

Recebido em 27/05/98  
11 11 11

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Curso de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Análises Clínicas

*Estudo comparativo entre o metabolismo oxidativo de leucócitos polimorfonucleares obtidos por sedimentação espontânea, por sedimentação em gradiente de densidade e presentes no sangue total*

***IVANISE MARINA MORETTI REBECCHI***

Dissertação para obtenção do grau de  
**MESTRE**  
Orientadora: Profa. Dra. Ana Campa

São Paulo  
1997

15556

---

DEDALUS - Acervo - CQ



30100000795

**Ficha Catalográfica**

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

R289e Rebecchi, Ivanise Marina Moretti  
Estudo comparativo entre o metabolismo oxidativo de leucócitos polimorfonucleares obtidos por sedimentação espontânea, por sedimentação em gradiente de densidade e presentes no sangue total / Ivanise Marina Moretti Rebecchi. -- São Paulo, 1997.  
149p.

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

Orientador: Campa, Ana

1. Bioquímica clínica : Sangue      2. Oxidação biológica  
3. Quimiluminescência : Biofísica    I. T.    II. Campa, Ana, orientador.

616.07561 CDD

IVANISE MARINA MORETTI REBECCHI

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE O METABOLISMO OXIDATIVO DE  
LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES OBTIDOS POR  
SEDIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA, POR SEDIMENTAÇÃO EM  
GRADIENTE DE DENSIDADE E PRESENTES NO SANGUE TOTAL

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

COMISSÃO JULGADORA

---

PROFA. DRA. ANA CAMPA  
PRESIDENTE E ORIENTADORA

---

PROF. DR. LUÍS FERNANDO BICUDO PEREIRA COSTA ROSA  
1º. EXAMINADOR

---

PROF. DR. IGUATEMY LOURENÇO BRUNETTI  
2º. EXAMINADOR

*São Paulo 24 de setembro de 1997.*

## **AGRADECIMENTOS:**

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade em seu curso de pós graduação.

Aos setores de Hematologia e Patologia, pela utilização de seus laboratórios durante o desenvolvimento do trabalho experimental.

Ao Prof. Neil Ferreira Novo e à Profa. Yara Juliano responsáveis pela disciplina de Bioestatística da Escola Paulista de Medicina - UNIFESP pela valiosa orientação estatística, sem a qual este trabalho jamais estaria finalizado.

À Ângela Tavares Paes, estatística do Laboratório de Epidemiologia e Estatística, localizado no Instituto Dante Pazzanese, pelo auxílio e orientação estatística, além da amizade e tempo dispensados.

Às profas. Dras. Lúcia Melloni Bruneri, Primavera Borelli Garcia e ao Prof. Antonio Altair Magalhães de Oliveira pela amizade, apoio e, principalmente, pelas valiosas orientações técnico-científicas.

À Maria Sylvia Correa, editora assistente da Editora Ática, pela valiosa revisão do texto e pela atenção e amizade dispensadas.

À Moema Rodrigues dos Santos, pela cuidadosa revisão bibliográfica e pela atenção e amizade dispensadas.

Aos funcionários do Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas: às secretárias Sandra, Sofia, Suely, Benedita e Elaine; aos técnicos Maurício, Mariano, Flávio, Evandro, e à funcionária Carmem, pelo auxílio, orientação e amizade dispensados.

À estudante de iniciação científica Giovanna S. Freitas, pelo auxílio, pela amizade e pelo incentivo sempre presentes.

Aos colegas de trabalho do laboratório de Bioquímica Clínica, em especial ao Dr. Edson Luiz da Silva e ao estudante de pós graduação Boni Yavo, pelo companheirismo e apoio dispensados.

À aluna de pós graduação Luciana Nardinelli pela orientação técnica, pela amizade e apoio dispensados.

Aos amigos Bilu e Sérgio do Bar Canto Brasileiro, e a todos os amigos que sempre me incentivaram e indicaram pessoas importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos aqueles que direta, ou indiretamente, colaboraram e incentivaram na realização deste trabalho.

**Aos meus pais,  
Francisco Rebecchi e Virma Moretti Rebecchi,  
por tudo**

**À profa. Dra. Ana Campa,  
pela orientação e pela oportunidade  
da realização deste trabalho**

---



**Ao pequeno colibri, que anuncia sua  
chegada a 150 batimentos por minuto,  
Rafael ou Marina, por tudo  
o que você representa**

---

## **ÍNDICE**

<b>Abreviaturas utilizadas .....</b>	<b>5</b>
<b>1) Introdução</b>	
<b>Leucócitos polimorfonucleares - Histórico .....</b>	<b>8</b>
<b>Origem, crescimento e diferenciação .....</b>	<b>12</b>
<b>Conteúdo dos grânulos - grânulos azurófilos .....</b>	<b>14</b>
<b>Grânulos específicos .....</b>	<b>15</b>
<b>Grânulos terciários .....</b>	<b>15</b>
<b>Fagocitose .....</b>	<b>16</b>
<b>Degranulação .....</b>	<b>17</b>
<b>"Burst" respiratório .....</b>	<b>21</b>
<b>Os componentes do sistema NADPH oxidase .....</b>	<b>23</b>
<b>Mecanismos de ativação de neutrófilos .....</b>	<b>26</b>
<b>Formação de espécies microbidas .....</b>	<b>33</b>
<b>Sistemas de proteção contra espécies microbidas .....</b>	<b>36</b>
<b>MPO .....</b>	<b>37</b>
<b>Mecanismo catalítico .....</b>	<b>38</b>
<b>Ação microbicida .....</b>	<b>42</b>
<b>Obtenção de polimorfonucleares neutrófilos .....</b>	<b>43</b>
<b>Quimiluminescência .....</b>	<b>46</b>
<b>Quimiluminescência dependente de luminol .....</b>	<b>47</b>
<b>Peroxidase catalisando a reação do luminol .....</b>	<b>50</b>
<b>Amplificação de reações quimiluminescentes catalisadas por HRP .....</b>	<b>52</b>

<b>Quimiluminescência dependente de lucigenina .....</b>	<b>54</b>
<b>2) Objetivos .....</b>	<b>57</b>
<b>3) Material e métodos</b>	
<b>3.1) Preparação do PBS segundo Dulbecco .....</b>	<b>59</b>
<b>3.2) Preparação dos estímulos .....</b>	<b>59</b>
<b>3.3) Reagentes .....</b>	<b>61</b>
<b>3.4) Obtenção de PMN por gradiente de densidade .....</b>	<b>64</b>
<b>3.5) Obtenção de PMN por sedimentação espontânea .....</b>	<b>65</b>
<b>3.6) Quantificação aproximada dos PMN presentes no sangue total ..</b>	<b>66</b>
<b>3.7) Aparelhagem utilizada .....</b>	<b>66</b>
<b>3.8) Avaliação percentual da população dos PMN presentes nas suspensões celulares obtidas por sedimentação espontânea ou por sedimentação em gradiente de densidade .....</b>	<b>67</b>
<b>3.9) Avaliação da viabilidade celular dos PMN obtidos por sedimentação espontânea ou por sedimentação em gradiente de densidade .....</b>	<b>67</b>
<b>3.10) Avaliação da viabilidade celular dos PMN obtidos por sedimentação espontânea ou por sedimentação em gradiente de densidade ao longo do tempo .....</b>	<b>68</b>
<b>3.11) Avaliação da ativação de PMN obtidos por sedimentação espontânea, por gradiente de densidade ou presentes no sangue total através de quimiluminescência .....</b>	<b>68</b>
<b>3.12) Avaliação da ativação de PMN obtidos por sedimentação espontânea ou por sedimentação em gradiente de densidade através da redução do citocromo c .....</b>	<b>71</b>
<b>3.13) Determinação espectrofotométrica da MPO .....</b>	<b>72</b>
<b>3.14) Avaliação da degranulação através de CL .....</b>	<b>72</b>
<b>3.15) Avaliação da viabilidade celular dos PMN obtidos por</b>	

<b>sedimentação espontânea ou por sedimentação em gradiente de densidade ao longo do tempo e na presença de <i>enhancer</i></b> .....	<b>74</b>
<b>3.16) Avaliação de 4-Br-fenol, 1-Br-2-naftol e luciferina como possíveis <i>enhancers</i> da reação de CL nas condições propostas para células</b> .....	<b>75</b>
<b>3.17) Avaliação da CL celular dos PMN obtidos por sedimentação em gradiente de densidade ou por sedimentação espontânea ou presentes no sangue total utilizando <i>enhancers</i></b> .....	<b>76</b>
<b>3.18) Avaliação da CL do sobrenadante, na presença de <i>enhancer</i>, de células obtidas por sedimentação espontânea e tratadas com FMLP</b> .....	<b>79</b>
<b>3.19) Análise estatística</b> .....	<b>80</b>
<b>4) Resultados</b>	
<b>4.1) População celular obtida pelos diferentes métodos de separação</b> .	<b>82</b>
<b>4.2) Ensaio de viabilidade celular</b> .....	<b>83</b>
<b>4.3) Diferenças na ativação de PMN neutrófilos obtidos por sedimentação espontânea, por sedimentação em gradiente de densidade ou em sangue total</b> .....	<b>84</b>
<b>4.4) Diferença na ativação de PMN obtidos por sedimentação espontânea ou por sedimentação em gradiente de densidade monitoradas pela redução do citocromo c</b> .....	<b>96</b>
<b>4.5) Determinação espectrofotométrica da MPO</b> .....	<b>103</b>
<b>4.6) Estudo de degranulação</b> .....	<b>103</b>
<b>4.7) Ensaio de viabilidade celular na presença de <i>enhancer</i></b> .....	<b>113</b>
<b>4.8) Ensaio de <i>enhancement</i> do sistema celular</b> .....	<b>116</b>
<b>4.9) Ensaio de <i>enhancement</i> do sobrenadante de células obtidas por sedimentação espontânea e estimuladas com FMLP</b> .....	<b>125</b>
<b>5) Discussão</b> .....	<b>126</b>
<b>6) Conclusões</b> .....	<b>136</b>

<b>7) Resumo .....</b>	<b>137</b>
<b>8) Abstract .....</b>	<b>139</b>
<b>9) Referências bibliográficas .....</b>	<b>140</b>

**ABREVIATURAS UTILIZADAS:**

AA: ácido araquidônico

ATP: adenosina tri fosfato

C3, C3b, C5, C5a: frações do sistema complemento

CFU-GEMM: unidade formadora de colônia multi potente

CFU-GM: unidade formadora de colônia grânulo-monocítica

cit b (gp91<sup>phox</sup>): citocromo b<sub>558</sub>, phox se refere a oxidase de fagócito (phagocyte oxidase)

cit c: citocromo c

CL: quimiluminescência

contr.: controle

cpm: contagens por minuto

DAG: diacil glicerol

DMSO: dimetilsulfóxido

EDTA: etileno diamino tetracético dipotássico

EROS: espécies reativas de oxigênio

FAD (p22<sup>phox</sup>): flavoproteína dependente de FAD, phox se refere a oxidase de fagócito (phagocyte oxidase), p22 pois foi caracterizada como proteína de 22 KDa.

FAD: flavina adenina dinucleotídeo

FMLP: formil-metionil-leucil-fenilalanina

G-CSF: fator estimulador de colônia granulocítica

GM-CSF: fator estimulador de colônia grânulo-monocítica

GSH: glutathiona reduzida

GSSG: glutathiona oxidada

**GTP: guanina tri fosfato**

**5-HETE: ácido 5 hidroxieicosatetraenóico**

**HIV: vírus da imunodeficiência humana**

**HRP: peroxidase de raiz forte (horse radish peroxidase)**

**IgG: imunoglobulina da classe G**

**IL 3: interleucina 3**

**IL 8: interleucina 8**

**IP3: inositol 1,4,5 trifosfato**

**LTB4: leucotrieno B4**

**MPO: mieloperoxidase**

**NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida**

**NADP<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada**

**NBT: nitro blue tetrazolium**

**NK: natural killer (atividade de linfócito)**

**p47 (p47<sup>phox</sup>): proteína de 47 KDa, phox se refere a oxidase do fagócito (phagocyte oxidase)**

**p67 (p67<sup>phox</sup>): proteína de 67 KDa, phox se refere a oxidase do fagócito (phagocyte oxidase)**

**PAF: fator ativador de plaquetas**

**PBS: tampão fosfato**

**PG: prostaglandinas**

**PKC: proteína quinase C**

**PMA: acetato de forbol miristato**

**PMN: polimorfonucleares**

**rap1A: proteína oxidase**

ROOH: peroxi compostos

SDS: dodecil sulfato de sódio

SOD: superóxido dismutase

TNF: fator de necrose tumoral

Zy: zymosan

---

## **1) INTRODUÇÃO**

### *LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES NEUTRÓFILOS:*

#### *HISTÓRICO:*

Até o século XVIII os microscopistas reconheciam que o sangue era composto de esferas vermelhas e grandes "corpúsculos" brancos. Com o desenvolvimento de técnicas de coloração, especialmente por Paul Ehrlich em 1880 (Baker, 1958), foi possível verificar que estes corpúsculos brancos eram de muitos tipos. Dentre eles os atuais PMN eram chamados por Ehrlich de células polinucleares, porém, muitos outros pesquisadores mostraram que de fato a célula possuía apenas um núcleo e que este possuía forma lobulada. Metchnikoff, um zoologista russo, descreveu os grânulos encontrados nestas células como neutrófilos, pois não se coravam nem com corantes básicos (basófilos) nem com corantes ácidos, como a eosina (eosinófilos). No século XIX houve algumas especulações sobre o papel dos PMN na inflamação. A princípio, acreditava-se que os corpúsculos encontrados no pus (gerado no processo inflamatório) eram resultantes de "geração espontânea". Posteriormente, Waller demonstrou que estes corpúsculos eram originários do sangue e que migravam ao foco inflamatório por diapedese, porém, passou a se acreditar que estas células carregavam os microorganismos ao foco inflamatório. A evidência para esta proposta era a de que raramente eram vistas bactérias em tecidos que não estavam "infectados" por estas células. Muitos patologistas acreditavam nesta teoria, como Virchow, Waller e Cronheim. Metchnikoff e outros, entretanto, sugeriram que estas células eram oponentes das bactérias, não suas aliadas. Para fornecer evidências a favor de sua proposta Metchnikoff se baseou em uma explicação evolutiva na escala filogenética. Chamou a atenção para a capacidade fagocítica de seres

unicelulares e para o fato de que à medida em que se evolui na escala filogenética a complexidade dos seres aumenta, com surgimento de funções específicas, exercidas por células especializadas (Hallet, 1989). O papel fagocítico tem sido reconhecido desde 1883, quando Metchinikoff relatou que partículas estranhas inseridas em metazoários eram capturadas por uma população de células mesodérmicas "nômades" que residiam nos tecidos intersticiais. Ele postulou para estas células, as quais chamou de fagócitos, um papel crucial na defesa do hospedeiro (para revisão ver Babior, 1978). Em metazoários, somente células da mesoderme apresentam capacidade fagocítica e, em mamíferos, os leucócitos polimorfonucleares neutrófilos são células fagocíticas descendentes destes fagócitos mesodérmicos, que, por sua vez, seriam descendentes dos organismos unicelulares, como a ameba, que possui capacidade fagocítica. Metchinikoff estendeu seu argumento ao princípio Darwiniano de que as características sem real valor são perdidas ao longo do processo evolutivo, e que assim sendo as células fagocíticas eram benéficas ao organismo pois todos os animais, desde o mais primitivo até os mamíferos, detinham estas células. Para ele, portanto, estas células eram de vital importância na imunidade natural contra microorganismos invasores. Sua teoria contudo não foi muito aceita, pois, além de contrariar um dogma, Ehrlich e outros já haviam proposto um papel dos anticorpos e complemento na imunidade natural. Posteriormente, após comprovações experimentais, Metchinikoff mostrou a ação microbicida dos PMN. Foram feitas ainda comprovações mostrando a interação na imunidade natural entre fagocitose, anticorpos e complemento. A partir de Metchinikoff, inúmeros cientistas têm estudado as características e funções destas células.

