UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia Área de Análises Clínicas

Atividade de Mieloperoxidase e produção de oxigênio singlete em neutrófilos e células monocíticas

Wilton Antonio da Silva Cruz

Dissertação para obtenção de grau de

MESTRE

Orientadora: Profa. Tit. Dra. Ana Campa

São Paulo 2010

ÍNDICE

1	וNT 1.1	RODUÇÃO Leucócitos Polimorfonucleares e Mononucleares	9 10
	1.2	Sistema NADPH oxidase	12
	1.3	Mieloperoxidase	14
	1.4	Formação de oxigênio singlete	15
2	Ob	jetivos	19
	2.1	Objetivo geral:	19
	2.2	Objetivos específicos:	20
3	Pro 3.1	otocolo Experimental Casuística	20 20
	3.2	Critérios de exclusão	21
	3.3	Preparação de estímulos	21
	<i>PI</i> / 3.4	IA: Isolamento de neutrófilos humanos de sangue periférico	22 22
	3.5	Isolamento de células mononucleares e monócitos humanos de	
	sang	ue periférico	23
	3.6	Quimiluminescência amplificada por luminol e lucigenina ("Burst"	
	oxida	tivo)	24
	3.7	Utilização do 9,10-difenilantraceno (DPA) como captador químico de	
	¹ O ₂	25	
	3.8	Detecção indireta de ¹ O ₂ em fagócitos: macrófagos, células dendrític	as
	e neu	trófilos através do captador químico ABPE	25
	3.9	Obtenção de imagens por microscopia confocal	27
	3.10	Imunofenotipagem de linfócitos humanos por citometria de fluxo	
	(FAC	S)	27
4	RE 4.1	SULTADOS E DISCUSSÃO Detecção de ¹ O ₂ em fagócitos através do captador químico 9,10-	29
	difeni	lantraceno (DPA)	29
	Foi ZO	rmação dos padrões de DPA e seu endoperóxido DPAO ₂ , marcação d com DPA e avaliação de eficiência de extração:	le 29
	H.Z	remanya de avallação da produção de "O2 em ledoucilos allaves da	21
		yao uo DEA ausorviuo en 20 e monitoriado por Π EC	JI
4.3 Monitorização da produção de O_2 em neutrofil			07
		Scopia confocal e quimiluminescencia	31
	4.4	Detecção de 'O ₂ atraves da sonda ABPE	46

	4.5	Determinação de MPO em linfócitos	51
5	Co	nclusões	55
6	Re	ferências	57

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABPE éster 9,10-antracenil-3-bispropionato de etila
- ACN acetonitrila
- DC células dendríticas
- DPA 9,10-difenilantraceno
- ERO espécies reativa de oxigênio
- H₂O água
- H₂O₂₋ peróxido de hidrogênio
- HOCL ácido hopocloroso
- HPLC high performance liquid chromatograpphyt (cromatografia líquida de
- IFN γ Interferon gama γ
- IL interleucina
- MPÒ mieloperoxidase
- MEL melatonina
- NAD + nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NADPH nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
- ¹O₂ oxigênio singlete
- O2- oxigênio molecular
- O^{2.-} ânion superóxido
- PMA acetato de forbol miristato
- PBMC peripheral blood mononuclear cells
- PBS tampão fostato salina
- UV ultravioleta
- VIS visível

Atividade de Mieloperoxidase e produção de oxigênio singlete em neutrófilos e células monocíticas

A enzima mieloperoxidase (MPO), presente em leucócitos da linhagem granulocítica e monocítica, tem papel fundamental na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Existem fortes evidências que alguns produtos gerados a partir de reações catalisadas por mieloperoxidase (MPO) tenham papel na sinalização celular. Dentre estes produtos, chama atenção o oxigênio singlete (¹O₂). Em fagócitos, esta ERO poderia participar tanto do processo de morte de patógenos, quanto da sinalização de eventos da inflamação. O nosso grupo de pesquisa trabalha com a hipótese de que a localização da MPO, e consequentemente, os sítios de produção de ¹O₂ definem a função da enzima e do ¹O₂. O interesse particular no ¹O₂ deve-se também ao fato de que sua detecção não é trivial e relativamente pouco é conhecido sobre sua produção por sistemas biológicos se comparado a outras EROs. Neste estudo trabalhamos com a questão da localização de MPO em neutrófilos e monócitos humanos e com a detecção de ¹O₂ através da utilização de sondas específicas. Nos experimentos realizados avaliamos a produção de ¹O₂ pela utilização da sonda 9,10 difenilantraceno (DPA) e também empregando o éster 9,10antracenil-3-bispropionato de etila (ABPE) como captador de ¹O₂. Apesar da proposta de uso do DPA revestindo partículas a serem fagocitadas ter sido feita anteriormente (Garcia F., mestrado concluído em 2006) houve dificuldades na utilização desta técnica que foram reconsideradas neste trabalho. Com esta sonda também obtivemos imagens em microscopia confocal, através da fluorescência do DPA e perda desta fluorescência após reação com ¹O₂. As análises dos resultados com a microscopia confocal em neutrófilos confirmam que ¹O₂ está sendo realmente formado no fagolissosomo, quando as células são ativadas por partículas opsonizadas. Em monócitos também houve a possibilidade de utilizar DPA como sonda para ¹O₂. Neste caso observamos um decréscimo mais lento da fluorescência quando comparado com neutrófilos e também um apagamento mais difuso da sonda. Acreditamos que as diferenças observadas, na formação de ¹O₂, para neutrófilos e mononucleares em microscopia confocal podem ser devido а diferentes formas de compartimentalização da enzima nestes dois tipos celulares. É possível que isto tenha uma função biológica específica, uma vez que, ¹O₂ parece ser um importante sinalizador no processo inflamatório.

Dado o interesse na detecção de ¹O₂ em células do sistema imune, também utilizamos uma nova sonda, o éster 9,10-antracenil-3-bispropionato de etila (ABPE). A detecção neste caso é feita pelo monitoramento de um endoperóxido por HPLC. Os resultados obtidos com essa nova sonda demonstram-se mais satisfatórios quando comparados ao DPA, permitindo uma melhor detecção da produção de ¹O₂ por fagócitos.

Palavras-Chave: Oxigênio singlete, mieloperoxidase, espécies reativas de oxigênio, neutrófilos, monócitos.

ABSTRACT

Activity of Myeloperoxidase and singlet oxygen production in neutrophils and monocytic cells

The enzyme myeloperoxidase (MPO), present in leukocytes of granulocytic and monocytic lineage, plays a fundamental role in the production of reactive oxygen species (ROS). There is strong evidence that some products generated from reactions catalyzed by myeloperoxidase (MPO) have a role in cell signaling. Among these products, calls attention singlet oxygen $({}^{1}O_{2})$. In phagocytes, ROS could participate in this process both the death of pathogens, the signaling events of inflammation. Our research group works on the assumption that the location of the MPO, and consequently, the production sites to define the role of ${}^{1}O_{2}$ and ${}^{1}O_{2}$ enzyme. The particular interest in the ${}^{1}O_{2}$ is also due to the fact that its detection is not trivial and relatively little is known about its production by biological systems compared to other ROS. In this study we worked with the question of localization of MPO in human neutrophils and monocytes and the detection of ${}^{1}O_{2}$ by using specific probes. In the experiments we evaluated the production of ${}^{1}O_{2}$ by use of a probe 9.10 difenilantraceno (DPA) and also using the 9.10-ester antracenil bispropionato-3-acid ethyl esters (ABPE) ${}^{1}O_{2}$ as a pickup. Although the proposed use of the DPA coating particles to be phagocytized have been made previously (F. Garcia, MA completed in 2006) hove difficulties in using this technique have been

reconsidered in this work. With this probe also obtained images in confocal microscopy, by fluorescence of DPA and loss of fluorescence after reaction with $^{1}O_{2}$. The analysis of results with confocal microscopy confirmed that in neutrophils ¹O₂ is actually being formed in fagolissosomo, when cells are activated by opsonized particles. Monocytes were also able to use DPA as a probe to ¹O₂. In this case we observe a slower decrease in fluorescence when compared with neutrophils and also a more diffuse effacement of the probe. We believe that the observed differences in the formation of ¹O₂ for neutrophils and mononuclear cells in confocal microscopy may be due to different forms of compartmentalization of the enzyme in these two cell types. It is possible that this has a specific biological function, since, ¹O₂ seems to be an important sign in the inflammatory process. Given the interest in the detection of ¹O₂ cells of the immune system, also used a new probe, the 9.10-ester antracenil bispropionato-3-acid ethyl esters (ABPE). The detection in this case is made by an endoperoxide monitoring by HPLC. The results obtained with this new probe show is more satisfactory when compared to the DPA, allowing better detection of ${}^{1}O_{2}$ production by phagocytes.

