes quantidades de MPO não conseguimos visualizar boas marcações para esta imunocitoquímica.

Os resultados apresentados neste apêndice, juntamente com os dados apresentados nesta tese, apontam para a expressão e presença de MPO em linfócitos. Este fato é surpreendente, uma vez que não há nenhum relato de MPO em linfócitos maduros tanto em camundongo como em humano.