É importante ressaltar que os PMN neutrófilos, além das funções fagocíticas e microbicidas, possuem funções relacionadas à modulação de resposta de outras células, seja através da produção de EROS ou ainda através da produção de citocinas (Gabrilovich e cols., 1994). A produção de peróxido de hidrogênio e a resposta associada à MPO têm

---

sido descritas em neutrófilos, assim como sua ação relacionada à diminuição da atividade microbicida de monócitos e atividade NK de linfócitos (El-Hag e Clark, 1987). Ativação de neutrófilos por vários fatores (antígenos HIV, citocinas, etc.) causa aumento na produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio que induzem a supressão da atividade funcional de linfócitos em pacientes infectados por HIV (Gabrilovich e cols., 1993). Simultaneamente, o aumento na produção de algum fator solúvel, ainda indefinido, pelos neutrófilos induz a produção de TNF por monócitos, nos mesmos pacientes. E a modulação da resposta por neutrófilos é associada à progressão da doença (Gabrilovich e cols., 1993). Shau e Golub, em 1990, também descreveram a liberação de TNF por neutrófilos íntegros e viáveis modulando a resposta citotóxica de linfócitos. Bazzoni e cols. (1991) descreveram a liberação de IL-8 por neutrófilos. A liberação de citocinas por neutrófilos sugere que exista um sistema autócrino para auto-ativação das defesas do hospedeiro contra agentes invasores (Djeu e cols., 1990).

Os neutrófilos são responsáveis por uma resposta rápida e aguda a organismos invasores. A descoberta de que neutrófilos liberam TNF e IL-8 sugere que eles devam exercer uma função maior na resposta imune do que o papel até então descrito. É possível que estas células não sejam passivas e simplesmente efetoras finais que respondem à ação de citocinas liberadas por outras células, mas que elas próprias participem efetivamente da resposta imune contra microorganismos, via liberação de citocinas (Djeu cols., 1990).

Apenas em 1933, surgiram dois trabalhos que descrevem o aumento no consumo de oxigênio acompanhado de estimulação fagocítica de PMN. Baldrige e Gerald usaram o consumo de oxigênio para determinar se a fagocitose era um fenômeno puramente físico ou biológico que requer energia (Hallet, 1989). Foi descoberto que os fagócitos móveis (neutrófilos, eosinófilos ou monócitos) encontram seus alvos por quimiotaxia, processo pelo qual os fagócitos respondem a gradientes de concentração de certas substâncias (fatores quimiotáticos) liberados às

margens do microorganismo invasor ou na região do foco inflamatório, e migram em direção a sua fonte. Após encontrar o alvo, o processo de fagocitose tem início (para revisão ver Babior, 1978). A invasão de um tecido por uma bactéria patogênica resulta na produção de um exsudato inflamatório, o qual, numa fase inicial, contém um número abundante de granulócitos, que migram para o foco inflamatório devido a um incremento na concentração de moléculas quimiotáticas. Esse processo é mediado por receptores específicos presentes nas membranas dos PMN. As células circulantes respondendo aos agentes quimiotáticos marginam às paredes do vaso sangüíneo no *locus* inflamatório, aderem às células endoteliais através de proteínas de adesão, migram entre elas, atravessam a lâmina basal e chegam ao tecido conectivo por diapedese. Um dos mais potentes quimioatraentes liberados é o C5a, gerado pelo caminho do complemento. Peptídeos difusíveis ou proteínas desnaturadas resultantes de ação proteolítica no sítio inflamatório, lipídeos de origem bacteriana, peptídeos hidrofóbicos N-formilados derivados de dano bacteriano, derivados do ácido araquidônico também contribuem. O maior papel dos neutrófilos no sítio inflamatório parece ser a fagocitose, morte dos microorganismos invasores e a destruição e *clearance* do material celular. No sítio inflamatório, os PMN fagocitam o material derivado de dano celular e qualquer microorganismo que tenha sido reconhecido através da opsonização pelo sistema imune humoral. Partículas cobertas com imunoglobulinas ou fração C3b proveniente da hidrólise da fração C3 do complemento, são reconhecidas pelos PMN e fagocitadas (Hallet, 1989).

Após ser fagocitado e internalizado em vesículas, formando o fagossomo primário, tem início a destruição do agente invasor. Este processo envolve dois eventos celulares: degranulação e *burst* respiratório.

Os fagócitos possuem inúmeras características comuns, entretanto, apresentam nuances em suas funções. Os PMN, além da capacidade fagocítica, têm grânulos intracelulares ricos em enzimas digestivas, que

possuem função de destruir agentes invasores. Existem três tipos de grânulos: os azurófilos, ricos em mieloperoxidase, os secundários e os terciários. Os PMN e outros fagócitos possuem também a capacidade de gerar ânion superóxido, através de um complexo enzimático presente em suas membranas, o complexo NADPH oxidase (para revisão ver Babior, 1978).

#### *ORIGEM, CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO DOS LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES NEUTRÓFILOS:*

Na medula óssea a *stem cell*, ou célula progenitora primordial, tem capacidade de auto-renovação e diferenciação com comprometimento com uma linhagem de progenitores, em resposta à ação de interleucinas específicas presentes no microambiente medular. A IL-3 é uma interleucina que atua na *stem cell* levando-a a diferenciar-se em células progenitoras multipotentes, CFU-GEMM. Na presença de GM-CSF, elas sofrem comprometimento com a linhagem granulomonocítica (CFU-GM). As CFU-GM, sob ação do G-CSF, sofrem comprometimento com a linhagem granulocítica, que são os precursores dos PMN segmentados circulantes (Dexter cols., 1988; Nathan, 1988; Hoffbrand e Pettit, 1993).

O desenvolvimento dos PMN na medula óssea tem sido classicamente dividido em seis estágios (mieloblasto, promielócito, mielócito, metamielócito, bastonete e polimorfonuclear segmentado) distinguíveis através da coloração de Romanovsky de extensões de aspirado de medula com base no tamanho celular, morfologia nuclear e conteúdo de grânulos (Bainton, 1995; Bainton e cols., 1971).

O mieloblasto, que é a célula mais jovem da série neutrofílica, é relativamente pequeno (cerca de 10 $\mu$ ), apresenta relação núcleo:citoplasma alta e nucléolos proeminentes, não possui grânulos azurófilos e contém muitas mitocôndrias.

O promielócito tem cerca de 15 $\mu$  de tamanho, núcleo arredondado, grande número e de tamanho variável de grânulos peroxidase positivo, os

quais correspondem aos grânulos azurófilos vistos na microscopia de luz (Bainton, 1995; Bainton e cols., 1971). Possui uma região grande correspondente ao complexo de Golgi e quantidade moderada de retículo endoplasmático. Os grânulos azurófilos, embora reativos para peroxidase, apresentam variações em sua forma e tamanho. Duas formas principais são encontradas: redonda (diâmetro  $500\mu$ ) e ovalada (diâmetro  $300 \times 900 \mu$ ), havendo predominância da forma redonda. O aparato secretório (retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi) do promielócito é positivo para a reação de peroxidase, porém sua positividade é menos intensa do que nos grânulos (Bainton e cols., 1971).

O mielócito é menor do que o promielócito ( $10\mu$ ), pode ser reconhecido por seu núcleo característico, um proeminente complexo de Golgi e populações mistas de grânulos peroxidase positivo ou negativo. Os grânulos peroxidase negativo que surgem nesta fase maturativa dos PMN são os grânulos secundários ou específicos. Eles variam em tamanho e forma, mas tipicamente aparecem como esferas (cerca de  $200\mu$ ) ou bastões ( $130 \times 1000\mu$ ). O conteúdo destes grânulos é homogêneo, de baixa densidade e sem atividade peroxidásica.

O complexo de Golgi do mielócito é grande e não reativo para peroxidase, assim como os elementos do aparato secretório. Os únicos elementos peroxidase positivo presentes neste e nos estágios subseqüentes são os grânulos azurófilos (Bainton e cols., 1971).

Os metamielócitos, bastonetes e neutrófilos segmentados são células que não sofrem divisão, não secretórias, as quais são identificadas por sua morfologia nuclear, população mista de grânulos, região de Golgi inativa, e acúmulo de partículas de glicogênio. O número de grânulos presentes nestes estágios é muito grande, com cerca de duas vezes mais grânulos específicos do que azurófilos.

Os neutrófilos segmentados do sangue periférico são geralmente semelhantes aos da medula óssea quando obtidos por métodos que envolvem o mínimo de manipulação e trauma às células. Quando outros métodos de isolamento de PMN são utilizados, envolvendo uso de

agentes químicos ou choques osmóticos (heparina, EDTA, lise por  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , ou dextran) mais variações são observadas no tamanho, forma e número de grânulos presentes, assim como a intensidade da reação de peroxidase nos grânulos azurófilos também sofre variações (Bainton e cols., 1971; Bainton, 1995).

#### *CONTEÚDO DOS GRÂNULOS:*

##### *GRÂNULOS AZURÓFILOS:*

Os grânulos primários presentes nos PMN são assim chamados devido ao aparecimento em fases iniciais do processo de granulopoiese, ou azurófilos com base nas propriedades histoquímicas. Estes grânulos contêm toda a MPO celular, proteínas catiônicas de baixo peso molecular (que podem diretamente incrementar a permeabilidade vascular, liberar histamina, amplificar a fagocitose ou exacerbar a atividade microbicida), hidrolases ácidas ( $\beta$ -glicuronidase, fosfatase ácida,  $\alpha$ -manosidase, N-acetil- $\beta$ -glicosaminidase) e proteases neutras. As últimas duas categorias parecem ter funções digestivas, assim como funções bactericidas. Com relação à destruição tecidual observada em reações inflamatórias, o conteúdo mais importante do grânulo azurófilo são as proteases. Há três enzimas lisossomais bem definidas nos grânulos azurófilos de neutrófilos: a elastase, a catepsina G e a catepsina D.

A elastase, uma protease de serina com peso molecular de 34 KD, hidrolisa substratos típicos da elastase pancreática e uma variedade de preparações de elastina de muitas fontes.

A catepsina G, com peso molecular de 32 KD, hidrolisa proteoglicanos de cartilagem e colágeno insolúvel. Finalmente a catepsina D de peso molecular de 42 KD, cliva leucocininogênios e gera leucocininas farmacologicamente ativas, podendo clivar proteoglicanos. Estas proteases neutras podem exacerbar processos inflamatórios por gerar

fatores quimiotáticos da fração do complemento C5 (Dewald e Baggiolini, 1986; Holtzman, 1989).

Foram determinadas com base na velocidade de sedimentação e sedimentação em gradiente de sacarose duas populações de grânulos azurófilos: a população com velocidade de sedimentação mais lenta contém mais mieloperoxidase, protease neutra e  $\beta$ -glicuronidase, enquanto que a população mais rápida contém mais lisozima. Além disso, os grânulos mais densos liberam elastase durante a degranulação, enquanto que os menos densos não o fazem. Esses tipos de grânulos também têm distribuições diferentes de glicosidases. Usando critério morfológico, através de microscópio eletrônico de transmissão de alta voltagem, têm sido observadas três formas de grânulos azurófilos (Smolen, 1989).

#### *GRÂNULOS ESPECÍFICOS:*

Grânulos específicos ou secundários aparecem no estágio de mielócito da granulopoiese. Eles contêm lisozima, que hidrolisa proteoglicanos de parede de células de algumas espécies bacterianas; colagenase, que quando combinada com protease neutra pode hidrolisar fibrilas de colágeno; vitamina B12 ligada à proteína e lactoferrina, que é uma proteína ligadora de ferro com propriedades bacteriostáticas (Smolen, 1989; Holtzman, 1989). A lactoferrina e a vitamina B12 ligada à proteína são constituintes exclusivos dos grânulos específicos, sendo portanto utilizadas como marcadores (Dewald e Baggiolini, 1986).

#### *GRÂNULOS TERCIÁRIOS:*

Tem sido relatada uma população de grânulos terciários, os quais co-sedimentam com grânulos secundários, na maioria dos protocolos preparativos. Ainda não existem estudos substanciais sobre este tipo de

grânulo na secreção de neutrófilos, pela dificuldade de resolução com os grânulos específicos, contudo sabe-se que eles contêm gelatinase. As membranas dos grânulos terciários também parecem ter algumas glicoproteínas que têm sido implicadas no processo de adesão celular. *Fosfatosomas*, que contêm fosfatase alcalina, têm também sido isolados de neutrófilos, porém, sua relação com os grânulos terciários que contêm gelatinase permanece desconhecida (Smolen, 1989; Wright, 1988; Holtzman, 1989).

#### *FAGOCITOSE:*

O reconhecimento de microorganismos por fagócitos ocorre devido à presença de opsoninas em sua superfície. Estas opsoninas responsáveis pela interação microorganismo-célula fagocítica são imunoglobulinas da classe IgG, principalmente IgG1 e IgG3 e o complemento, principalmente a fração C3. Após o reconhecimento inicia-se o processo de ingestão (Sheterline, 1989; Stossel, 1974a; Holtzman, 1989).

O fagócito emite pseudópodes que participam da aderência e posterior internalização do agente para o citoplasma da célula, formando o fagossomo (Stossel, 1974b). Durante o processo de ingestão, grande parte da membrana plasmática é internalizada no fagossomo e é necessária a sua auto-renovação, utilizando colesterol. Os lisossomos se deslocam em sua direção e se fundem formando o fagolisossomo. A partir da interação da membrana com o agente formam-se substâncias microbicidas, dependentes e independentes do oxigênio (Athens, 1993; Stossel, 1974b).

As substâncias independentes do oxigênio podem resultar da degranulação de PMN, com liberação de hidrolases ácidas e neutras, lisozima, fosfatidilcolina, lactoferrina e colagenase (Rosen e cols., 1995).

As substâncias microbicidas dependentes de oxigênio podem ser formadas independentemente ou mediadas por MPO, que se encontra

presente em elevadas concentrações nos grânulos azurófilos de PMN (Winterbourn e cols., 1992).

#### **DEGRANULAÇÃO:**

A degranulação é um processo de fusão entre o fagossomo primário e os grânulos presentes no citoplasma dos fagócitos. Estes grânulos possuem material que participa da degradação e da morte bacteriana. Durante a degranulação este material é liberado junto ao microorganismo ingerido (para revisão ver Babior, 1978; Holtzman, 1989). Ocorre a liberação do conteúdo dos grânulos no exterior da célula, durante a ingestão da partícula, usualmente devido a uma degranulação prematura junto aos fagossomos que ainda estão abertos na superfície celular. A degranulação extracelular extensiva pode ocorrer em alguns casos patológicos ou em sistemas experimentais. Por exemplo, os fagócitos podem tentar ingerir partículas de tamanho excessivo, como grandes complexos imunes ou superfícies opsonizadas. A fagocitose então não se completa, porém, a degranulação é estimulada, com descarga extracelular dos conteúdos dos grânulos (Cross and Jones, 1989). Esses processos são importantes na iniciação e exacerbação dos processos inflamatórios, como na artrite reumatóide e no lupus eritematoso sistêmico. Em sistemas experimentais, para estudo desses processos *in vitro*, os PMN apresentam a capacidade fagocítica bloqueada pela presença de citocalasina B, um alcalóide de origem fúngica que rompe os microfilamentos de actina e miosina essenciais para o processo. A superfície destas células pode ser estimulada por uma variedade de agentes, como partículas, opsoninas, lecitinas, fatores quimiotáticos solúveis, levando a secreção do conteúdo dos grânulos. Assim a citocalasina B converte os PMN de células fagocíticas a modelos experimentais de células secretórias; como consequência é possível monitorar extracelularmente um processo que normalmente ocorre

intracelularmente (Smolen, 1989; Di Virgilio e cols., 1989; Stossel, 1974b; Holtzman, 1989).