Keywords: Singlet oxygen, myeloperoxidase, reactive oxygen species, neutrophils, monocytes.

1 INTRODUÇÃO

O sistema imune compreende em uma complexa rede de células importantes na manutenção da homeostasia. Estas células, tais como leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos, células NK (natural killer) e células dendríticas, são ativadas quando microorganismos patogênicos conseguem romper as barreiras naturais de proteção. Funcionalmente, estas células formam a primeira linha de defesa do hospedeiro contra microorganismos invasores. Complementando a frente de resistência a patógenos estão os linfócitos que permitem ao sistema imune responder a um vasto número de antígenos introduzidos em qualquer parte do organismo.

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

A atividade microbicida está, entre outros fatores, associada ao sistema NADPH oxidase que gera espécies reativas de oxigênio (EROs), participando tanto da morte de microorganismos invasores como de danos a tecidos do hospedeiro. Além de efeitos deletérios, a participação de EROs tem sido proposta na sinalização de várias vias ativas na inflamação (Akki A, et al, 2009).

Na vigência de um processo inflamatório, fagócitos são atraídos para o local da inflamação através da liberação de substâncias vasoativas, interleucinas e fatores quimiotáticos do local da lesão para a corrente sanguínea, o que induz o aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade capilar e transmigração de células sanguíneas para a região da lesão (Cotran et al., 1996). Portanto, a inflamação é fundamentalmente uma resposta de proteção, com o objetivo de debelar a causa inicial da agressão celular. Linfócitos T são conhecidos por amplificar a resposta inflamatória através da secreção de citocinas, incluindo interferon- γ (IFN- γ), IL-2, IL-4, IL-17, e fatores estimulantes de colônias de granulócitos e macrófagos. Estas estimulam a quimiotaxia de neutrófilos e monócitos para sítios de lesões. (Ikuta, K., N., Uchida, J. Friedman, and I. L., Weissman. 1992)

Dada a vital importância de neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos, é interessante um estudo que vise o conhecimento de funções especializadas destas células no processo inflamatório. Neste sentido focamos nosso interesse na atividade e localização de MPO e geração de (¹O₂) nestes tipos celulares com o intuito de elucidar questões que envolvem o processo inflamatório.

1.1 Leucócitos Polimorfonucleares e Mononucleares

As células dos sistemas fagocíticos mononuclear e polimorfonuclear, assim como todas as células sanguíneas, originam-se na medula óssea a partir de uma célula primordial pluripotente, a *stem cell*, que se diferencia em células progenitoras de linhagens específicas, em resposta a ação de interleucinas específicas presentes no microambiente medular. Uma das vias de diferenciação originará as células fagocíticas mononucleares. (Dale, D.C., Boxer, L. and Liles, W.C., 2008)

O monócito tem uma vida média na circulação de aproximadamente um a três dias, passando depois aos tecidos onde se diferencia em macrófago (Van Furth, 1985; Gordon et al., 1986). Durante o processo de maturação, onde monócitos diferenciam-se em macrófagos, estes adquirem um conteúdo importante em vesículas lisossomais, além de microfibrilas e microtúbulos que dão grande mobilidade e promovem a atividade fagocitária.

Células dendríticas possuem um papel muito importante tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. É um dos mais potentes apresentadores de antígenos, por apresentar um mecanismo especial de captura e processamento de antígenos. Também têm uma capacidade única de migrar para locais específicos nos órgãos linfóides, em especial as áreas onde estão as células T. Essas propriedades tornam as células dendríticas importantes agentes no combate a patógenos. (Agrawal A. 2007). Experimentos in vitro mostram que monócitos diferenciam-se em células dendríticas na presença de GM-CSF ou GM-CSF e IL-4. In vivo, parece que um estímulo fagocítico é um dos sinais para a diferenciação de monócitos em células dendríticas. Também é possível que os macrófagos residentes, ao liberarem GM-CSF, induziriam a formação de células dendríticas (Lehtonen A. 2007).

Já outra via de diferenciação originará a linhagem granulocítica, que são os precursores dos PMN segmentados circulantes. Estas células possuem os grânulos azurófilos que contém toda MPO celular, proteínas catiônicas de baixo

11

peso molecular, hidrolases ácidas e proteases neutras (Dewald e Baggiolini, 1986).

Os linfócitos, importantes células do sistema imune, são produzidos nos órgãos linfóides primários (timo e medula óssea), em grandes quantidades. Algumas destas células migram, através da circulação, para os tecidos linfóides secundários (baço, linfonodos) onde são responsáveis pelo reconhecimento imune específico dos patógenos e pelo desencandeamento das respostas imunes adaptativas. O adulto humano normal possui aproximadamente 10¹² células linfóides que perfazem 20% da população leucocitária circulante. As duas principais categorias de linfócitos compreende os linfócitos T (Th₁ e Th₂) e linfócitos B.((Ikuta, K., N., Uchida, J. Friedman, and I. L., Weissman. 1992)

Enquanto a localização de mieloperoxidase em neutrófilos é bem conhecida, o mesmo não é verdade para monócitos e macrófagos. Em relação a células dendríticas e linfócitos se tem poucos estudos a respeito.

1.2 Sistema NADPH oxidase

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são geradas por um processo denominado "burst" oxidativo, decorrente da ativação do sistema NADPH oxidase que reduz o oxigênio molecular a ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). A ativação do complexo enzimático NADPH oxidase é induzida *in vivo* por bactérias, fungos, vírus e seus produtos e imunocomplexos e, *in vitro*, principalmente por estímulos opsonizados e pelo mitógeno acetato de forbol miristato (PMA). O consumo de oxigênio passa a ser de duas a vinte vezes maior que o consumo basal, dependendo da célula e da natureza do estímulo.

Este sistema enzimático multicomponente é composto de duas proteínas trans-membrana (p22phox e gp91phox/NOX2, que formam o citocromo b558),

três proteínas citosólicas (p47phox, p67phox, p40phox) e um GTPase (Rac1 ou Rac2), que reúnem em sítios da membrana após a ativação celular. A ativação da NADPH oxidase em fagócitos pode ser induzida por um grande número de fatores particulados e solúveis. Três grandes eventos acompanham a ativação da NAPDH oxidase: (1) fosforilação de proteínas, (2) ativação da GTPase, e (3) translocação de componentes citosólicos da membrana plasmática para a forma ativa da enzima. (Figura 1) (El-Benna, J.; Dang, P.; Gougerot-Pocidalo M.A. 2008)



Figura 1: Organização do sistema NADPH oxidase quando fagócitos são estimulados

Uma vez ativo o sistema multienzimático NADPH oxidase é responsável pela transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio molecular, formando o O₂⁻⁻. Além da transferência de elétrons, o sistema NADPH oxidase é responsável pela passagem de H⁺ e outros cátions, especialmente K⁺, para o interior do fagolisossoma (Reeves, Lu et al. 2002). O O₂⁻⁻ tem pouca atividade

microbicida (Winterbourn, Vissers et al. 2000), entretanto origina EROs mais potentes como o peróxido de hidrogênio.