O processo de degranulação é desencadeado por resposta acoplada a estímulo. Uma variedade de estímulos solúveis e particulados podem provocar a secreção dos neutrófilos. Estímulos que desencadeiam a resposta mediada por receptores incluem os imune complexos, LTB<sub>4</sub>, FMLP, PAF, C5a, partículas de Zy opsonizado. Estímulos que independem de receptor incluem o PMA e ionóforos de cálcio. Os estímulos podem induzir diferentes liberações dos grânulos, por exemplo, o PMA estimula a liberação somente de grânulos específicos e terciários enquanto tem efeito marginal na liberação de grânulos azurófilos (Tauber, 1987). Peptídeos quimiotáticos, por sua vez, causam secreção de todos os três tipos de grânulos. Nos últimos anos têm se tornado claras as bases para esta seletividade. Enquanto o PMA potencialmente estimula a PKC, não aumentando a concentração intracelular de cálcio, peptídeos quimiotáticos atuam em todos os caminhos ativadores. Assim, é possível especular que os três tipos de grânulos possuem diferentes requerimentos para a secreção. A necessidade de aumento na concentração intracelular de cálcio é cinco vezes maior para a secreção de grânulos azurófilos em relação a grânulos específicos e terciários (Cooke e cols., 1989). Um estímulo completo induz a liberação do conteúdo de ambos os grânulos específico e azurófilo. Com relação a cinética da degranulação, a descarga do conteúdo dos grânulos junto ao fagossomo, observada por microscopia eletrônica, mostra que os grânulos específicos são descarregados antes dos grânulos azurófilos. A esse processo foi dado o nome de degranulação seqüencial (Stossel, 1974b; Cockcroft, 1989; Holtzman, 1989).

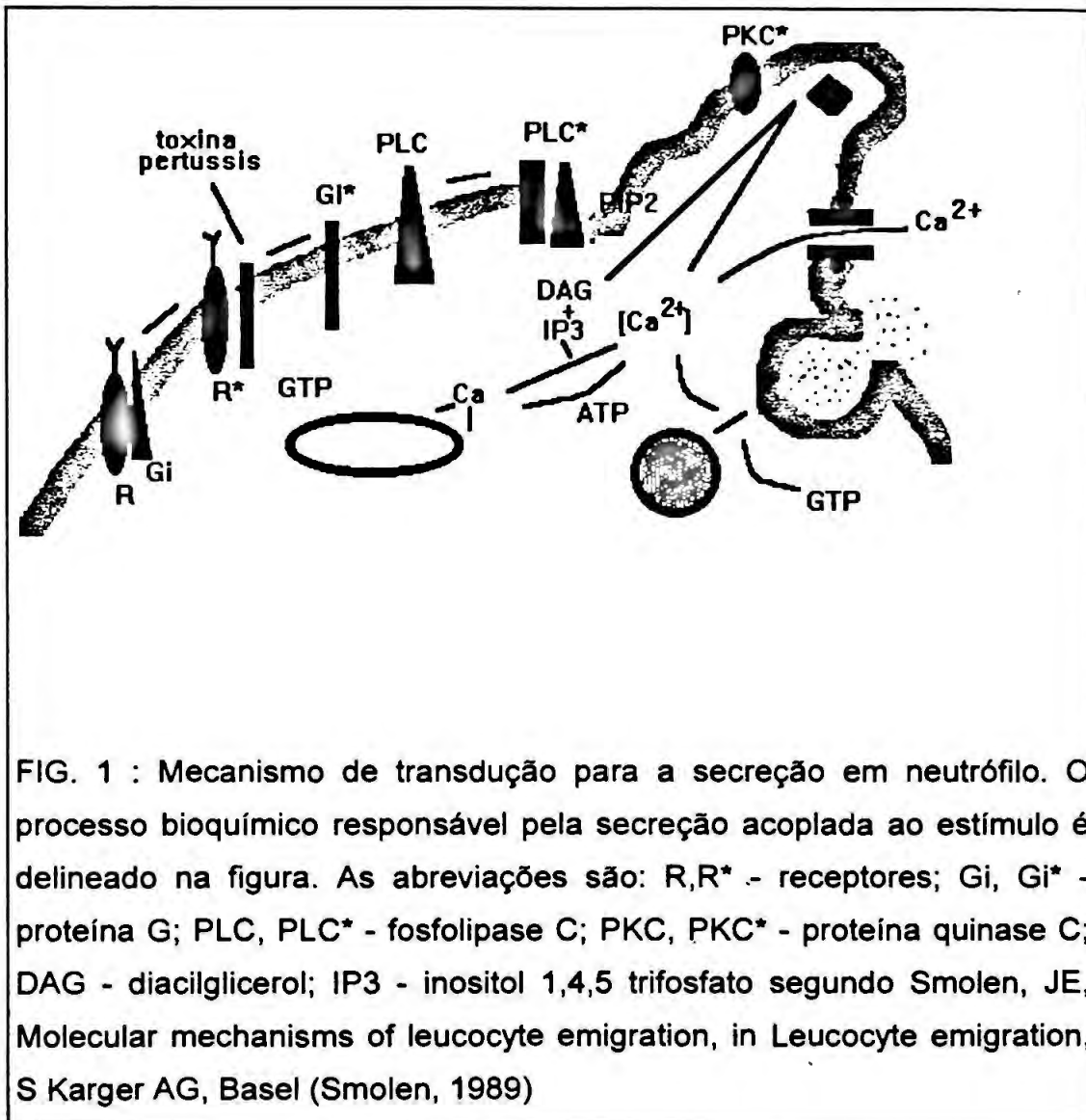
Para a estimulação do processo de degranulação, o passo inicial geralmente envolve a interação ligante-receptor, ou alguma outra perturbação direta na superfície celular. A cinética de interação receptor-ligante parece ser rápida quando um estímulo solúvel é empregado. Foi estimado que 20% dos receptores de peptídeos quimiotáticos

---

necessitavam estar ocupados para que um ótimo de resposta secretória fosse obtida. Após a interação com o receptor, ocorre ao nível da membrana plasmática a ativação da proteína G que por sua vez ativa a fosfolipase C, que hidrolisa o seu substrato, o fosfatidilinositol 4,5 bifosfato, formando dois importantes segundos mensageiros: o DAG e o IP3 (Cockcroft, 1989).

O IP3 libera cálcio dos estoques intracelulares, provavelmente presentes no retículo endoplasmático, aumentando sua concentração intracelular, que induz a degranulação. Deve-se observar que o PMA não aumenta as concentrações intracelulares de cálcio, uma vez que ele ativa diretamente a PKC, sendo sua estimulação feita por outra via não mediada por receptor, não havendo produção de IP3. Acredita-se que o PMA reduz o Km de reação do cálcio para o seu receptor putativo, a PKC, que poderia assim, ser ativada por níveis basais de cálcio intracelular (Castagna e cols., 1982; Smolen, 1989) (FIG. 1).

O citoesqueleto celular é constituído por microfilamentos e microtúbulos que conferem as características estruturais da célula. Os microfilamentos são constituídos por actina e miosina, na forma de gel, por estarem polimerizados. Os microtúbulos são constituídos por polímeros de tubulina com forma de cilindros. Com o aumento intracelular de cálcio ocorre a despolimerização da tubulina e a ativação da gelsolina, enzima que encurta os filamentos de actina, resultando em diminuição da viscosidade e permitindo aos grânulos acesso à membrana plasmática (Smolen, 1989).

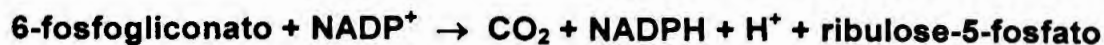
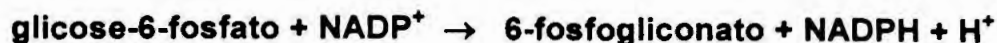


### "BURST" RESPIRATÓRIO:

O termo *burst* respiratório se refere a uma série de eventos metabólicos coordenados que acontecem quando os fagócitos são expostos a estímulos apropriados. Este grupo de eventos dependente de oxigênio delimita a morte bacteriana por fagócitos. O primeiro evento descoberto foi um incremento no consumo de oxigênio que ocorria com os fagócitos estimulados. O consumo de oxigênio por células no estado basal varia de acordo com o tipo celular - PMN, por exemplo, consomem pouco oxigênio, ainda que em ambientes ricos em oxigênio, enquanto que macrófagos alveolares possuem um pesado consumo de oxigênio decorrentes das reações mitocondriais para produção de energia. Todos, entretanto respondem a um estímulo apropriado com aumento do consumo de oxigênio (para revisão ver Babior, 1978; Halliwell, 1989).

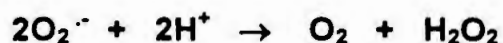
Inicialmente foi proposto que o aumento no consumo de oxigênio ocorria para a produção de energia necessária a fagocitose. Sbarra e Karnovsky (1959), entretanto, mostraram que, independente da concentração de oxigênio, a fagocitose ocorria, e demonstraram que o aumento na captação de oxigênio era insensível aos inibidores da respiração mitocondrial. Posteriormente, Iyer, Islam e Quastel (1959) mostraram que parte do oxigênio consumido quando os fagócitos eram estimulados, era convertida em peróxido de hidrogênio. Eles propuseram que o peróxido de hidrogênio fosse usado como agente bactericida, e assim foram os primeiros a fazer a conexão entre o *burst* respiratório e os mecanismos microbicidas da fagocitose.

A estimulação dos fagócitos estava também associada a um aumento da oxidação da glicose, via hexose monofosfato. A hexose monofosfato é o caminho metabólico pelo qual a glicose é oxidada a dióxido de carbono e a um açúcar de cinco carbonos, com o NADP<sup>+</sup> servindo como aceptor de elétrons.



Nos PMN, a oxidação da glicose por este caminho é limitada pela velocidade de produção do  $\text{NADP}^+$  através da oxidação do NADPH. A ativação desta via significa que a oxidação do NADPH a  $\text{NADP}^+$  aumenta durante o *burst* respiratório.

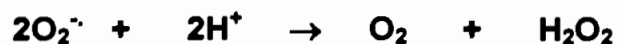
Outro evento do *burst* respiratório é a produção de ânion superóxido (para revisão ver Babior, 1978). Este composto, formado pela redução de um elétron do oxigênio, despertou interesse no metabolismo do oxigênio desde a descoberta da superóxido dismutase, uma enzima que catalisa a dismutação do ânion superóxido pela reação:



O *burst* respiratório consiste de quatro eventos: ativação da via da hexose monofosfato, aumento na captação de oxigênio, produção de ânion superóxido, peróxido de oxigênio. Todos esses eventos ocorrem quando os fagócitos são expostos a estímulos. Os quatro eventos apesar de ocorrerem separadamente dependem da ativação de um sistema enzimático, que catalisa a redução do oxigênio a ânion superóxido utilizando o NADPH como doador de elétrons. Todo o ânion superóxido gerado e todo o oxigênio consumido no *burst* resultam diretamente da atividade deste sistema; o peróxido de hidrogênio gerado e a ativação da via das pentoses são conseqüências secundárias desta atividade.

As reações responsáveis pela formação de  $\text{O}_2^{\cdot -}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  do *burst* são as seguintes:





Este sistema enzimático é conhecido como NADPH oxidase. Alguns autores têm proposto que o nome correto deste sistema é *burst* respiratório oxidase (Clark e cols., 1990). Esta oxidase está alterada em uma patologia hereditária, a doença granulomatosa crônica (DGC), cujo estudo tem revelado muito sobre o sistema enzimático (Cross e Jones, 1989).

#### OS COMPONENTES DO SISTEMA NADPH OXIDASE:

Têm sido identificados quatro componentes da oxidase, dois ligados à membrana, citocromo  $b_{558}$  (gp 91<sup>phox</sup>) e uma flavoproteína, FAD (p22<sup>phox</sup>) e dois componentes citosólicos, p47<sup>phox</sup> e p67<sup>phox</sup>. O citocromo  $b_{558}$  de PMN em estado basal está localizado na membrana plasmática e principalmente nos grânulos específicos e vesículas intracelulares. Com a ativação celular, estas organelas se fundem com a membrana plasmática translocando o citocromo à superfície da célula. O citocromo  $b_{558}$  forma um complexo com FAD. A dissociação deste complexo culmina com a perda de atividade do sistema enzimático.

Os dois componentes citosólicos - p47 e p67 nos PMN - se encontram sob forma complexada com quantidades equimolares das duas proteínas e que também se apresentam isoladas. Durante a ativação neutrofilica, se comportam diferentemente (Chanock e cols., 1994). Tem sido proposto que estes componentes citosólicos sejam translocados à membrana plasmática durante a ativação dos neutrófilos (Clark e cols., 1990).

Para a ativação do complexo enzimático também estão envolvidas proteínas citosólicas ligadas ao GTP. As proteínas p47 e p67 parecem ser proteínas ligadas ao GTP, uma vez que a p47 possui um aparente domínio de ligação e ambas p47 e p67 se ligam ao GTP-agarose (Taylor e Shappel, 1994; Clark e cols., 1990). Purificação de citocromo  $b_{558}$  levou

ao isolamento de uma proteína de 22 KDa, também ligada ao GTP e que tem função na ativação do sistema oxidase (Chanock e cols., 1994).

A figura 2 mostra o modelo de ativação do sistema NADPH oxidase proposto por Jesaits e cols., 1991.