1.3 Mieloperoxidase

MPO é uma hemeproteína altamente expressa em promielócitos. A medida que estas células vão se diferenciando em linhagens granulocíticas e monocíticas, a expressão diminui. A MPO representa 5% do peso seco de neutrófilos e, como dito anteriormente, é o maior constituinte dos grânulos azurófilos citoplasmáticos (Klebanoff, 2005). Os monócitos contêm cerca de um terço do conteúdo de MPO quando comparados a neutrófilos. Quando monócito se diferencia a macrófago *in vivo* ou *in vitro* este conteúdo é perdido, entretanto, trabalhos recentes mostram que o gene da MPO pode ser reativado em algumas condições, tais como a preservação da atividade de MPO fazendo-se o uso de GM-CSF em macrófagos provenientes da diferenciação de monócitos *in vitro*.

Embora a produção de HOCI tenha sido considerada como a principal função de MPO, atualmente se reconhece que MPO pode ter uma participação mais ampla na bioquímica dos neutrófilos e monócitos. Isto inclui funções mais abrangentes; além de sua atividade microbicida pode ter papel na imunomodulação. Sabe-se, por exemplo, que HOCI além de um potente agente microbicida, também está envolvido na sinalização da apoptose de vários tipos celulares, incluindo células do sistema imune. Além disto, produtos gerados a partir de HOCI (por exemplo, cloraminas [R-NHCI] e ¹O₂) são capazes de ativar a produção de citocinas, assim como ativação de quinases e outras enzimas (Schreck, Albermann et al. 1992). Diante desses fatos se espera que MPO tenha um efeito sinalizador que vai além de seus efeitos microbicida ou regulatório.

Kumar e colaboradores (2004) demonstram em humanos que a localização intracelular de MPO depende da presença de alguns fatores. Por exemplo, quando macrófagos são estimulados com GM-CSF a enzima está dispersa no citosol e região perinuclear, enquanto quando são estimulados por M-CSF, a distribuição é periférica (Kumar, Piecrafita et al. 2004). Assim, é possível que o papel da MPO esteja relacionado com a sua localização na célula.

MPO tem sido correlacionada ainda com alguns dos efeitos deletérios ocorridos durante o processo inflamatório. Neste sentido, MPO poderia catalisar a cloração de proteínas e oxidação de lipídeos e proteínas (Nagra, Becher et al. 1997). Entretanto, trabalhos mais recentes mostraram inesperadamente, que em camundongos deficientes para o gene da MPO, não há diminuição do dano celular.

1.4 Formação de oxigênio singlete

O ${}^{1}O_{2}$ pode ser produzido pela reação de H₂O₂ com o HOCI intermediado por MPO (Figura 2).



Figura 2. Via de formação de espécies reativas de oxigênio por fagócitos

O ¹O₂ destaca-se dentre as espécies ativas de oxigênio capazes de causar danos aos sistemas vivos. Esta espécie é um potente oxidante frente a compostos contendo alta densidade eletrônica. As moléculas alvo *in vivo* incluem proteínas, ácidos nucléicos, além de sistemas organizados como membranas. Tais reações levam, via de regra, a produtos oxidados que perdem suas propriedades gerando disfunções (Bokoch and Knaus 2003; Roos, van Bruggen et al. 2003). Entretanto, sistemas enzimáticos que geram ¹O₂ tem grande importância, visto que estes poderiam atuar como um possível sinalizador celular no caminho que culmina com a modulação da expressão gênica, com funções importantes para a manutenção do sistema celular, além de outras funções na cadeia de produção de ERO.

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

O oxigênio eletronicamente excitado pode apresentar-se em dois estados distintos, ${}^{1}\Delta_{g}$ e o ${}^{1}\Sigma_{g}{}^{+}$, tendo a primeira energia 22 Kcal/mol acima do estado fundamental e vida-média alta (2 a 4 µs em água) e o segundo tendo energia de 37,5 Kcal/mol acima do estado fundamental e vida-média muito menor, decaindo rapidamente para o estado ${}^{1}\Delta_{g}$ (Figura 3). No primeiro e

segundo estado eletronicamente excitado estes elétrons apresentam spins antiparalelos (Foote e Clennan, 1995; Di Mascio et al., 1995).

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

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

Existem estudos que indicam o papel de ${}^{1}O_{2}$ como mensageiro intracelular (Rever referência – Skovsen et al 2005 - Steinbeck et al., 1991; Steinbeck et al., 1993). Assim, por exemplo, foi mostrado que ${}^{1}O_{2}$ tem participação na ativação do fator de transcrição NF- κ B (Ryter e Tyrell, 1998) (Figura 4).



Figura 4. Esquema dos efeitos do oxigênio singlete na modulação da expressão gênica (Klotz 2002).

NF- κ B é um complexo protéico que ativa a transcrição dos genes de citocinas em diversos tipos celulares envolvidos na inflamação e infecção em resposta a vários estímulos como choque térmico por calor, vírus, IL-1, TNF, PMA, luz, UV, H₂O₂, inibidores de proteína quinase e fosfatases (Baeuerle e Henklet, 1994; Khan e Wilson, 1995).

A princípio pode se imaginar que a produção de oxigênio singlete e a localização desta produção em células fagocíticas, incluindo macrófagos, e possívelmente em células dendríticas, definirão seu papel. Como a produção de oxigênio singlete depende de MPO, a localização desta enzima definirá o local de produção do primeiro. É interessante notar que a localização intracelular da MPO é diferente dependendo de sua incubação com diferentes estímulos

(Kumar, Piedrafita, et al, 2004). A localização de MPO em grânulos próximos ao fagolisossoma e a formação de oxigênio singlete no fagolisossoma poderia compor a atividade microbicida da célula, enquanto que a localização perinuclear de MPO e, portanto, de ¹O₂, poderia ser responsável pela produção de moléculas envolvidas na sinalização.

A detecção de ${}^{1}O_{2}$ em sistemas biológicos complexos e células tem sido um desafio. A detecção direta do ${}^{1}O_{2}$ requer equipamento sofisticado e é aparentemente pouco sensível para sistemas biológicos. Uma alternativa seria a detecção indireta através de captadores químicos. O difenilantraceno foi recentemente utilizado na monitoração de ${}^{1}O_{2}$ por neutrófilos após sua incorporação em partículas de zimozan. DPA reage com ${}^{1}O_{2}$ originando DPAO₂ e este pode ser facilmente monitorado por HPLC. Uma utilização extra do DPA é a possibilidade de usá-lo em microscopia confocal. Isto se deve ao DPA ser fortemente fluorescente diferentemente do produto originado de sua reação com ${}^{1}O_{2}$ o DPAO₂.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral:

Nesse trabalho, nosso objetivo principal foi verificar a atividade e localização de MPO e diferenças de atividade peroxidásica e EROs em neutrófilos e células mononucleares, assim como identificar a produção de ¹O₂ através da formação de endoperóxidos com duas sondas captadoras,o 9,10-difenilantraceno (DPA), que também foi utilizada em ensaios de microcospia confocal, e o éster 9,10-antracenil-3-bispropionato de etila (ABPE).

2.2 **Objetivos específicos:**

1 – Padronizar as condições adequadas para a visualização da formação de
¹O₂ em microscopia, através da supressão da fluorescência do DPA, em diferentes tipos celulares (neutrófilos e células monocíticas);

2 – Padronizar as condições adequadas para a determinação da formação de
DPAO₂ em HPLC, como forma de determinação indireta de ¹O₂;

3 – Padronizar as condições para a determinação do endoperóxido AABPO₂
em HPLC resultante da reação do captador químico ABPE com ¹O₂, como forma indireta de detecção desta ERO;

 4 - Padronizar as condições para microscopia utilizando as sondas DPA e ABPE;

5 – Comparar as diferenças de conteúdo de MPO nos diferentes tipos celulares, bem como diferenciar sua atividade, produção de ERO e *Burst* oxidativo;

 6 – A partir dos resultados, analisar as diferenças obtidas entre os diferentes tipos celulares.

3 Protocolo Experimental

3.1 Casuística

Os neutrófilos e as células mononucleares foram obtidos a partir de sangue periférico de 15 (quinze) indivíduos aparentemente saudáveis recrutados entre professores, funcionários e alunos do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da

Universidade de São Paulo. Foram coletados 20 mL de sangue de cada indivíduo (que não precisou estar em jejum no momento da coleta) em tubos plásticos heparinizados. O sangue foi destinado para obtenção de neutrófilos e células mononucleares para as análises descritas a seguir.

Critérios de inclusão

Foram incluídos em nossa pesquisa os voluntários saudáveis com idade entre 20 e 40 anos, independente do sexo, que tenham respondido um questionário relatando que nos últimos trinta dias não tenham apresentado qualquer sinal de processos inflamatórios e infecciosos agudos tais como dores de garganta, fraturas, infecções bacterianas, fúngicas, virais e parasitárias, ou que sejam portadores de doenças inflamatórias crônicas (doenças autoimunes, lupus eritematoso, diabetes mellitus tipo I). Após o preenchimento do questionário os indivíduos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

3.2 Critérios de exclusão

Foi excluída a participação de indivíduos que no questionário elaborado tenham relatado a presença de infecções bacterianas, fúngicas, virais e parasitárias, de inflamação aguda ou crônica.

3.3 **Preparação de estímulos**

Zimosan:

A mistura foi mantida em ebulição por uma hora sob agitação constante e sonicada em quatro ciclos de 15 segundos a 70W. Logo em seguida, a suspensão foi centrifugada a 500 rpm por 5 minutos a 4ºC, lavada 3 vezes com PBS (2000 rpm, 20 min, 4°C), ressuspendida em 50ml de PBS (10mg/ml) e estocada a -70°C.

Opsonização da suspensão de Zimosan:

Utilizamos 6ml de um "pool" de soro fresco com 2ml de zimosan (10mg/ml). A mistura de zimosan e soro foi incubada a 37°C por uma hora com agitação constante. Logo após, centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos a 4°C. O pellet foi lavado três vezes com tampão PBS, após uma última lavagem, o pellet foi ressuspendido em 1,0ml de tampão PBS, as partículas foram contadas em câmara de neubauer e congeladas a -20°C.

PMA:

<u>Estoque I:</u> 1mg de PMA foi dissolvida em 1000 μ L de DMSO e congelado a –10°C e dessecado.

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

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

3.4 Isolamento de neutrófilos humanos de sangue periférico

O sangue foi colhido em tubos plásticos heparinizados (10 U/mL), e posteriormente diluído na proporção 1:1 com PBS 10mM, pH 7,4, filtrado em membrana de poro 0,22µm. A diluição foi colocada sobre 10mL de Histopaque-R (densidade: 10771). O material então foi centrifugado a 2500 rpm à temperatura ambiente por 20 minutos. Ao infranadante serão adicionados 15mL de Dextram 5%, diluído em solução salina 0,9% estéril para sedimentação de eritrócitos. O material foi mantido em banho de por 45 minutos, sendo o sobrenadante e centrifugado a 2500 rpm à temperatura ambiente por 5 minutos.

Infranadante foi submetido á hemólise em 10mL de água com agitação constante por 1 minuto. A isotonicidade foi restabelecida com 5mL de NaCl 2.7% e 15mL de PBS estéril. O material restante foi centrifugado em 2500 rpm à temperatura ambiente por 5 minutos, e o infranadante re-suspendido em 1mL de PBS. A contagem de células totais foi realizada em câmara de Newbauer e a viabilidade celular avaliada com Azul de Tripan 0,1% (Boyum, 1968a, 1968b). As células foram mantidas em banho de gelo até a realização dos ensaios.

3.5 Isolamento de células mononucleares e monócitos humanos de sangue periférico

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

Para o isolamento das células mononucleares foi realizado com procedimento para a separação de monócitos: o pellet foi ressuspendido em 5 mL de RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (solução A); esta solução foi lentamente adicionada a 5 mL de solução B (5mL de RPMI + 4,75mL de Percoll + 0,325mL de PBS 10X). Esta mistura foi centrifugada por 30 minutos, 1500 rpm, 20°C, sem freio. Foi coletado o anel formado de monócitos e o pellet foi desprezado (linfócitos). Ainda procedemos com a purificação dos monócitos obtidos lavando-os com PBS (adição de PBS às células, seguido de centrifugação a 400 g, onde o sedimento celular foi ressuspendido em 90 µL SST 2% SFB, marcadas com anticorpo anti-CD14 *microbeads* (Miltenyi Biotec, Bergisch, Alemanha) e incubado em gelo por 15 minutos. Os monócitos foram, então, separados dos linfócitos por coluna magnética, utilizando-se o kit MACS LS Columns (Miltenyi Biotec), segundo instruções do fabricante.

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

Macrófagos humanos foram obtidos a partir de monócitos isolados de sangue periférico humano, incubando-os por sete dias em RMPI suplementado com 10% de soro fetal bovino e GM-CSF.

Células dendríticas humanas também foram obtidas a partir de monócitos isolados de sangue periférico humano, incubando-os por sete dias em RMPI suplementado com 10% de soro fetal bovino, GM-CSF e IL-4.

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

3.6 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 reação de "burst" oxidativo com células (1,0 x 10⁶ células/ensaio) e iniciamos a reação com PMA (16 ng/ensaio). Utilizamos o luminol e a lucigenina como substrato na

concentração de 1 mM. Realizamos todas as reações em PBS, pH 7,4, 37°C contendo glicose (1 mM), MgCl₂ (0,5 mM) e CaCl₂ (1 mM) e acompanhamos por 60 minutos.

3.7 Utilização do 9,10-difenilantraceno (DPA) como captador químico de ¹O₂

O DPA foi usado como sonda no seqüestro de ${}^{1}O_{2}$ em fagócitos. O enfoque foi carregar estímulo opsonizado (ZO), marcado com DPA, para dentro da célula onde, na presença do ${}^{1}O_{2}$, deveria formar o endoperóxido por cicloadiçao do tipo Diels-Alder (4+2) (figura 5).



Figura 5. Formação do DPAO₂

3.8 Detecção indireta de ¹O₂ em fagócitos: macrófagos, células dendríticas e neutrófilos através do captador químico ABPE

Após os isolamentos e contagem dos neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos (2,5x10⁶ células/mL), estas células foram incubadas com a sonda ABPE na concentração final de (0.5mM) por uma hora em banho-maria a 37°C em meio aquoso (PBS) em pH 7,4. Em seguida a este procedimento as células foram estimuladas com PMA na concentração de 16ng/mL, por mais 1 hora em banho-maria. Depois deste período as amostras

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

As amostras foram analisadas por HPLC usando o equipamento de HPLC LC-10AD Shimazdu com detector UV programado para detecção em comprimento de onda de 210 nm. A coluna usada foi a LC-18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) da *Phenomenex*. A separação e identificação do AABP e do seu endoperóxido (AABPO₂) e do AABPEO₂ foi realizada com fluxo de 1,0mL/min, por gradiente partindo de 65 % de ACN em água, indo a 75 % ACN em 5 min, depois 85% ACN em 7 min, mantendo em 85 % ACN até 25 min e retorno para 65% ACN até 30 minutos.



Figura 6. Rota de formação dos endoperóxidos ABPEO₂, AABPEO₂ e AABPO₂.

3.9 Obtenção de imagens por microscopia confocal

Células foram incubadas com ZO/DPA por um minuto (1x10⁵ partículas/mL). Depois deste período foram levados ao microscópio para visualização de imagens.