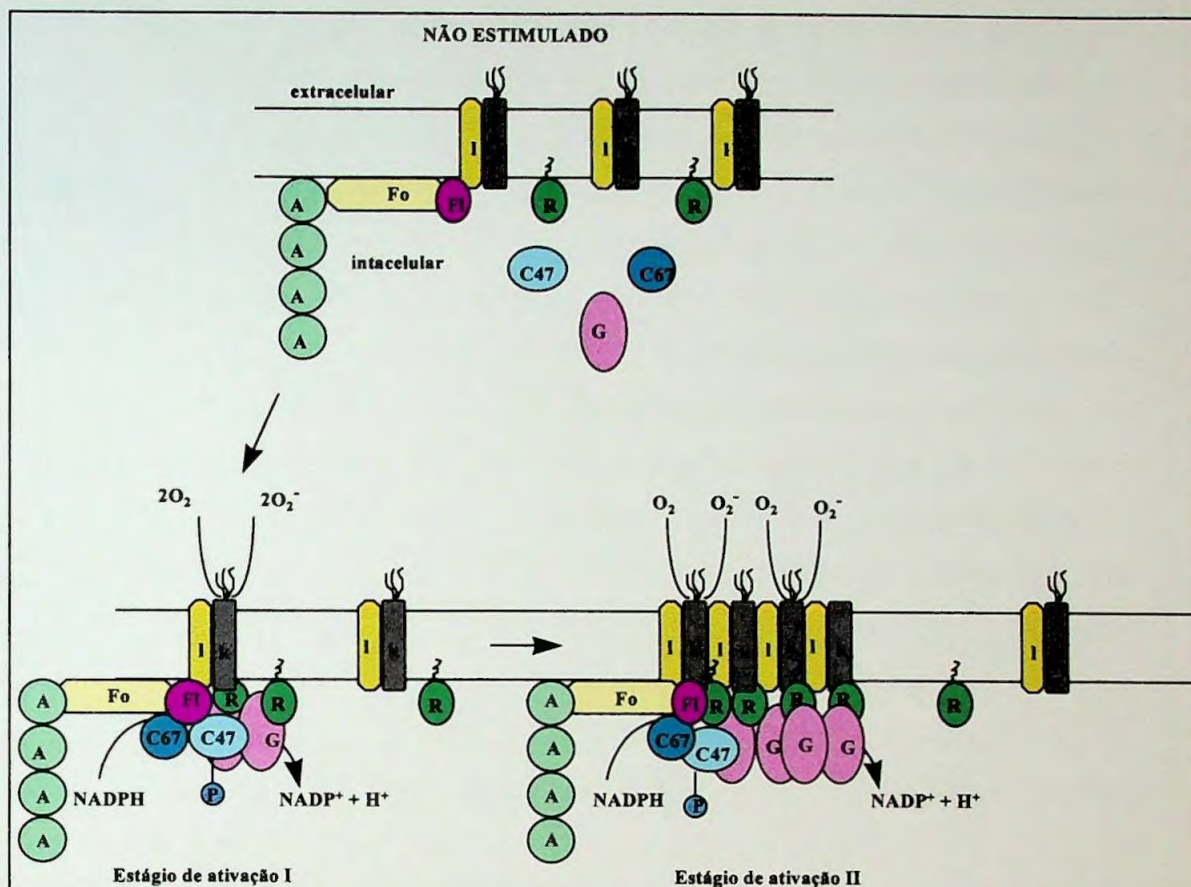


FIG. 2: Modelo proposto por Jesaits e cols. (1991) para a estrutura da membrana de células geradoras de  $O_2^-$ . Estão representados modelos para um estágio não estimulado assim como dois estágios de ativação. Os componentes mostrados incluem fodrina (Fo, 475kDa), actina (A, 43kDa), flavoproteína (FI, 45kDa), proteína citosólica de 67 kDa (C67), Rap1A (R, 22kDa), proteína citosólica não caracterizada (G, 125kDa), citocromo-b cadeia pesada (k, 91kDa, glicosilada), e citocromo-b cadeia leve (l, 22kDa). No estágio não estimulado, somente FI pode se associar com o citoesqueleto. A Fo pode ou não estar pré-associada, em um microdomínio separado da membrana, a k-l. Durante o estágio I de ativação, C47 torna-se fosforilada (P) e juntamente ao C67 associa-se com complexos de A, Fo, FI, permitindo a k-l e R entrar no domínio da membrana enriquecido de flavina e interagir com o resto do complexo. Superóxido é então produzido pela transferência de elétrons da NADPH para o  $O_2$  através da via FI-k-l. G pode facilitar a interação por se ligar a R. No estágio II, grupos de citocromo b aproximam seus hemes, que podem então expor um elétron para as relativamente raras moléculas de  $O_2$  ligadas a eles a partir da FI e através de um tunelamento de elétrons pela região hidrofóbica da proteína.

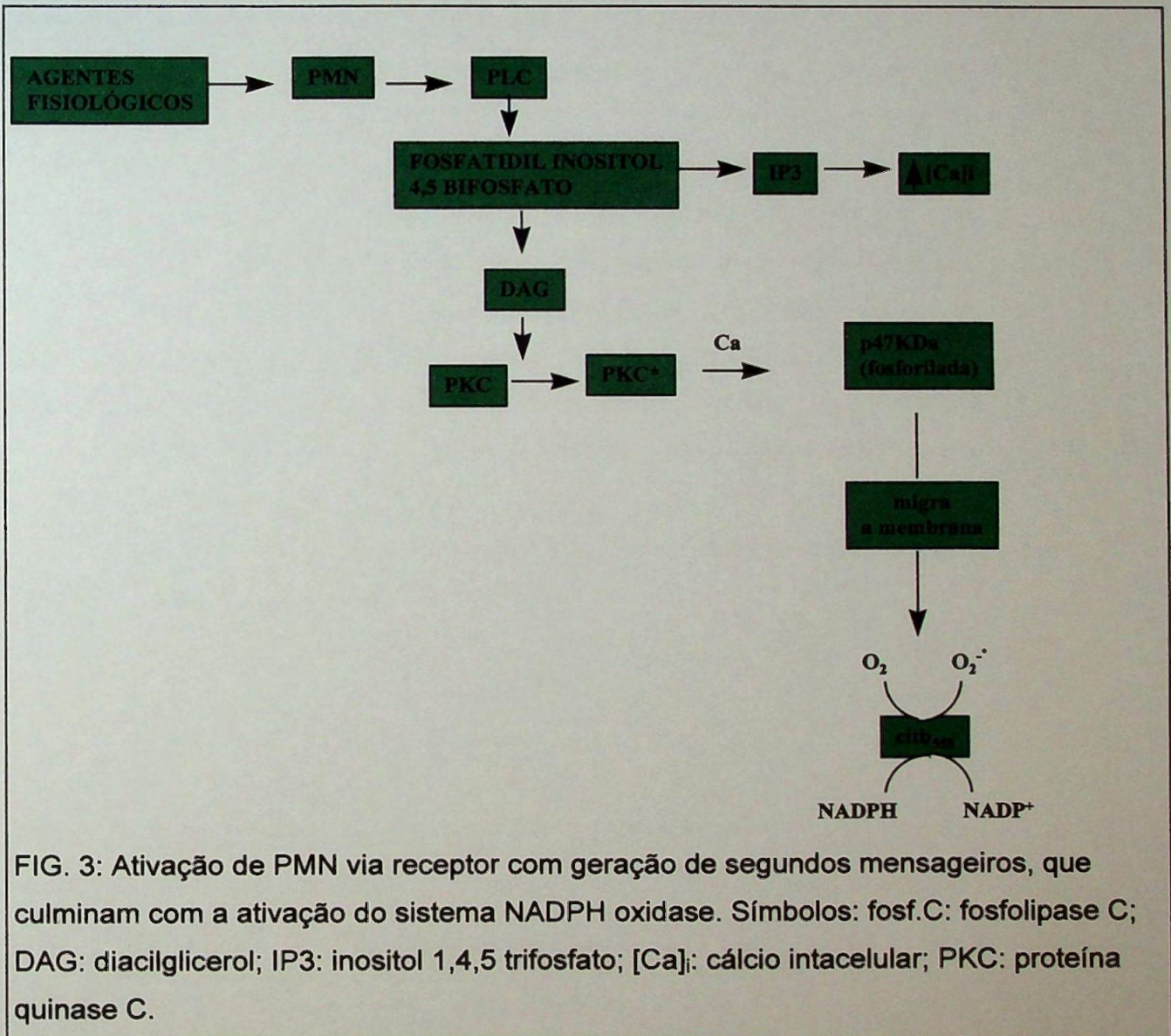
A atividade enzimática da célula estimulada localiza-se na fração da membrana que contém o cit  $b_{558}$ . Acredita-se que o cit  $b_{558}$  seja o doador de elétrons terminal que reduz a molécula de oxigênio a ânion superóxido (Chanock e cols., 1994). O citocromo b parece ser o sítio de integração de dois outros componentes para a geração de ânion superóxido, um deles é o Rap1A que se liga a membrana através de uma proteína e cuja interação com o citocromo depende de nucleotídeos de guanina com função ainda desconhecida. O outro é a proteína citosólica p47 que se torna fosforilada nas células ativadas. Durante o processo de ativação, esta proteína é translocada à membrana juntamente com a proteína p67. Foi proposto por Clark e cols. (1987) que o citocromo  $b_{558}$  residia principalmente na membrana de grânulos de PMN não estimulados e que estes também sofreriam um processo de translocação junto à membrana plasmática durante o processo de ativação, aparentemente pela fusão da membrana que ocorreria durante a degranulação (Nacache e cols., 1989).

#### *MECANISMOS DE ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS:*

A ativação de fagócitos pode ocorrer por mecanismos mediados ou não por receptor. Os estímulos tipicamente mediados por receptor são C5a, FMLP, complexos imunes, Zy opsonizado (paredes de leveduras), bactérias opsonizadas, esferas de látex opsonizadas. Os estímulos que independem de receptor incluem os ácidos graxos insaturados de cadeia longa, o PMA, os ionóforos de cálcio, DAG, etc. (Naccache e cols., 1989).

A ativação, que segue exposição ao estímulo por 30 a 60 segundos, não requer fagocitose, nem degranulação, mas simplesmente o contínuo contato com o estímulo. A remoção do estímulo desativa a oxidase, que pode ser reativada por uma segunda exposição ao estímulo. Agentes fisiológicos estimulam os PMN, assim como estímulos exógenos, não fisiológicos, úteis para estudo e avaliação do comportamento do *burst* respiratório celular. Os agentes fisiológicos ativam a fosfolipase C, por intermédio de receptores ligados a proteína G, que sofrem mudanças

conformacionais ativando as fosfolipases. A fosfolipase C cliva o fosfatidilinositol 1,4 bifosfato presente na membrana plasmática gerando o IP3 e o DAG, que são segundos mensageiros intracelulares. O IP3 atua no retículo endoplasmático por mecanismos desconhecidos, liberando cálcio dos estoques intracelulares, conseqüentemente aumentando sua concentração. O DAG, por sua vez, atua na PKC, ativando-a. A PKC ativada leva a fosforilação da proteína citosólica de 47 KDa, que migra junto à membrana com a proteína p67. Na membrana as duas proteínas se ligam ao citocromo b<sub>558</sub>, ativando o sistema oxidase que reduz o oxigênio a ânion superóxido utilizando o NADPH como doador de elétrons. Alguns estímulos como o FMLP e o Zy opsonizado atuam também ativando a fosfolipase C. Outros estímulos como os ésteres de forbol (PMA) e ionóforos de cálcio atuam em estágios posteriores ativando diretamente a PKC (Heyworth e Badwey, 1990). A figura 3 mostra a ativação dos PMN segundo texto de Heyworth e Badwey, 1990.



A PKC tem papel chave na ativação do sistema oxidase. Na presença de PMA, a PKC é ativada mas não ocorre aumento na concentração intracelular de cálcio. É sugerido que o PMA aumente a afinidade da enzima por cálcio e por fosfolipídeos e que a enzima possa ser ativada na presença de concentrações basais de cálcio (Castagna e cols., 1982).

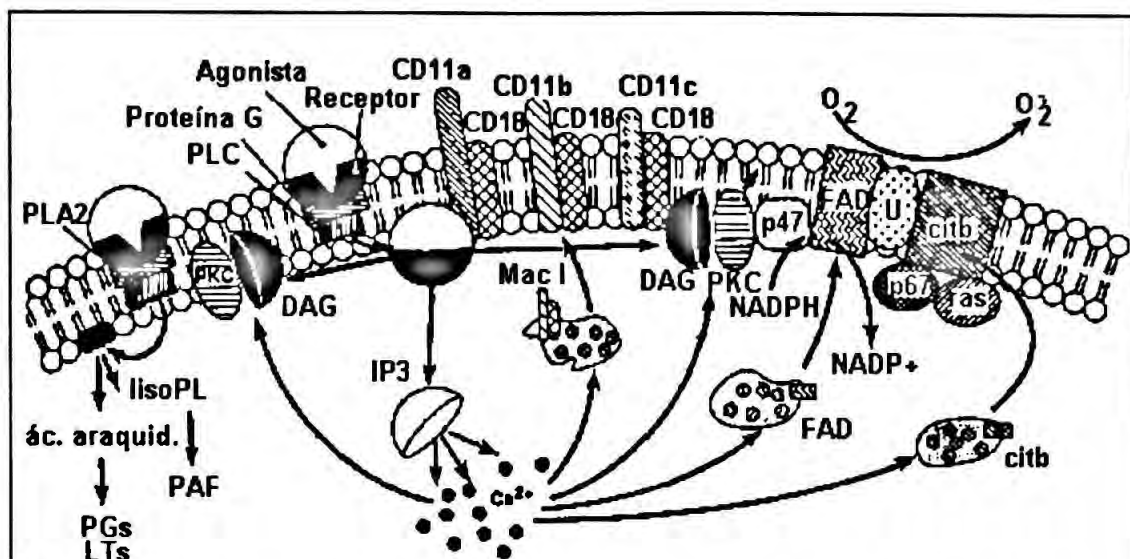
Foi proposto por Heyworth e Badwey que a PKC possua dois domínios, um catalítico e um regulatório. No domínio regulatório se ligariam pseudosubstratos e provavelmente DAG, cálcio e fosfolipídeos. Já o domínio catalítico se liberaria da membrana, após clivagem por uma protease cálcio dependente, a calpaina. No citosol, o domínio catalítico seria ativado independentemente da presença de DAG, fosfolipídeo ou cálcio (Heyworth e Badwey, 1990). Há a hipótese de que existam outros mensageiros intracelulares independentes de cálcio, que seriam responsáveis pela ativação da PKC, porém eles ainda não foram identificados (Cooke e cols., 1989).

A figura 4, idealizada por Heyworth e Badwey, mostra o mecanismo de ativação proposto para a ativação de PMN.



Estímulos como FMLP, que atuam em receptores de membrana e que culminam por gerar segundos mensageiros, seguem caminhos diferentes de ativação celular quando comparados a estímulos que independem de receptores de superfície.

A figura 5 mostra os receptores da membrana plasmática de PMN para fatores quimiotáticos como FMLP, C5a e LTB<sub>4</sub>, embora ainda não caracterizados molecularmente, os receptores parecem acoplados à proteína G sensível a toxina pertussis e a enzima fosfolipase C. Estimulação destes receptores resulta na hidrólise de fosfatidilinositol com formação dos segundos mensageiros (IP<sub>3</sub> e DAG) (Taylor e Shapell 1994).



**FIG. 5:** Ligação de agonistas como FMLP, C5a e LTB4 a receptores de superfície da membrana plasmática levando a ativação da fosfolipase C (PL-C) por um processo acoplado a proteína ligada ao nucleotídeo de guanina (proteína G). PL-C catalisa a hidrólise de fosfoinositóis, como a fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2) com liberação de diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trifosfato (IP3). DAG ativa a proteína quinase C (PKC) enquanto que IP3 promove aumento na concentração de cálcio intracelular. Uma flavoproteína (FAD), um possível intermediário de ubiquinona (U) e um citocromo b (cyt b) contidos na membrana plasmática e em grânulos citoplasmáticos específicos translocados à membrana combinam com outros componentes como as proteínas p47 e p67 para formar o sistema NADPH oxidase ativado em PMN que são responsáveis pela formação de espécies reativas de oxigênio. Um processo dependente de PKC também parece ser responsável pela ativação da fosfolipase A2 (PLA2) que catalisa a liberação de ácido araquidônico, o precursor de prostaglandinas (PG) e leucotrienos (LT) e a formação do fator ativador de plaquetas (PAF) provenientes de lisofosfolípidos. Aumento no cálcio citosólico induz a translocação de CD11b/CD18 e glicoproteínas de adesão (Mac 1) estocadas em grânulos secundários e terciários no citosol. CD11a/ CD18 (IFA 1) não é encontrado em grânulos, mas é igualmente expresso e regulado na membrana plasmática.