3.10 Imunofenotipagem de linfócitos humanos por citometria de fluxo (FACS)

Utilizamos linfócitos humanos para analise de FACS. Incubamos 1,0x10⁶ células/ensaio primeiramente com um dos seguintes anticorpos: CD4-PE, CD8-PE ou CD19-PE. Em seguida, fixamos e permeabilizamos as células de acordo com o protocolo do kit Cytofix/Cytoperm[®]. A permeabilização da célula foi acompanhada da incubação das amostras com o anticorpo anti-MPO monoclonal marcado diretamente com FITC. Após todas as marcações e tratamentos, centrifugamos as amostras e ressuspendemos o precipitado em PBS suplementado com 2 % SFB. Todas as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo, onde foram utilizados 2 canais de leitura. Os dados foram analisados com auxilio do *software* FlowJo (Treestar.com, EUA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Detecção de ¹O₂ em fagócitos através do captador químico 9,10difenilantraceno (DPA)

Formação dos padrões de DPA e seu endoperóxido DPAO₂, marcação de ZO com DPA e avaliação de eficiência de extração:

Para a avaliação da produção de ¹O₂ em fagócitos através do DPA foram preparados padrões. A preparação do endoperóxido de DPA foi feita a partir da fotosensibilização do mesmo, e sua caracterização feita através do seu respectivo cromatograma (Figura 7)



Figura 7. Cromatograma dos padrões de DPA e seu endoperóxido DPAO₂ em seus respectivos tempos de retenção: Cromatograma representativo de 3 preparações nas quais foi avaliada a formação do DPAO₂, a partir da oxidação do DPA. Uma solução de DPA na concentração 2,5mM foi preparada e submetida à irradiação de uma fonte de luz proveniente de uma lâmpada de 500W durante 30 min.

Também foram feitos ensaios de marcação de ZO pelo DPA e de eficiência do processo de extração. O que se pode observar é que a marcação com DPA não é tão eficiente, pois muitas partículas de ZO não revelam nenhum conteúdo de DPA (Figura 9). Esta ausência de marcação em muitas das partículas tem como consequência a diminuição da quantidade de sonda transportada para o interior das células. Além disso, ocorrem perdas significativas de DPA ao longo do processo de extração, pois por HPLC observamos uma queda no sinal de DPA de aproximadamente 58% (Figura 8).



Figura 8. Eficiência da extração de DPA. A figura **A** demonstra um cromatograma no qual ZO (2,5x10⁷ partículas/mL) foi marcado com DPA (concentração final de 2,5mM). A marcação foi feita em PBS pH 7,4 a 37°C por uma hora em banho-maria (volume final 0,3mL). Em seguida foi feita a extração com solução clorofórmio/metanol (2:1). A amostra foi ressuspendida em acetonitrila (0,5mL) e 80 μL injetados no HPLC. A figura **B** mostra um cromatograma de uma solução de DPA de concentração 2,5mM que passou pelo mesmo processo de extração.

A perda de DPA ao longo do processo de extração pode estar relacionada à sua alta hidrofobicidade. Ao ser adsorvido ao ZO, o DPA pode ter seu processo de extração dificultado, o que culmina na queda significativa do sinal detectado por HPLC. Essa perda foi significativa no que concerne à detecção de ¹O₂ em fagócitos.



Figura9. Partículas de ZO marcadas com DPA Imagem de partículas de ZO marcadas com DPA, feitas através de microscopia confocal. Após a marcação foram feitas lâminas com ZO/DPA na concentração de 2,5x10⁷ partículas/mL.

4.2 Tentativa de avaliação da produção de ¹O₂ em leucócitos através da oxidação do DPA adsorvido em ZO e monitorado por HPLC

Depois do isolamento e contagem dos neutrófilos ou monócitos humanos (2,5x10⁶ células/mL) incubamos as mesmas com partículas opsonizadas de zimosan (2,5x10⁷partículas/mL), marcadas com sonda seqüestradora de ${}^{1}O_{2}$, o DPA, na concentração final de 2,5mM, seguido de

análise por HPLC (figuras 10 e 11). Salientamos que a reprodutibilidade dos ensaios esteja abaixo da aceita (CV<5%). Acreditamos que parte desta baixa reprodutibilidade esteja associada à formação de cristais de DPA. Estes seriam formados a partir do DPA que não foi adsorvido à partícula de ZO. No controle, célula mais sonda (2,5x10⁶ cel/mL, e concentração de 2,5mM de DPA), observamos uma formação de DPAO₂, que possivelmente se origina da auto-oxidação da sonda (figura 12).



Figura 10. Cromatograma de neutrófilo+ZO/DP. Cromatograma representativo de 3 experimentos nos quais foi avaliada a formação do DPAO₂, monitorada por HPLC, após incubação por 60 minutos de neutrófilos (2,5x10⁶cel/mL)com 2,5mM de DPA e neutrófilos (2,5x10⁶cel/mL) com partículas de ZO (2,5x10⁷partículas/mL) adsorvidas com DPA (2,5mM) em negro. O meio de reação foi PBS 0,01M em pH 7,4 temperatura 37°C, num volume final de 300µL.



Figura 11. Cromatograma Monócito+ZO/DPA: Cromatograma representativo de 3 experimentos nos quais foi avaliada a formação do DPAO₂, monitorada por HPLC, após incubação por 60 minutos de monócitos humanos (2,5x10⁶cel/mL)com 2,5mM de DPA e monócitos humanos (2,5x10⁶cel/mL) com partículas de zimosan sólidas opsonizadas (2,5x10⁷partículas/mL) adsorvidas com DPA (2,5mM) em negro. O meio de reação foi PBS 0,01M em pH 7,4 temperatura 37°C, num volume final de 300μL



Figura 12. Cromatograma dos controles. (A) PMN+DPA (concentração final de 2,5mM; (B) monócito+DPA (concentração de 2,5mM).

Na comparação de controles e reações verificamos que não é clara a detecção do endoperóxido DPAO₂. Percebemos picos do endoperóxido nos controles, provavelmente provenientes da auto-oxidação da sonda. Entretanto

estes picos não estão muito bem resolvidos na reação de ZO/DPA com neutrófilos e monócitos. Então tentamos medir DPAO₂ pela incubação de ZO/DPA com neutrófilos e monócitos em diferentes condições. Apesar das variações no ensaio, por exemplo, o aumento de partículas de ZO marcadas com DPA na incubação, não consegue visualizar claramente a produção de ¹O₂ pela detecção do endoperóxido DPAO₂ (figura 13).

Steinbeck e seus colaboradores evidenciaram a formação de ¹O₂ em neutrófilos e macrófagos usando o DPA (Steinbeck et al., 1993; Steinbeck et al.,1991). Nos seus experimentos, a sonda DPA foi adsorvida em partículas de vidro, *beads*, e a formação de ¹O₂ foi monitorada após ativação pelo estímulo solúvel PMA. O diferencial do nosso trabalho foi o de incorporamos a sonda DPA em partículas de zimosan opsonizadas, que além de servirem como sonda, atuam diretamente como estímulo dos leucócitos.

Comparando com *beads*, a utilização de DPA adsorvido ao ZO mimetizaria uma situação mais fisiológica, visto que, o caminho para introduzir o DPA dentro da célula se dá via receptores de opsoninas (receptores como FCR ou CR (Ehlers, 2000).



Figura 13. Cromatograma de neutrófilo+ZO/DPA. Cromatograma representativo de 3 experimentos nos quais foi avaliada a formação do DPAO₂, monitorada por HPLC, após incubação por 60 minutos de neutrófilos (2,5x10⁶cel/mL) com 2,5mM de DPA e neutrófilos (2,5x10⁶cel/mL) com partículas de ZO (5x10⁷partículas/mL) adsorvidas com DPA (2,5mM) em negro. O meio de reação foi PBS 0,01M em pH 7,4 temperatura 37°C, num volume final de 300μL.

O receptor envolvido na ligação de ZO com o C3b de fagócitos (Ehlers, 2000), isto nos permite a comparação de formação de ¹O₂ monitorada nesses dois tipos celulares (PMN e PBMC). Porém os resultados que obtivemos não demonstram uma produção significativa de ¹O₂ tanto por neutrófilos quanto por monócitos. Até hoje a referência de Steinbeck é bastante citada e uma das poucas que propõe o acompanhamento da produção intracelular de ¹O₂.

Ainda tomando como base as referências de Steinbeck, tentamos utilizar concomitantemente ao estímulo de ZO o PMA. Nas mesmas condições de incubação das células com as sondas adicionamos o estímulo PMA. Neste caso, apesar da pequena amplitude de sinal, pudemos observar um sinal no tempo de retenção do DPAO₂. De todo modo os resultados não foram muito satisfatórios, pois houve um consumo apenas parcial do DPA, além disso,

curiosamente o sinal de DPAO₂ foi maior em monócitos do que em neutrófilos (Figura 14).



Figura 14. (A) Cromatograma da reação PMN+ZO/DPA+PMA. (B) Cromatograma da reação Monócito+ZO/DPA+PMA.

Em relação à detecção da produção de ¹O₂ através de DPA, ainda são necessários alguns ajustes para elucidarmos esta questão, já que nosso objetivo aqui é demonstrar as diferenças de produção de ¹O₂ via receptores de opsoninas, mimetizando a fagocitose de um patógeno, por exemplo, ativando toda cascata de produção de ERO, ativação de MPO e produção de ¹O₂,

comparando as diferenças destes parâmetros em granulócitos e células mononucleares.

4.3 Monitorização da produção de ¹O₂ em neutrófilos, monócitos e por microscopia confocal e quimiluminescência

O DPA é um derivado antracênico cuja fluorescência pode ser observada nos comprimentos de onda de excitação λ = 330nm e emissão λ = 470nm. Uma característica peculiar é que a formação do seu endoperóxido proporciona a perda desta fluorescência. Sendo assim lançamos mão da utilização do captador químico DPA, para visualizar *in loco* a produção de ¹O₂ em fagócitos. Assim como na detecção indireta de ¹O₂ em fagócitos com DPA por HPLC, utilizamos partículas opsonizadas de zimosan adsorvidas da sonda, promovendo o processo de fagocitose das mesmas, interiorização do DPA e produção de ¹O₂.

Para fins de comparação, foram feitas em microscópio confocal, somente imagens das partículas opsonizadas adsorvidas em DPA, sem células, o qual funciona como um controle (figura 15).



Figura 15. Partículas de ZO marcadas com DPA $(1x10^7 \text{ partícula/mL})$. O Gráfico demonstra a variação da fluorescência ao longo do tempo (30 min). Na coluna A temos imagens obtidas em microscopia confocal que mostram a fluorescência de DPA nas partículas de ZO. Na coluna B temos a imagem transmitida mais a fluorescência.

Pudemos, através deste experimento, visualizar a produção de ¹O₂ em Neutrófilos (figura 16) e monócitos (figura 17). Diferentemente da detecção por HPLC, conseguimos aqui observar a formação de ¹O₂ pelo decréscimo da fluorescência da sonda. A vantagem das imagens obtidas por microscopia confocal é que podemos acompanhar através da variação do tempo o decréscimo da fluorescência em diferentes tempos. Mesmo com poucas células com partículas de ZO marcadas interiorizadas, conseguimos selecionar aquelas que englobaram partículas marcadas e acompanhar a cinética de formação do ¹O₂. É importante salientar que a técnica de microscopia é uma ferramenta qualitativa. Não conseguimos quantificar ¹O₂, pois as células visualizadas estão em tempos diferentes e fagocitaram quantidades diferentes

de ZO/DPA. Porém são de vital importância, já que demonstram a produção de ${}^{1}O_{2}$ pelas células, uma vez que o DPA é um captador específico para ${}^{1}O_{2}$.



Figura 16. Neutrófilos humanos $(1 \times 10^6 \text{ cel/mL})$ incubados com partículas de zimosan opsonizadas marcadas com DPA $(1 \times 10^7 \text{ part/mL})$. O Gráfico demonstra a variação da fluorescência ao longo do tempo (30 min). Na coluna A temos imagens obtidas em microscopia confocal que mostram o decréscimo da fluorescência de DPA em neutrófilos que fagocitaram partículas de ZO marcadas. Na coluna B temos a imagem transmitida mais a fluorescência.



Figura 17. Monócitos humanos (10⁶ cel/mL) incubados com partículas de Zy opsonizadas marcadas com DPA (10⁷ part/mL). O Gráfico demonstra a variação da fluorescência ao longo do tempo (30 min). Na coluna A temos imagens obtidas em microscopia confocal que mostram o decréscimo da fluorescência de DPA em monócitos que fagocitaram partículas de Zy marcadas. Na coluna B temos a imagem transmitida mais a fluorescência.

Paralelamente, para nos certificarmos que as células com as quais trabalhávamos estavam plenamente viáveis e funcionais tanto para os ensaios de HPLC quanto para as imagens de microscopia confocal, fizemos ensaios de atividade peroxidásica, produção de EROs e do *burst* oxidativo de neutrófilos e monócitos. Estas medidas também permitirão que futuramente conheçamos as relações $O_2^{-/1}O_2$, $H_2O_2/^1O_2$ e HOCI/ 1O_2 . Inicialmente medimos os níveis de ERO produzidas por estas células. Para tal utilizamos a técnica de quimiluminescência por luminol e lucigenina. O luminol, é um amplificador químico de luz, é utilizado para medir os ROS (especificamente H_2O_2) bem

como a atividade peroxidásica celular. A lucigenina uma vez excitada pela ação do O₂⁻, libera energia na forma de luz e, por isso, essa substância representa uma alternativa de estudo da liberação O₂⁻⁻ no meio extracelular.

Para avaliação da atividade peroxidásica, utilizamos homogenato celular de neutrófilos e monócitos. (figuras 18 e 19). Os resultados demonstraram diferenças na atividade peroxidásica entre neutrófilos e monócitos, muito provavelmente relacionada à quantidade de MPO, bem como sua compartimentalização.



Figura 18. Atividade peroxidásica em neutrófilos: Gráfico representativo de 3 experimentos que demonstram a cinética de emissão de luz obtida quando homogenato de neutrófilos (1×10^6 cel/mL) foi incubado com luminol (1 mM) e H₂O₂. O meio da reação foi PBS glicose 0,01M pH 7,4 a temperatura de 37°C. O volume final da reação foi de 0,3mL



Figura 19. Atividade peroxidásica em monócitos: Gráfico representativo de 3 experimentos que demonstram a cinética de emissão de luz obtida quando homogenato de monócitos (1×10^6 cel/mL) foi incubado com luminol (1 mM) e H₂O₂. O meio da reação foi PBS glicose 0,01M pH 7,4 a temperatura de 37°C. O volume final da reação foi de 0,3mL.

Realizamos ensaios de produção de EROs e burst oxidativo utilizando luminol e lucigenina respectivamente. O objetivo destes experimentos foi demonstrar a funcionalidade das células para a produção de EROs, incluindo ¹O₂, através dos mecanismos envolvendo MPO e NADPH oxidase. Assim como na atividade peroxidásica vimos diferenças no comportamento da produção de EROs figuras e busrt oxidativo em neutrófilos e monócitos (figuras 20 a 23).



Figura 20. Produção de EROs em neutrófilos: Gráfico representativo de 3 experimentos que mostraram a produção de ERO em neutrófilos. 1x10⁶ céls/ml foram incubadas com luminol e PMA (16ng/mL). O meio da reação foi PBS glicose 0,01M pH 7,4 a temperatura de 37°C. O volume final da reação foi de 0,3mL.



Figura 21. Burst oxidativo em neutrófilos: Gráfico representativo de 3 experimentos que mostraram a produção de burst oxidativo em neutrófilos. 1x10⁶ céls/ml foram incubadas com lucigenina e PMA (16ng/mL). O meio da reação foi PBS glicose 0,01M pH 7,4 a temperatura de 37°C. O volume final da reação foi de 0,3mL.