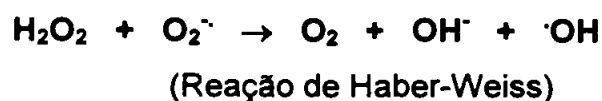
Foram propostos outros caminhos que culminam com a fosforilação da proteína de 47 KDa. Um deles é o da fosfolipase D, que hidrolisando a fosfatidilcolina, gera ácido fosfatídico. O ácido fosfatídico sofre fosforilações catalisadas pela enzima ácido fosfatídico fosforilase gerando DAG. O DAG em presença de ATP e Mg sofre ação da enzima DAG quinase gerando o fosfatidato que atua diretamente na fosforilação da proteína de 47 KDa (Hardy e cols., 1991).

A fosfolipase A<sub>2</sub> cliva a fosfatidilcolina, o fosfatidilinositol ou a fosfatidiletanolamina gerando AA que pode ativar o sistema oxidase diretamente em um sistema livre de células, assim como pode ser metabolizado via lipoxigenase gerando o LTB<sub>4</sub> e o 5HETE, que por sua vez, são capazes de se ligar a receptores de superfície celular, causando nova ativação da fosfolipase (Curnutte, 1985; Naccache e cols., 1989).

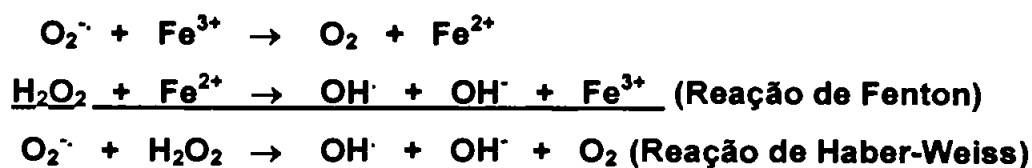
#### *FORMAÇÃO DE ESPÉCIES MICROBICIDAS:*

O processo de fagocitose, com conseqüente ativação do sistema NADPH oxidase leva a formação de ânion superóxido. A vesícula formada durante o processo de fagocitose é composta por membrana plasmática com componentes do sistema NADPH oxidase, expondo o microorganismo ou partícula fagocitada a um alto fluxo de ânion superóxido. A baixa reatividade do ânion superóxido em meio aquoso faz com que a atividade microbica não se deva exclusivamente a ele. A dismutação do ânion superóxido no fagossomo leva a formação de peróxido de hidrogênio (Halliwell, 1989).

O peróxido de hidrogênio formado pode atuar diretamente em inúmeras cadeias bacterianas com ação microbica. Entretanto, esta ação é limitada devido à presença de catalase em inúmeros microorganismos. O peróxido de hidrogênio pode participar da formação de radical hidroxila reagindo com ânion superóxido, através da reação de Haber-Weiss:



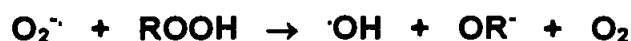
A reação de Haber-Weiss pode ser dividida em duas etapas. Na primeira, o ferro é parcialmente reduzido pelo ânion superóxido e, na segunda ele é oxidado pelo peróxido de hidrogênio (Halliwell, 1989).



A reação de Haber-Weiss é muito lenta e rara em condições biológicas (Rosen e cols., 1995), e pouco provável de ocorrer *in vivo* pois é necessária a presença de íons ferro que não estão disponíveis intra ou extracelularmente em neutrófilos (Halliwell, 1989). Alternativamente é possível que o peróxido de hidrogênio penetre no citoplasma bacteriano e forme radical hidroxila intracelularmente utilizando os íons ferro da própria bactéria (Halliwell, 1989).

Outros trabalhos propuseram mecanismos de formação de radical hidroxila mediado por MPO (Candeias e cols., 1993).

Foi sugerido também que PMN gerem radical hidroxila pela reação entre ânion superóxido e peroxi compostos.



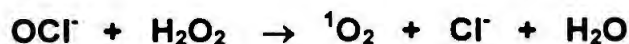
Os peroxi compostos são gerados pela peroxidação lipídica, que pode ocorrer na presença de peróxido de hidrogênio (para revisão ver Babior, 1978).

O peróxido de hidrogênio também pode atuar com função microbicida em associação com sistema MPO/Cl<sup>-</sup> (Halliwell, 1989; Rosen e Klebanoff, 1977). A disposição de cloretos é muito maior do que a de outro haleto no

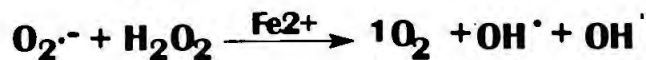
citoplasma do fagócito, por isso os cloretos são associados ao sistema MPO. A reação entre cloreto e peróxido de hidrogênio gera ácido hipocloroso, que é altamente reativo, oxidando muitas moléculas biológicas, especialmente grupos sulfidrila, tendo portanto potente ação microbicida (Halliwell, 1989).



O oxigênio singlete é outra espécie altamente reativa que tem sido implicada na atividade microbicida de fagócitos. O oxigênio singlete pode ser formado a partir da reação do peróxido de hidrogênio com ácido hipocloroso gerado pelo sistema MPO/Cl<sup>-</sup> (Rosen e Klebanoff, 1977; Halliwell, 1989).



Foi sugerido em 1970 por Anerson que o oxigênio produzido na reação de Haber-Weiss é o oxigênio singlete (Anerson, 1970).



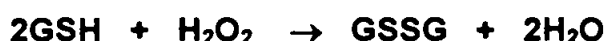
Alguns autores acreditam que a dismutação espontânea do ânion superóxido gere oxigênio singlete (para revisão ver Babior, 1978).



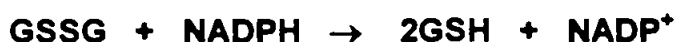
### **SISTEMAS DE PROTEÇÃO CONTRA ESPÉCIES REATIVAS:**

Como os oxidantes gerados pela oxidase são muito tóxicos, a atividade oxidase necessita ser finamente controlada (Chanock e cols., 1994). Os PMN estimulados com uma variedade de estímulos, ativam um sistema de transporte de elétrons multicomponente e transmembrana, gerando ânion superóxido que tem ação microbicida durante a ingestão fagocítica, mas que também contribui para a lesão tecidual durante uma variedade de condições inflamatórias (Taylor e Shapell, 1994).

A ativação da via da hexose monofosfato ocorre devido a um aumento na produção de  $\text{NADP}^+$ , gerado através de duas vias. Uma é a formação de ânion superóxido e a outra é através do sistema glutathiona peroxidase-glutathiona redutase que é responsável pela detoxificação de peróxido de hidrogênio, uma vez que o sistema catalase só é ativado em concentrações muito elevadas. Este sistema utiliza  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidando a glutathiona reduzida, através da enzima glutathiona oxidase:



A glutathiona oxidada gerada é reconvertida à glutathiona reduzida pela enzima glutathiona redutase, reação que gera  $\text{NADP}^+$  (para revisão ver Babior, 1978):



A catalase está presente em todos os órgãos do corpo, porém encontra-se especialmente concentrada nos eritrócitos e fígado; sua afinidade pelo peróxido de hidrogênio é baixa, sendo necessárias altas concentrações para que a reação ocorra (Halliwell, 1989).

A SOD é encontrada em mamíferos sob forma de duas isoenzimas, a SOD cobre-zinco citoplasmática e a SOD contendo manganês, localizada na matriz mitocondrial (Halliwell, 1989). Esta enzima é responsável pela dismutação do ânion superóxido, produzindo peróxido de hidrogênio e oxigênio (Grishan, 1992).

Existem também antioxidantes não enzimáticos que exercem importante papel na defesa de macromoléculas contra dano oxidativo das espécies geradas. Eles podem ser divididos em dois grupos: lipossolúveis e hidrossolúveis. Dentre os lipossolúveis podemos citar o  $\alpha$ -tocoferol, o  $\beta$ -caroteno e o ubiquinol-10. Dentre os hidrossolúveis podemos citar o ácido ascórbico, o ácido úrico e a glutatona (Stocker e Frei, 1991).

#### *MPO:*

Peroxidases têm a habilidade de catalisar a formação de uma variedade de intermediários altamente reativos. Estes incluem diversas categorias de radicais livres, espécies eletronicamente excitadas, como por exemplo carbonilas triplete e oxigênio singlete, e inúmeros compostos halogenados oxidados, como por exemplo o ácido hipocloroso e haloaminas (Kanofsky, 1991).

A MPO é uma peroxidase presente em grânulos azurófilos de PMN neutrófilos e em menor grau em grânulos de monócitos e macrófagos. A peroxidase de eosinófilos difere da MPO em sua estrutura primária, grupo prostético heme e atividade funcional (Klebanoff, 1991; Andrews e Krinsky, 1986).

A MPO é geralmente aceita como uma enzima dimérica, possuindo uma estrutura de subunidade tetramérica  $\alpha_2\beta_2$ , sendo duas subunidades pesadas idênticas (55-60 kDa), duas subunidades leves idênticas (10-15 kDa), com dois grupos prostéticos heme localizados na subunidade pesada  $\alpha\beta$ , carboidratos ligados à subunidade pesada e uma ponte dissulfeto entre as duas subunidades pesadas (Klebanoff, 1991; Andrews e Krinsky, 1986). Pesquisadores referem-se aos grupos heme como

sendo diferentes ou diferentes sítios ligantes heme dentro de uma única molécula de MPO (Klebanoff, 1991). O peso molecular da MPO nativa é estimado entre 135 a 150 kDa; quando submetida à redução sob condições desnaturantes, as quatro unidades são completamente dissociadas. Nestas condições o grupo prostético heme é encontrado associado à subunidade pesada. Se a MPO é fervida em SDS e filtrada em gel, o grupo heme pode estar associado a subunidade leve, o que sugere proximidade entre o grupo heme e a subunidade leve na enzima nativa. Se a MPO é submetida à redução e à alquilação em condições não desnaturantes, a enzima é dividida pela metade e uma hemi-MPO composta de uma subunidade pesada, uma subunidade leve, e presumivelmente um grupo heme é formada. A hemi-MPO apresenta as mesmas atividades catalíticas, regulação de substrato e espectro heme da enzima nativa (Andrews e Krinsky, 1986).

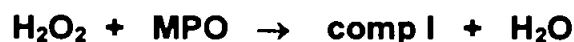
#### *MECANISMO CATALÍTICO:*

Estados diferentes de oxidação do grupo heme da MPO são acessíveis a substratos fisiológicos. No seu estado nativo, o heme é férrico. A oxidação de dois elétrons pelo peróxido de hidrogênio ou HOCl gera o composto I, que é relativamente instável. A redução de um elétron do composto I gera o composto II, com reação apresentando  $t_{1/2} = 2$  a  $7 \text{ s}^{-1}$ . O mecanismo de redução espontânea do composto I não é conhecido, mas não parece envolver comprometimento intramolecular entre uma subunidade  $\alpha\beta$  da MPO férrica com outra subunidade da MPO na forma de composto I, uma vez que a hemi-MPO monomérica exhibe comportamento cinético idêntico. Compostos I e II são descritos como cátion  $\pi$ -ferril e íon ferril, respectivamente. Isto é, com ferro na valência de +4, embora seja reconhecido que o átomo de oxigênio coordenado possui substancial caráter eletrofilico. O composto III, um aduto superóxido férrico, é formado pela reação entre a MPO férrica (nativa) na presença de um grande excesso de peróxido de hidrogênio, pela ligação de MPO

férrica à ânion superóxido ou pela adição oxidativa de oxigênio à enzima ferrosa (Hurst, 1991).

Os espectros ópticos dos compostos II e III são quase semelhantes, diferindo apenas na intensidade das bandas de absorção do visível (Hoogland e cols., 1987).

MPO catalisa a decomposição do seu substrato peróxido de hidrogênio, possivelmente pela reação reversível entre os estados férrico e o composto I:



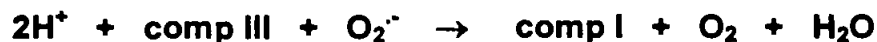
O potencial de redução para a formação do composto I é intermediário entre os potenciais de oxidação e redução do peróxido de hidrogênio.

O produto da peroxidação do cloreto catalisado por MPO, o HOCl, também pode oxidar, *a priori*, a MPO a composto I, reação que pode ser suprimida pela adição de cloreto.

A enzima também é capaz de agir como uma SOD, em virtude da reação com ânion superóxido gerando composto III.

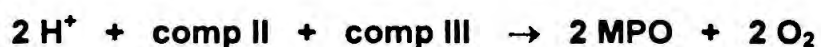


Regeneração do composto I e portanto restabelecimento da atividade catalítica ocorre pela reação do composto III com ânion superóxido.



A intermediação do composto II também tem sido proposta para justificar a não diminuição da velocidade de peroxidação do cloreto ou a decomposição catalítica do peróxido de hidrogênio em presença de composto III cataliticamente inativo. Entretanto esta proposta tem sido

criticada pois requer a transferência de elétrons entre diferentes estados de oxidação da enzima (como a reação entre MPO e composto I e a reação entre composto II e composto III) as quais parecem difíceis de ocorrer nas condições experimentais comumente ensaiadas (Hurst, 1991).



A reação que converte composto III diretamente em composto I, cataliticamente ativo, é uma alternativa possível e mais aceita. Kettle e Winterbourn (1988) têm apresentado evidências espectroscópicas de que o composto III pode ser reduzido a composto II por peróxido de hidrogênio e de que o composto II pode ser posteriormente reduzido a MPO férrica por ânion superóxido.



As reações mais importantes da MPO são apresentadas na figura 6. (Hurst, 1991).

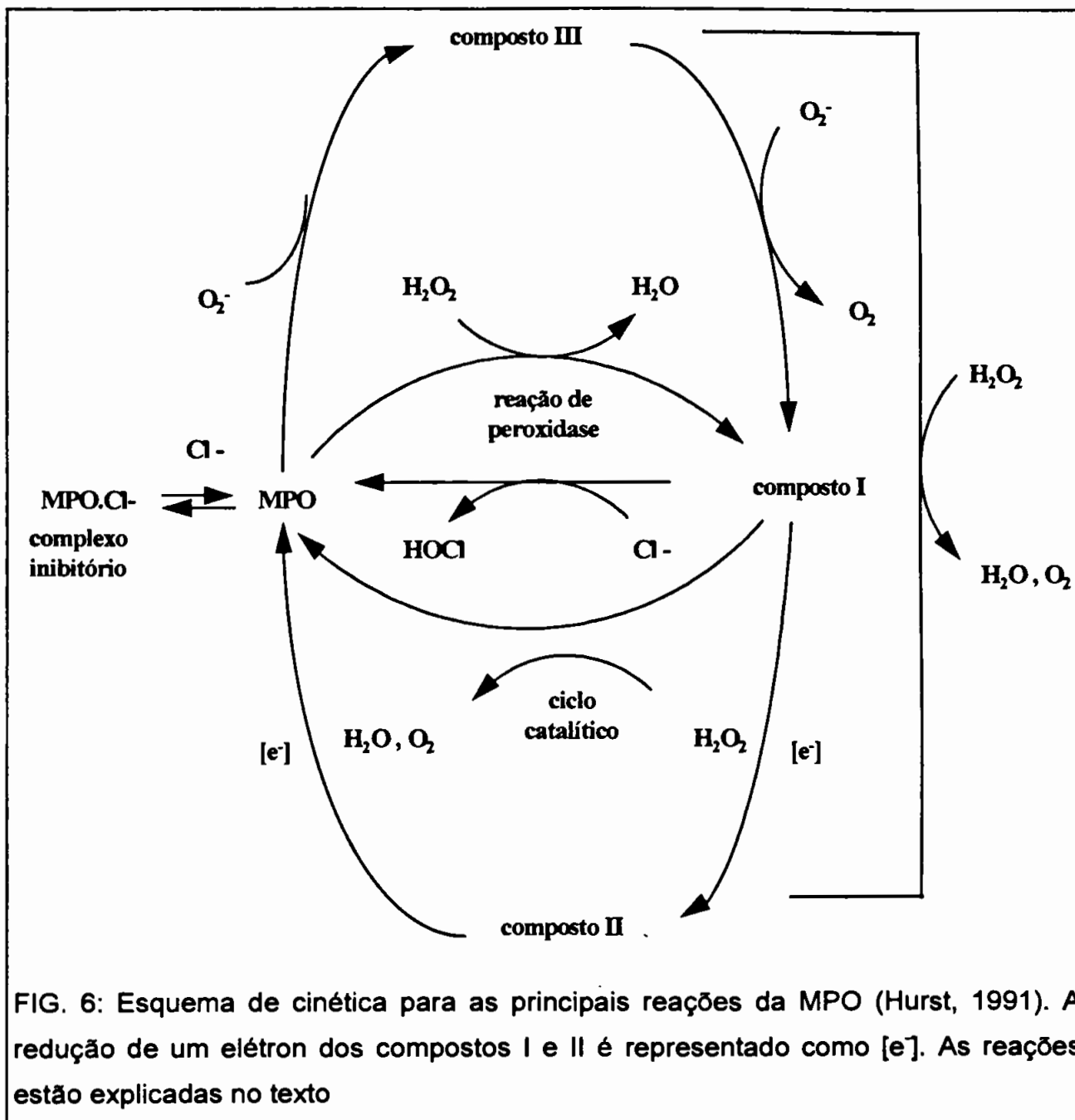


FIG. 6: Esquema de cinética para as principais reações da MPO (Hurst, 1991). A redução de um elétron dos compostos I e II é representado como [e<sup>-</sup>]. As reações estão explicadas no texto

O íon cloreto tem duplo papel funcional, agindo como substrato do composto I e como inibidor competitivo do peróxido de hidrogênio. Comportamento de reatividade semelhante tem sido descrito para o SCN<sup>-</sup>, que é peroxidado pela MPO a OSCN<sup>-</sup>. Ambas as reações de Cl<sup>-</sup> e SCN<sup>-</sup> são inibidas por peróxido de hidrogênio em altas concentrações. (Wever e cols., 1982; Bakkenist e cols., 1980)

### AÇÃO MICROBICIDA:

O composto I oxida o cloreto e forma o ácido hipocloroso (HOCl). Apesar da maior reatividade com o íon tiocianato, a reação com cloreto é de particular interesse, desde que sua concentração é ativa dentro da variação das concentrações fisiológicas (Klebanoff, 1991; Hurst, 1991).



O HOCl é um poderoso agente oxidante e pode atuar em vários sítios químicos de microorganismos, destruindo-os. O HOCl também pode reagir com compostos contendo nitrogênio e formar mono e dicloroaminas que possuem atividade oxidante (Klebanoff, 1991; Hurst, 1991).



As cloroaminas são menos reativas do que o ácido hipocloroso, porém elas possuem maior tempo de vida e apresentam capacidade maior de penetração junto a fluidos ricos em proteínas e outros *scavengers* dos produtos mais reativos da MPO (Klebanoff, 1991).

O ácido hipocloroso também pode reagir com ânion superóxido e formar radical hidroxila, que é um potente radical livre (Klebanoff, 1991).



## **OBTENÇÃO DE LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES NEUTRÓFILOS:**

O crescente interesse em avaliar as funções dos leucócitos na hemostasia, em processos patológicos ou mesmo ante o uso de novas drogas terapêuticas, faz necessário o isolamento de diferentes populações de leucócitos. As modificações que os processos de isolamento acarretam às células, às suas características metabólicas, funcionais ou morfológicas devem ser conhecidas. A preocupação em se padronizar técnicas de separação dos leucócitos foi discutida em 1972 por Solberg e Hellum que associavam alterações do *killing* e da fagocitose a neutrófilos de pacientes que desenvolviam septicemia.

A obtenção de neutrófilos ou de seus grânulos é de grande interesse, pois estas células têm funções de defesa, através da fagocitose e ação microbicida utilizando o conteúdo de seus grânulos, ou mesmo mediando respostas através da produção de citocinas. Enzimas associadas aos grânulos podem ser liberadas por traumas mecânicos, meios hipotônicos ou ácidos, ou por agentes que atuem na superfície celular. Para minimizar estes efeitos foi proposto por Hirschhorn e Weissmann (1965) um processo de separação que envolvia sedimentação espontânea do sangue heparinizado por cerca de 90 minutos a 37°C em tubos cônicos. As amostras eram centrifugadas e com o botão celular, composto por 60-75% de neutrófilos, eram posteriormete obtidos os grânulos.

Bøyum em 1968 fez um estudo detalhado para a separação das células do sangue, utilizando vários compostos, como a metil celulose, o isopaque, o ficoll, o dextran, o EDTA entre outros, e até mesmo a associação destes compostos. Estes estudos se baseavam no princípio de que diferentes células possuem propriedades de sedimentação características, e que o uso destes compostos facilitariam e até favoreceriam a diferenciação destas propriedades, propiciando assim a separação das diferentes populações (Bøyum, 1968b).

Diferentes tipos celulares suspensos em um mesmo meio apresentam suas velocidades de sedimentação determinadas principalmente pelo tamanho celular. A densidade celular também interfere na velocidade de sedimentação porém sua influência é menor. Interações entre as células podem ocorrer em suspensões celulares concentradas, como por exemplo, a formação de agregados que fazem as propriedades de sedimentação se desviarem das esperadas. Entretanto, a agregação celular pode melhorar as técnicas de separação, se estes agregados se constituírem de apenas um tipo celular (Böyum, 1968b).

O uso de metilcelulose, isopaque, dextran, ficol entre outros, levou a formação de agregados de eritrócitos e esta formação é mais eficiente quando o processo ocorre em uma interface. Com o decorrer do tempo, os eritrócitos agregados formam um botão no fundo do tubo enquanto a parte superior é composta principalmente por leucócitos. Foram testadas combinações entre os diferentes compostos utilizados na separação, variações em suas densidades e concentrações, variações no volume e diluições do sangue, variações no diâmetro dos tubos, efeitos de mudança de temperatura e efeitos de variação na concentração osmolar do meio de reação (Böyum, 1968a).

Baseado nestes estudos, Böyum propôs um método de separação de leucócitos mononucleares e granulócitos utilizando uma mistura de isopaque-ficoll com densidade de 1,077 mg/ml a qual era adicionado sangue coletado com heparina (10UI/ml de sangue), diluído 1:3 com solução fisiológica. Centrifugação para obtenção dos mononucleares e posterior sedimentação em dextran 4,5% a 1xg para obtenção dos granulócitos, resultavam em populações aproximadamente 98% puras (Böyum, 1968c).

Sangue coletado misturado com dextran e deixado sedimentar por 45 minutos rende um sobrenadante rico em leucócitos que após ser submetido à lise hipotônica, para retirada dos eritrócitos, leva a um rendimento de neutrófilos de aproximadamente 85% (Stossel e cols., 1971).

Outros pesquisadores têm avaliado as diferentes formas de obtenção enfocando o aspecto funcional, bioquímico e morfológico das células obtidas. Fallon e cols. em 1962 avaliaram mudanças metabólicas e morfológicas de leucócitos obtidos após sedimentação em dextran e lise hipotônica dos eritrócitos remanescentes, e não encontraram mudanças na glicólise aeróbia ou anaeróbia, na microscopia eletrônica ou de luz, ou na avaliação da viabilidade dos leucócitos obtidos.

Wakefield e cols. em 1982 avaliaram o efeito do percoll, partículas de sílica gel coloidal cobertas por polivinilpirrolidina que forma uma população de partículas esféricas com diâmetro médio de 28-30 nm, que tem sido amplamente utilizado como gradiente para separação de macrófagos e monócitos e organelas subcelulares. Mostraram que essas partículas são fagocitadas pelos macrófagos e que também ocorria uma diminuição na aderência destas células a plásticos. Inferindo a diminuição da aderência a alterações nas proteínas de adesão da superfície celular, induzidas pelo percoll.

Nathanson e cols. em 1977 notaram uma diminuição significativa da motilidade e da resposta a fatores quimiotáticos de monócitos separados com gradiente de percoll, quando comparado com células separadas com gradiente de ficoll-hypaque.

Outros têm relatado que a atividade de monócitos/macrófagos são bloqueadas após separação em gradientes de percoll, incluindo a exclusão do azul de Tripán e a habilidade dos monócitos se transformarem em macrófagos (Fluks, 1981), fagocitose (Gmelig e Waldmann, 1980), habilidade citotóxica (Farram e Nelson, 1980) e atividade de receptor de Fc (Pertoft e cols., 1980).

Czarnetzki e cols. em 1975 avaliaram os efeitos da heparina sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, verificando que em concentrações superiores a 100 UI/ml de sangue os neutrófilos são estimulados aumentando a redução do NBT.

Em 1988, Wright descreveu a metodologia para a obtenção das diferentes populações de grânulos de neutrófilos, entretanto em primeiro

lugar é necessária a obtenção das células, sendo discutida a obtenção através de centrifugação em gradiente de ficoll-hypaque, com posterior sedimentação e lise hipotônica.

É importante avaliar qual o melhor método a ser utilizado quando se procura trabalhar com leucócitos. A necessidade de uma população homogênea de neutrófilos, por exemplo, faz com que métodos que utilizem sedimentação espontânea não possam ser amparados. Em contrapartida, para avaliar funções metabólicas, liberação de citocinas, ou estudar morfológicamente estas células, o ideal são meios de obtenção que mantenham as células as mais próximas possível das suas características *in vivo*. Muito provavelmente a associação dos métodos de separação de leucócitos, devidamente padronizados, possa levar a uma forma ideal de trabalho.

## QUIMILUMINESCÊNCIA

A quimiluminescência é um produto de uma reação química onde há a formação de um estado eletronicamente excitado capaz de emitir luz ao retornar ao estado fundamental ou, então, de transferir energia para aceptores fluorescentes ou fosforescentes. Esta reação é chamada de reação bioluminescente quando ocorre em seres vivos.

As reações quimiluminescentes têm algumas características essenciais:

- Deve haver energia suficiente gerada pela reação para a formação de um estado eletronicamente excitado. Em outras palavras, a reação deve ser exotérmica.

- Deve haver um caminho pelo qual a energia possa ser direcionada à formação de um estado excitado.

- O produto excitado deve ser capaz de emitir um fóton, ou seja, possuir um elevado rendimento quântico de fluorescência, ou então, ser capaz de transferir sua energia a uma outra molécula capaz de emitir luz.

Se toda a energia é perdida ou transferida em processos não radiativos, então a reação não será quimiluminescente (Campbell, 1988).

Quimiluminescência de baixa intensidade pode ser observada a partir de diversos extratos teciduais e celulares de organismos não bioluminescentes. Esta quimiluminescência está associada principalmente a processos de lipoperoxidação e atividade de fagócitos. Leucócitos polimorfonucleares, quando estimulados, geram uma série de espécies reativas derivadas do oxigênio ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ ,  $^1O_2$ ) que podem direta (no caso de  $^1O_2$ ) ou indiretamente (no caso da demais EROS) gerar quimiluminescência.

Esta quimiluminescência pode ser bastante amplificada na presença de certos compostos como luminol ou lucigenina (Ginsburg e cols., 1993).

#### *QUIMILUMINESCÊNCIA DEPENDENTE DE LUMINOL*

Em soluções tamponadas aquosas a luminescência do luminol pode ser estimulada por uma variedade de oxidantes. Entre eles o iodeto, o peróxido de hidrogênio na presença de peroxidase, ou um anodo de uma célula eletroquímica, todos resultando em luminescência dependente de oxigênio.

A sequência de reações propostas para a oxidação do luminol está mostrada a seguir:

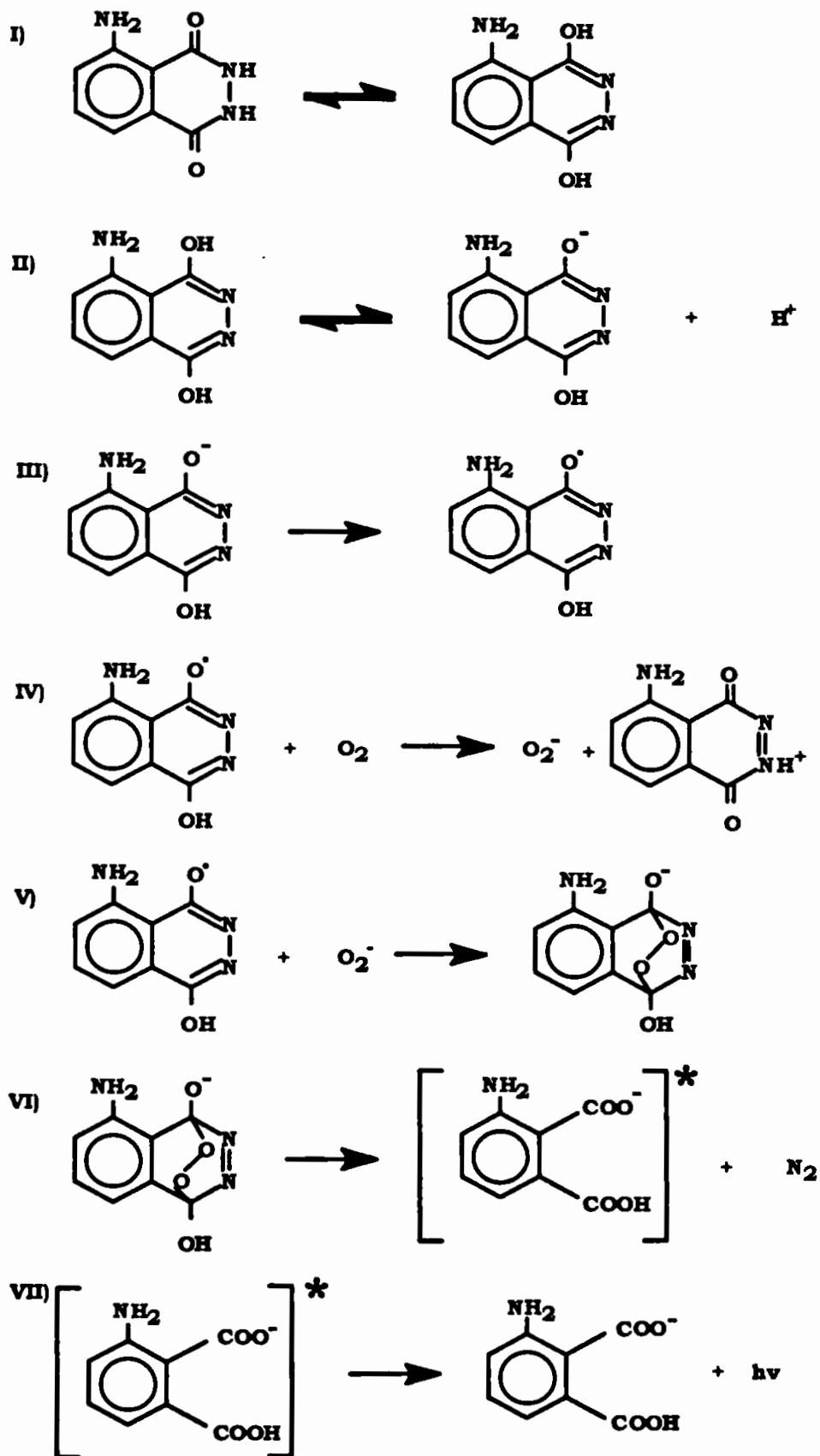


FIG. 7: Esquema proposto por Faulkner e Fridovich 1993, para reação univalente do luminol.