Figura 22. Produção de EROs em monócitos: Gráfico representativo de 3 experimentos que mostraram a produção de ERO em monócitos. 1x10⁶ céls/ml foram incubadas com luminol e PMA (16ng/mL). O meio da reação foi PBS glicose 0,01M pH 7,4 a temperatura de 37°C. O volume final da reação foi de 0,3mL.



Figura 23. Burst oxidativo em monócitos: Gráfico representativo de 3 experimentos que mostraram a produção de burst oxidativo em monócitos. 1x10⁶ céls/ml foram incubadas com lucigenina e PMA (16ng/mL). O meio da reação foi PBS glicose 0,01M pH 7,4 a temperatura de 37°C. O volume final da reação foi de 0,3mL.

Ao compararmos a produção de O₂⁻⁻, EROs e atividade peroxidásica de neutrófilos e monócitos, notamos que em todos estes parâmetros, neutrófilos apresentam quantidades muito superiores a monócitos. Isto pode ser explicado pela diferença da concentração de MPO nestas células. A MPO encontra-se em maior quantidade em neutrófilos quando comparada a monócitos.

	Ânion		Atividade
Célula	Superóxido	H ₂ O ₂ /MPO	Peroxidásica
Neutrófilo	1	1	1
Monócito	0,29	0,35	0,06

Tabela 1. Valores arbitrários da quimiluminescência amplificada por lucigenina(ânion superóxido) (RLU/s x tempo (min), da quimiluminescência amplificada porluminol (H2O2/MPO) e atividade peroxidásica em neutrófilos e monócitos. Dadosrelativos à média de experimentos (n=3)

Estes resultados corroboram os dados de decréscimo de fluorescência de DPA obtidos na microscopia confocal. A menor atividade peroxidásica e burst oxidativo em monócitos, quando comparados com neutrófilos, explica o decréscimo da fluorescência de forma mais lenta do DPA nestas células.

4.4 Detecção de ¹O₂ através da sonda ABPE

Também avaliarmos a produção de ${}^{1}O_{2}$ em fagócitos lançamos mão do uso da sonda éster 9,10-antracenil-3-bispropionato de etila (ABPE). Esta sonda, em relação ao DPA, apresenta como vantagem não necessitar de partículas que a transportem para o interior da célula. Devido à sua apolaridade, a sonda penetra no interior da célula que ao sofrer ação de esterases leva ao aumento de sua polaridade impedindo a sua saída. Após o estímulo celular espera-se que o ${}^{1}O_{2}$ formado reaja com a porção antracênica da sonda formando um endoperóxido, tal qual o DPA. Portanto para a determinação do ${}^{1}O_{2}$ em células por HPLC utilizando o ABPE, buscamos o endoperóxido hidrolisado da sonda inicial. Para identificarmos o composto de interesse padronizamos os controles da sonda e seu produto de oxidação e (Figura 24).



Figura 24. Padrões da sonda ABPE e seus produtos de oxidação e hidrólise

Para avaliar a eficiência desta sonda inicialmente fizemos ensaios com neutrófilos, células que comprovadamente produzem ${}^{1}O_{2}$ e PBMC. Pudemos observar que o endoperóxido de interesse ABPEO₂, aparece em um cromatograma quando incubamos neutrófilos, sonda e estímulo, comprovando que a sonda capta de forma eficiente o ${}^{1}O_{2}$. (Figura 25)



Figura 25. (A) Cromatograma do controle neutrófilo/ ABPE. **(B)** Cromatograma da reação neutrófilo/ABPE/PMA. Cromatogramas representativos de 2 experimentos em iguais condições(n=2).

No cromatograma **A** podemos observar o controle onde neutrófilos (1X10⁷ cel/mL) foram incubados com ABPE (0,3mM) durante uma hora e em seguida submetidos ao processo de extração. Podemos identificar o pico correspondente à sonda ABPE (tempo de retenção de 18.7 min.) e um pico

correspondente à produção basal de ¹O₂, ou auto-oxidação da sonda ABPE representado pelo pico de ABPEO₂ (tempo de retenção de 12,6 min – área integrada: 214308). Já no cromatograma B podemos observar a reação onde neutrófilos (1X10⁷ cel/mL) foram incubados com ABPE (0,5mM) durante uma hora, submetidos a estimulo (PMA 16ng/mL) e em seguida ao processo de extração. Neste cromatograma observa-se um aumento do pico correspondente ao ABPEO₂ bem como um aumento da área integrada (685003). Os resultados indicam um melhor funcionamento do ABPE guando comparado ao DPA, pois pudemos detectar com maior precisão os produtos de oxidação correspondentes à formação de ¹O₂.

Procedemos com o mesmo experimento utilizando PBMC e obtivemos resultados que indicam uma menor produção de ¹O₂ quando comparados com neutrófilos. (Figura 26)

O pico correspondente ao endoperóxido ABPEO₂ apresentou valores significativamente menores. O controle apresentou uma área integrada de 128800 enquanto a reação PBMC/ABPE/PMA apresentou uma área integrada de 225805. A comparação da produção de ¹O₂ destes tipos diferentes de células demonstra que a concentração de MPO presente em neutrófilos e monócitos (3 vezes menor), determina a quantidade de ¹O₂ produzida por elas. Porém não podemos afirmar que a eficiência de produção de ¹O₂ por neutrófilos é maior, uma vez que monócitos correspondem a somente 30% da população de PBMC. Portanto a quantidade de ¹O₂ produzida por cada uma das células pode desempenhar diferentes papéis em focos inflamatórios e infecciosos. Talvez a maior produção de ¹O₂ por neutrófilos determine no seu foco de

atuação um papel de *killing*, enquanto sua produção em monócitos desempenhe um papel mais relacionado à sinalização.



Figura 26. (A) Cromatograma do controle PBMC/ ABPE. **(B)** Cromatograma da reação PBMC/ABPE/PMA. Cromatogramas representativos de 2 experimentos em iguais condições(n=2).

4.5 **Determinação de MPO em linfócitos**

Como teste preliminar para determinação da presença de MPO em linfócitos, realizamos um ensaio de citometria de fluxo com dupla marcação. Este ensaio consistiu em isolar linfócitos de sangue periférico humano, com a menor contaminação possível de monócitos, e marcá-los com anticorpos monoclonais para CD4+, CD8+, CD19+ e MPO. Estas marcações permitiram identificar as diferentes populações de linfócitos, bem como a presença ou ausência de MPO



Figura 27. Citometria de fluxo de linfócitos isolados de sangue periférico humano. Dupla marcação com CD4+ (PE) e MPO (FITC)

Na figura acima podemos ver que a maior parte da população (81%) corresponde aos parâmetros de tamanho e granulosidade de linfócitos. Procedemos então com a marcação com anticorpos anti-CD4+ e anti-MPO, para identificar nesta população a presença de células duplamente marcadas por CD4+ e MPO. Verificamos que destes 81%, aproximadamente 33% apresentavam-se positivos para CD4+. Destas células CD4+ ainda pudemos distinguir duas populações. A menor delas apresentou uma marcação *low* para CD4+, porém 82% destas células mostraram-se *high* para MPO. Dos 30% restantes, pudemos observar uma marcação *high* para CD4+, porém *low* para MPO. Portanto dentro dos grupos com marcação positiva para CD4+ pudemos verificar a presença de duas subpopulações distintas, porém com presença bem definida de células positivas para CD4+ e MPO. Em seguida avaliamos a marcação também com CD8+ (Figura 28)



Figura 28. Citometria de fluxo de linfócitos isolados de sangue periférico humano. Dupla marcação com CD8+ (PE) e MPO (FITC)

Também partindo de uma população inicial de aproximadamente 82%, identificamos outras duas subpopulações. Apenas a menor delas (13,2%) apresentou marcação para CD8+. As células CD8+ *high* se mostraram *low* para MPO, enquanto as células *low* para CD8+ mostraram-se *high* para MPO. Assim como as células marcadas para CD4+ verificamos que as populações CD8+ *high* apresentam uma expressão MPO *low*, e o contrário acontece com as populações CD8+ *low.* Por último fizemos a dupla marcação das células para CD19+ e MPO (figura 29):



Figura 29. Citometria de fluxo de linfócitos isolados de sangue periférico humano. Dupla marcação com CD8+ (PE) e MPO (FITC)

O mesmo comportamento com das populações anteriores ocorreu com a dupla marcação CD19+/MPO. Da maior população apenas aproximadamente

12% das células demonstraram marcação CD19+. Somente 2,31% apresentou a dupla marcação, porém de forma *low*.