(I) tautomerismo ceto-enólico

(II) ionização da forma enólica, formando luminol monoânion

(III) oxidação do luminol monoânion por peróxido de hidrogênio e uma peroxidase com produção de radical luminol.

(IV) adição de ânion superóxido ao radical luminol gerando um endoperóxido.

(V) radical luminol reduzindo o oxigênio e gerando ânion superóxido.

(VI) clivagem do endoperóxido gerando aminoftalato no estado excitado.

(VII) aminoftalato no estado excitado retornando ao estado fundamental com emissão de luz.

O luminol não é um bom detector de ânion superóxido, visto que na presença de qualquer oxidante univalente, ele pode atuar como fonte de ânion superóxido. No caso do sistema xantina/xantina oxidase o oxidante univalente é o radical hidroxila ou o complexo Fe (II)-O gerado pela interação catalisada por ferro do ânion superóxido com peróxido de hidrogênio. No caso de neutrófilos ativados, o oxidante univalente é a MPO em presença de  $H_2O_2$ . Nestes casos tanto a catalase como a SOD inibem a luminescência produzida pelo luminol (Allred e cols., 1980).

Merenyi e Lind (1980) verificaram que a decomposição do endoperóxido era fator limitante na velocidade da reação de quimiluminescência e que era fortemente dependente do pH. Em meio alcalino, a decomposição do endoperóxido gera luminescência intensa enquanto que em meios neutros a velocidade de decomposição é menor, diminuindo conseqüentemente a eficiência de luminescência.

## **PEROXIDASES CATALIZANDO A OXIDAÇÃO DO LUMINOL:**

Peroxidases são enzimas amplamente distribuídas em plantas e animais.

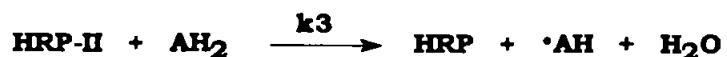
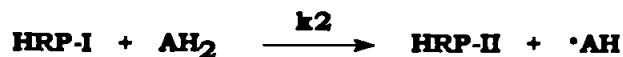
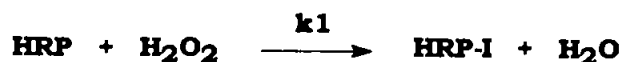
O amplo espectro de atividade da peroxidase e sua participação em vários processos fisiológicos está de acordo com sua relativa falta de especificidade para substratos e a ocorrência de uma variedade de isoenzimas (para revisão ver Campa, 1991).

Em plantas existem cerca de 40 tipos de isoenzimas, com diferentes composições e orientações de carboidratos. Em termos práticos, para trabalhos experimentais, há três importantes isoenzimas: A (ácida); C (neutra ou levemente básica) e a fortemente básica. As preparações comerciais são de isoenzima C (Dunford, 1991).

A HRP consiste de 308 resíduos de aminoácidos. O grupo prostético heme é ligado através da 5a. posição de coordenação do ferro III à cadeia lateral do grupo imidazol. Há oito cadeias laterais de carboidratos, e dois íons cálcio ligados por molécula de HRP. O peso molecular da enzima é de 42.100 Da (Dunford, 1991). A presença dos íons cálcio determina a estabilidade estrutural da enzima, inclusive na região do sítio ativo. A sua remoção causa perturbação nas proximidades do heme, diminuindo a atividade enzimática e afetando a constante de velocidade do sítio catalítico, especialmente aquela para a redução do composto II (para revisão ver Campa, 1991).

A HRP nativa é estável por longos períodos de tempo em temperatura ambiente e com pH variando de 5,0 a 10,0. Existem fontes comerciais de HRP na forma de precipitado de amônio que podem ser estocadas por um ano a 4°C. A HRP pode ser dialisada contra a água pura sem ocorrer nenhuma alteração estrutural.

O ciclo normal da peroxidase pode ser representado como:



HRP-I e HRP-II são compostos I e II; AH<sub>2</sub> é um substrato redutor; ·AH um produto radical livre.

Pode ocorrer também a formação do composto III ou oxiperoxidase que é relativamente inerte, pois ele não faz parte do ciclo peroxidase, mas apresenta reatividade química. A formação do composto III pode ocorrer a partir da HRP nativa e ânion superóxido, da HRP nativa e excesso de peróxido de hidrogênio e da HRP II e peróxido de hidrogênio. Assim podemos verificar que a concentração de peróxido é determinante para o ciclo peroxidásico (Dunford, 1991; Nakajima e Yamazaki, 1987).

A HRP é capaz de oxidar o luminol e gerar quimiluminescência na presença de peróxido de hidrogênio. Um esquema de reação aceito envolve a oxidação do luminol por um complexo formado entre oxidante e peroxidase para produzir um radical luminol (já mencionado anteriormente) que após algumas etapas de reação leva a produção de luz.



Proposta de seqüência de reações da reação do luminol catalisada pela HRP gerando radical luminol. Símbolos:  $LH^{\cdot}$ : luminol;  $L^{\cdot}$ : radical luminol (Thorpe e Kricka, 1986).

### AMPLIFICAÇÃO DE REAÇÕES QUIMILUMINESCENTES CATALISADAS POR HRP:

As emissões de luz do sistema HRP/luminol/ $H_2O_2$  podem ser amplificadas pela adição de *enhancers* em até 1000 vezes. Os *enhancers* parecem ser específicos para HRP e não têm efeito significativo sobre o *background* de emissão de luz chegando até a levar à diminuição do mesmo (Thorpe e Kricka, 1986).

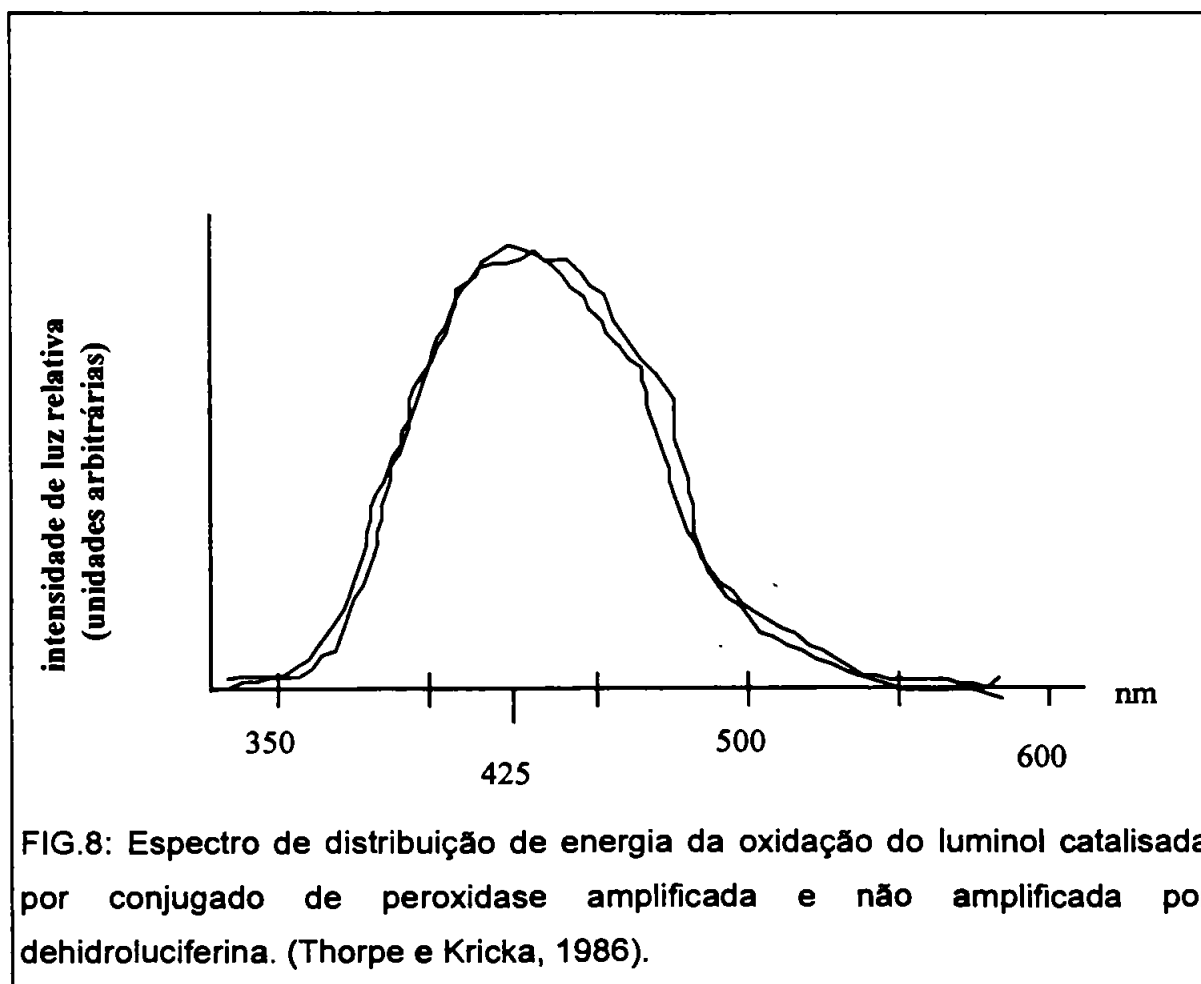
Muitos compostos como os derivados de 6-hidroxibenzotiazóis, fenóis e naftóis substituídos podem atuar como *enhancers*. O grau de amplificação e melhoria do sinal, com diminuição do *background* depende do *enhancer* empregado, pH do meio de reação, tampão utilizado e concentração do *enhancer* (Whitehead e cols., 1983). O momento em que o *enhancer* é adicionado ao meio de reação, isto é, durante ou no início da reação quimiluminescente, também influencia o grau de amplificação. Características ligadas ao próprio *enhancer* como, por exemplo, o substituinte halogênico (p-iodofenol > p-bromofenol > p-clorofenol) para os fenóis substituídos, ou um grupamento hidroxila na posição 6 de benzotiazóis são definitivas para caracterizar a magnitude de amplificação do composto em questão (Thorpe e Kricka, 1986).

Foi relatado também que os fenóis e os naftóis substituídos produzem um maior grau de amplificação do que aquele encontrado com os derivados de 6-hidroxibenzotiazóis (Thorpe e Kricka, 1986).

Para se caracterizar um bom *enhancer* é necessário que este composto amplifique as emissões quimiluminescentes e não interfira no *background*, ou até o diminua, deste modo o efeito de incremento na emissão de luz não pode ser explicada como um efeito aditivo. Na verdade, o mecanismo pelo qual estes compostos amplificam as

emissões de luz da reação de oxidação do luminol catalisada pela HRP não é conhecido. Há a sugestão de que diferentes *enhancers* operam por diferentes mecanismos. Entretanto o fato da reação amplificada originar o

mesmo espectro das reações não amplificadas (FIG.8) sugere que os *enhancers* não atuem como emissores, nem que formem compostos com rendimento quântico de CL superior à sonda quimiluminescente utilizada, mas sim que eles direta ou indiretamente, acelerem um ou mais passos da reação catalisada por peroxidase (Thorpe e Kricka, 1986).



### *QUIMILUMINESCÊNCIA DEPENDENTE DE LUCIGENINA*

A quimiluminescência dependente de lucigenina envolve uma reação entre a lucigenina univalentemente reduzida e o ânion superóxido com formação de um composto dioxetânico cuja clivagem leva a formação de um produto eletronicamente excitado (Allen, 1986; Legg e Hercules, 1969; Greenle e cols., 1962).

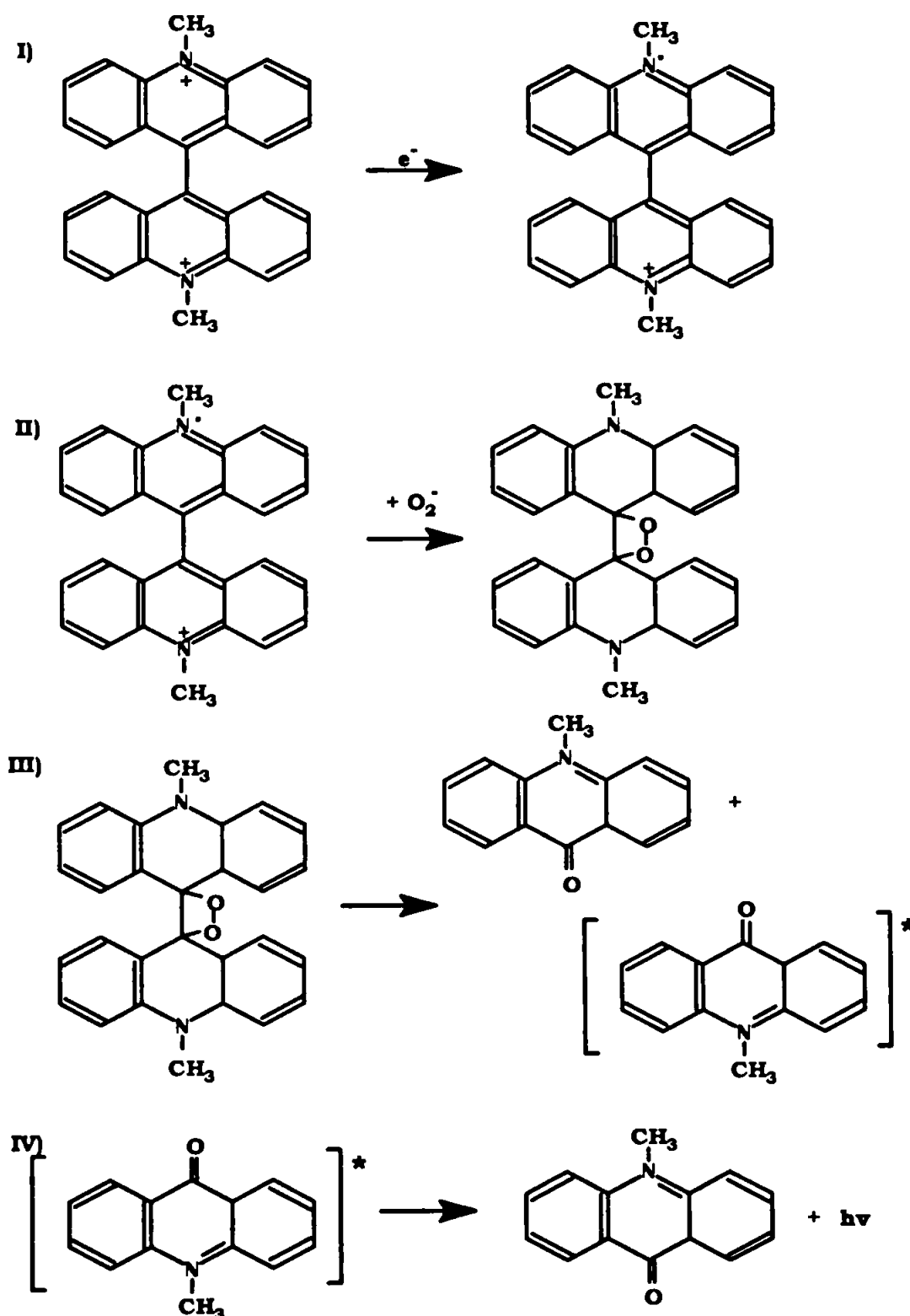


FIG. 9: Esquema proposto por Faulkner e Fridovich 1993 para a reação de redução da lucigenina. I: redução univalente do bisacridinium gerando uma espécie radicalar. II: espécie radicalar reagindo com ânion

superóxido gerando dioxetano. III: decomposição do dioxetano em duas moléculas de acridona, sendo uma eletronicamente excitada. IV: decaimento ao estado fundamental gerando fóton.