Estas análises apontam para a hipótese da presença de MPO em linfócitos CD4+, CD8+ e CD19+. Ainda não sabemos ao certo se os linfócitos *low* para CD4+, CD8+ e CD19+ são células jovens e provavelmente ao longo da sua maturação, quando se tornam *high* para essas marcações, perdem conteúdo de MPO. Mas, de fato, na literatura ainda não se tem um estudo detalhado do comportamento da MPO em linfócitos, bem como sua presença em diferentes tipos e o seu comportamento ao longo do processo de maturação.

5 Conclusões

- Até o momento pudemos concluir que apesar de a metodologia empregada na investigação da produção de ¹O₂ já ter sido padronizada por Garcia F. em sua dissertação de mestrado, ainda enfrentamos dificuldades para o emprego das técnicas. Apesar do método de inclusão de captadores químicos de ¹O₂ através da adsorção em partículas opsonizadas parecer mais adequado do que o simples estímulo por PMA para a detecção de ¹O₂ em neutrófilos e células mononucleares, alguns detalhes ainda precisam ser revistos;

 A sonda ABPE demonstrou uma maior eficiência na captação e facilitou a detecção de ¹O₂ em neutrófilos e PBMC;

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

- A produção de ¹O₂ em fagócitos é distinta. Acreditamos que as diferenças observadas, na formação de ¹O₂, para neutrófilos e mononucleares em microscopia confocal podem ser devido а diferentes formas de compartimentalização da enzima nestes dois tipos celulares. É possível que isto tenha uma função biológica específica, uma vez que, ¹O₂ parece ser um importante sinalizador no processo inflamatório- O indicativo da presença de MPO em diferentes populações de linfócitos é um dado novo e interessante para as próximas análises, incluindo a possibilidade de detecção de ¹O₂ nestas células, através da sonda ABPE;

6 Referências

Agrawal A., Agrawal S., Tay J., Gupta S (2007) "Biology of Dendritic Cells in Aging" Journal of Clinical Imunology, 7 August 2007.

Akki A, Zhang M, Murdoch C, et al. (2009) "NADPH oxidase signaling and cardiac myocyte function" Journal of Molecular and Cellular Cardiology; **47**, **15-22**

Babior, B.M. (1978). "Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes." N. Engl. *J.Med.*,**289**, 659.

Babior, B.M. (1999)."NADPH oxidase: na update." Blood., 93, 1464.

Babior, B.M. (2000)."Phagocytes and oxidative stress." *American J. Med.*, **109**, 33.

Babior, B.M.; Lamberth, J.D.; Naussef, W. (2002). "The neutrophil NADPH oxidase." *Arc. Biochem. Biophys*, **397**, 342.

Baeuerle, P.A. & Baltimore, D. (1988). "IKB: a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor." *Science*, **242**, 540.

Bokoch, G.M., e Knaus, U. G. (2003). "NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore." *Trends. Bichem. Sci.*, **28**, 502.

Böyum, A. (1968a). "Isolation of leukocytes from human blood. Paper II." *Scand J.Clin. Lab. Invest. Suppl.*, **97**, 31.

Böyum, A. (1968b). "A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. Paper III." *Scand J.Clin. Lab. Invest. Suppl*, **97**, 51.

Böyum, A. (1968c). "Isolation of mononuclear cells and granulocyts from human blood. Paper IV." *Scand J.Clin. Lab. Invest. Suppl.*, **97**, 77.

Cotran, R. S., Kumar, V., Robbins, S. L. (1996). Inflamação e reparação. In: *Patologia Estrutural e Funcional*. Editora Guanabara Koogan S.^a, Rio de Janeiro, R.J. 5 ed p. 45-83.

Dale, D.C., Boxer, L. and Liles, W.C., "The phagocytes: neutrophils and monocytes". Blood **112**: 935-945.

Dewald, B., Baggiolini, M. (1986). "Methods for assessing exocytosis by neutrophil leukocytes." *Methods Enzymol.*, **132**, 267.

Di Mascio, P., Medeiros, M.H.G., Bechara, E.J.H., Catalani, L.H. (1995). "Singlet molecular oxygen: Generation, reactivity, identification and biological effects." *Ciência and Cultura.*, **74**, 297.

El-Benna, J.; Dang, P.; Gougerot-Pocidalo M.A. (2008) "Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane." <u>Seminars in Immunopathology</u>, **v. 30**, p. 279-289.

Foote, C.S., Clennan, E.L (1995). *In Active oxygen in chemistry, Properties and reactions of singlet dioxygen*, Foote, C.S.; Valentine, J.S.; Greenberg, A. and Liebman J.F.; Eds., Vol. 2, 105.

Gordon, S., Crocker, P.R., Lee, S.H., Morris,L., Rabinowitz, S. (1986). "Trophic and defense function of murine macrophages". In: Host-Resistance Mechanisms to Infectious Agents, Tumor and Allografts. (ed. R. S. Steinman & R. J. North), p. 121-137. New York: Rockefeller University Press.

Ikuta, K., N., Uchida, J. Friedman, and I. L., Weissman. "Lynohocyte development from steam cells". Annual Review of Immunology 10:759-783, 1992.

Khan, U.A., Wilson, T. (1995). "Reactive oxygen species as cellular messengers." *Chemistry & Biology.*, **2**, 437.

Klebanoff, S.J. (2005). "Myeloperoxidase: Friend and Foe." *J. Leukocytes Biology*, **77**, 1189.

Kumar, A. P., F. J. Piedrafita, et al. (2004). "Peroxisome proliferatoractivated receptor gamma ligands regulate myeloperoxidase expression in macrophages by an estrogen-dependent mechanism involving the -463GA promoter polymorphism." *J Biol Chem* **279**(9): 8300-15.

Lehtonen, A, Author Lehtonen Anne Lehtonen, Anne , Ahlfors, H, et al.Gene expression profiling during differentiation of human monocytes to macrophages or dendritic cells. SCAND J IMMUNOL 65 (6): 608-608 JUN 2007.

Nagra, R. M., B. Becher, et al. (1997). "Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis." *J Neuroimmunol* **78**(1-2): 97-107.

Reeves, E. P., H. Lu, et al. (2002). "Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K+ flux." *Nature* **416**(6878): 291-7. Roos, D., van Bruggen, R., Meischl, C. (2003). "Oxidative killing of microbes by neutrophils." *Microbes Infect.* **5**, 1307.

Ryter, S.W., Tyrell, R.M. (1998). "Singlet molecular oxygen: A possible effector of eukaryotic gene expression." *Free Radical Biology and Medicine.*, **24**, 1520.

Schreck, R., K. Albermann, et al. (1992). "Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review)." *Free Radic Res Commun* **17**(4): 221-37.

Steinbeck, M., Khan, A., Karnovsky, M. (1991). "Intracellular single oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap." *The Journal of Biological Chemistry*, **267**, 13425.

Steinbeck, M., Khan, A., Karnovsky, M. (1993). "Extracellular Production of Single Oxygen by Stimulated Macrophages Quantified using 9,10-Diphenylanthracene and perylene in a Polystyrene Film." *The Journal of Biological Chemistry.*, **268**, 15649.

Van Furth, R. (1985) ed. Mononuclear phagocytes: Characteristics, physiology and function. Dordrecht, the Netherlands: Martinicus Nijhoff.

Winterbourn, C. C., M. C. Vissers, et al. (2000). "Myeloperoxidase." *Curr Opin Hematol* **7**(1):53-8.