A luminescência da lucigenina tem sido usada em sistemas biológicos para a detecção de ânion superóxido. Quando na presença de células a luminescência parece refletir eventos intracelulares, desde que a adição de superóxido dismutase exógena não iniba a reação. Em solução livre de células a luminescência de lucigenina observada na presença do sistema xantina/xantina oxidase é fortemente inibida por superóxido dismutase, mas não por catalase (Faulkner e Fridovich, 1993).

## **2) OBJETIVOS:**

A importância e a complexidade do sistema da NADPH oxidase, nos mecanismos de defesa do hospedeiro a agentes microbianos invasores, fez com que a monitoração dos processos de *burst* oxidativo e degranulação se tornasse uma ferramenta importante na avaliação dos graus de ativação de PMN.

Ensaio da atividade de PMN são incluídos na lista de ensaios rotineiros de alguns laboratórios clínicos. Há uma tendência ampla em simplificar e tornar estes ensaios mais sensíveis. Sem dúvida alguma a monitoração do *burst* respiratório de PMN a partir de populações heterogêneas de células, incluindo o próprio sangue, facilita em muito a obtenção de parâmetros úteis ao diagnóstico clínico. O maior inconveniente destes ensaios é a baixa sensibilidade e a grande interferência de componentes sangüíneos. Por outro lado, a obtenção de populações bastante enriquecidas em PMN são conseguidas às custas de manipulações extensivas que por si só poderiam levar a ativação celular e portanto a obtenção de parâmetros de *burst* oxidativo não totalmente confiáveis.

Com o intuito de avaliar a influência de diferentes processos de obtenção de células sobre o estado de ativação dos PMN o objetivo deste trabalho pode ser dividido em:

1) Avaliação do estado de ativação de PMN obtidos por sedimentação espontânea, por sedimentação em gradiente de densidade ou presentes no sangue total, sem qualquer processamento. O estado de ativação dos PMN foi monitorado através do método de quimiluminescência, utilizando luminol ou lucigenina como amplificadores quimiluminescentes, e também pela redução do citocromo c. As células foram estimuladas por PMA, Zy ou FMLP.

2) Avaliação da liberação de MPO para o meio extracelular, que foi monitorada pela quimiluminescência obtida após a adição de luminol e peróxido de hidrogênio aos sobrenadantes dos incubados de PMN com

os diferentes estímulos utilizados. A este método denominamos de degranulação.

3) Como existe um grande interesse em se obter métodos simples e eficientes que forneçam parâmetros clínicos de interesse diagnóstico, a viabilização do uso do sangue total para avaliar os graus de ativação de PMN também foi objeto de estudo em nosso trabalho. Com o intuito de aumentar a sensibilidade dos ensaios de quimiluminescência aplicados à monitoração do *burst* oxidativo de PMN estimulados, utilizamos alguns *enhancers* clássicos da reação luminol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP em PMN presentes no sangue total. Foi estudado o efeito das adições de 4bromofenol, 1bromo2naftol e luciferina. A escolha de cada um destes *enhancers* é devido ao fato destes representarem as três classes químicas de substâncias com características de *enhancement* das reações quimiluminescentes do sistema HRP/luminol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fenóis substituídos, naftóis substituídos e 6-hidroxibenzotiazóis.

### 3) MATERIAL E MÉTODOS:

#### 3.1) Preparação do PBS segundo Dulbecco:

Todos os sais eram da Merck de grau p.a..

NaCl .....	0,8 g
KCl .....	0,2 g
CaCl <sub>2</sub> .....	0,2 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O.....	0,1 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,91 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,2 g
glicose.....	1,0 g
H <sub>2</sub> O.....	q.s.p. 1l

Os sais foram dissolvidos, inicialmente, em volume inferior a 1 litro e após a dissolução, foi corrigido o pH para 7,4 e o volume final para 1 litro.

#### 3.2) Preparação dos estímulos:

##### a) Zymosan A:

Zymosan A da sigma, obtido de paredes de leveduras do Saccharomyces cerevisiae.

Zymosan A .....	500,0 mg
PBS sem glicose .....	30,0 ml

A suspensão foi mantida em ebulição por 1 hora sob agitação constante, resfriada em t.a. e então submetida a sonicação de 4 ciclos de 15 segundos a 70W de potência, com intervalos de 15 segundos entre cada ciclo. A suspensão foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante desprezado. Posteriormente, esta operação foi repetida por mais três vezes. O infranadante foi ressuspensão com 2 ml de PBS sem glicose, estéril. A suspensão final (250 mg/ml) foi aliqüotada em frascos estéreis e armazenada a -10°C.

### Opsonização da suspensão de Zymosan A:

Zymosan A.....1,0 ml  
Soro homólogo.....3,0 ml

A mistura da suspensão de Zymosan A e soro foi incubada em banho a 37°C, sob agitação constante, por 60 minutos, sendo centrifugada e lavada três vezes com PBS sem glicose. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 5 ml de PBS estéril sem glicose. A suspensão, numa concentração final de 50 mg/ml, foi aliquoteada em frascos de 1 ml e congelada a -10°C. O número total de partículas/ml foi determinado por contagem em câmara de Neubauer.

### b) PMA

O PMA (forbol-12-miristato-13-acetato; PM 616,8 da Sigma) foi armazenado em dois estoques:

estoque I: 1mg de PMA foi dissolvido em 1000µl de DMSO; congelado a -10°C e dessecado.

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

No momento do uso, 10µl do estoque II foi diluído em 190µl de PBS, gerando uma concentração de 5 µg/ml. No meio final de reação esta solução de PMA foi diluída mais 100 vezes o que levava a uma concentração final de 50 ng/ml.

### c) FMLP

O FMLP (n-formil-met-leu-phe; de PM 437,6 da Sigma) foi dissolvido em água deionizada em concentração de  $4 \times 10^{-4} M$ , armazenado a -10°C. No momento do uso foi descongelado e adicionado ao meio de reação em concentração final de  $4 \times 10^{-6} M$ .

### **3.3) Reagentes:**

#### **a) Luminol:**

O luminol (PM 177,16 da Sigma) foi armazenado a  $-10^{\circ}\text{C}$  em concentração de  $1 \times 10^{-3}\text{M}$ . Para facilitar sua dissolução em água deionizada, eram utilizadas cerca de duas gotas de NaOH 1M. No momento do uso o luminol era descongelado e adicionado ao meio de reação na concentração desejada.

#### **b) Lucigenina:**

A lucigenina (PM 510,5 da Sigma) foi armazenada a  $-10^{\circ}\text{C}$  em concentração de  $1 \times 10^{-3}\text{M}$ . No momento do uso, a lucigenina foi descongelada e adicionada ao meio de reação na concentração desejada.

#### **c) Peróxido de hidrogênio:**

O peridrol a 30% (PM 34,01 da Merck) foi diluído 10 vezes com água deionizada gerando concentração de 0,979M, que foi armazenado como solução estoque a  $4^{\circ}\text{C}$ . No dia do uso esta solução foi diluída a concentração de  $10^{-3}\text{M}$ , que no momento do uso foi adicionada ao meio de reação na concentração desejada.

#### **d) HRP**

A HRP (horseradish peroxidase tipo I; PM 40.000 da Sigma) foi armazenada a  $4^{\circ}\text{C}$  em concentração de  $1,2 \times 10^{-7}\text{M}$ , dissolvida em água deionizada.

#### **e) MPO**

A MPO (mieloperoxidase de leucócitos humanos da Sigma) foi armazenada a  $-10^{\circ}\text{C}$ , em concentração de 5 UI/ml em PBS sem glicose.

f) *Enhancers*:

- 4-Bromo-fenol (PM 173,02) foi armazenado a  $-10^{\circ}\text{C}$  em solução fisiológica em concentração de  $1 \times 10^{-3}\text{M}$ .
- 1-Bromo-2-naftol (PM 224,06) foi armazenado a  $-10^{\circ}\text{C}$  em solução fisiológica em concentração de  $1 \times 10^{-3}\text{M}$ .
- 4,5-dehidro-2-(6-hidroxi-2-benzotiazolil)-4-ácido tiazolcarboxílico ou D(-) luciferina (PM 280,3) foi armazenado protegido da luz, dessecado a  $-10^{\circ}\text{C}$  em PBS sem glicose.

g) Citocromo c

O citocromo c de eritrócitos bovinos (PM 12.384; Sigma) foi preparado no momento do uso em concentração de  $200\mu\text{M}$  em PBS sem glicose.

h) SOD (superóxido dismutase de eritrócitos bovinos da Sigma) foi armazenado a  $-10^{\circ}\text{C}$  em PBS sem glicose.

i) Histopaque

Histopaque da Sigma com densidade de 1,077 estéril foi armazenado a  $4^{\circ}\text{C}$ .

j) NaCl:

Soluções de NaCl foram preparadas no dia do uso, em concentrações de 0,9% ou 2,7%.

l) Dextran:

Dextran de PM 488.000 de Leuconostoc mesenteroides da Sigma foi preparado a 5% em solução fisiológica estéril, armazenado a  $4^{\circ}\text{C}$ . A solução foi usada no período de 15 dias, após o preparo.

m) Citocalasina B:

A citocalasina B da Sigma foi ressuspensa em 1 ml de DMSO, gerando concentração de 10 mg/ml e armazenada dessecada a  $-10^{\circ}\text{C}$ . No momento do uso uma alíquota de  $10\mu\text{l}$  foi diluída em  $790\mu\text{l}$  de PBS sem glicose, gerando concentração de  $125\mu\text{g/ml}$ . Desta solução foi utilizado o volume de  $25\mu\text{l}$  em volume final de  $500\mu\text{l}$ , gerando concentração final de  $5\mu\text{g/ml}$ .

n) o-dianisidina:

A o-dianisidina da Sigma de PM 317,2 foi armazenada a  $4^{\circ}\text{C}$ , em frasco âmbar, em concentração de 0,1% em etanol.

o) Ácido perclórico

O ácido perclórico a 35% da Carlo Erba foi armazenado em t.a.

p) Tampão citrato:

O tampão citrato - pH 5,3 - foi preparado a partir de solução a 0,2 M de ácido cítrico e solução a 0,2 M de citrato de sódio.

q) Solução substrato para determinação espectrofotométrica da MPO:

Solução substrato: A 10 partes de tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 5,5, foram adicionadas 1 parte de o-dianisidina 0,1% em etanol, 1 parte de solução aquosa a 1 mM de peróxido de hidrogênio e triton X-100 em concentração final de 0,05%. Esta solução foi preparada no dia do uso.

r) Heparina

A heparina 5.000 UI/ml da Roche foi mantida em t.a.

### **3.4) Obtenção de PMN por sedimentação em gradiente de densidade (Ficoll-Hypaque):**

Foram obtidos 10 ml de sangue de voluntários sadios em jejum de 12 horas (Uhlinger, 1991). O sangue foi coletado em tubos plásticos e utilizada heparina (50 UI/ml de sangue) como anticoagulante (Czarnetzki, 1975). O sangue obtido foi diluído v:v com PBS Dulbecco (10mM), sem glicose, pH 7,4. Em tubo de centrifuga de 50 ml de capacidade previamente esterelizado, foram acrescentados 10 ml de Histopaque de densidade 1,077 e adicionados cuidadosamente os 20 ml de sangue diluído, formando uma interface entre o polímero e o sangue. O gradiente assim montado foi centrifugado por 20 minutos em centrífuga clínica, com rotor Swing, a 2500 rpm, em temperatura ambiente. Após centrifugação foi observada a formação de 4 fases: a fase superior composta por tampão fosfato e plasma, a segunda fase em forma de anel, era composta por mononucleares, a terceira fase composta por histopaque e a última fase, por eritrócitos e granulócitos. As camadas superiores foram descartadas e à camada rica em granulócitos foram adicionados cerca de 15 ml de dextran a 5% em solução fisiológica, homogeneizado e mantido em temperatura ambiente por cerca de 30 minutos para a sedimentação dos eritrócitos. A camada superior rica em granulócitos foi retirada com auxílio de pipeta Pasteur, transferida a um novo tubo cônico e lavada com tampão fosfato para retirar o excesso de dextran. O processo de lavagem constava da adição do tampão fosfato com posterior centrifugação por 5 minutos a 1500 rpm, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi submetido a lise hipotônica com água destilada a 4°C. A isotonicidade foi restabelecida 60 segundos após com solução de NaCl a 2,7%, acrescentado tampão fosfato Dulbecco (10mM) pH 7,4 com glicose (1mg/ml) centrifugado por 5 minutos a 1500 rpm (Boyum, 1968). O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 1 ml de tampão fosfato Dulbecco (10mM) pH 7,4 com glicose (1mg/ml). A

suspensão foi colocada em câmara de Neubauer para determinação do número total de células por ml, a viabilidade foi avaliada pelo método de exclusão do azul de Tripán e uma alíquota de 50 µl foi centrifugada em citocentrífuga a 1000 rpm por 5 minutos e submetida à coloração panótica pelo método de May-Grünwald-Giemsa modificado por Rosenfeld (Rosenfeld, 1947) para a avaliação da população celular obtida.

### **3.5) Obtenção de PMN por sedimentação em espontânea ou isolamento parcial de leucócitos polimorfonucleares:**

Foram obtidos 5 ml de sangue de voluntários sadios em jejum de 12 horas (Uhlinger, 1991) colhidos em tubos plásticos cônicos e utilizando heparina como anticoagulante (50 UI/ml de sangue) (Czarnetzki, 1975). Os tubos foram mantidos a 4°C em inclinação de 45° por aproximadamente 90 minutos com a finalidade de facilitar a sedimentação dos eritrócitos. O plasma resultante rico em leucócitos e a camada superior posicionada sobre os eritrócitos já sedimentados foram retirados com auxílio de pipeta Pasteur. O material obtido foi submetido a centrifugação de 1500 rpm por 5 minutos em centrífuga clínica em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o infranadante submetido a lise hipotônica com água destilada a 4°C. A isotonicidade foi restituída com solução de NaCl 2,7%. Foi adicionado tampão fosfato Dulbecco 10mM, pH 7,4. O material foi centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos sendo o sobrenadante descartado e o sedimento celular ressuspenso em 1 ml de tampão fosfato Dulbecco 10mM, pH 7,4 com glicose (1mg/ml). A suspensão celular foi submetida à contagem global em câmara de Neubauer, onde foram feitas diluições de 1:20 com líquido de Turk. Uma alíquota de 50 µl foi centrifugada em citocentrífuga por 5 minutos a 1000 rpm e submetida à coloração panótica pelo método de May-grünwald-Giemsa modificado por Rosenfeld (Rosenfeld, 1947) para avaliação da população celular obtida. Foi feita ainda avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de Tripán.

### **3.6) Quantificação aproximada dos PMN presentes no sangue total:**

O limite de detecção para reação de quimiluminescência em presença de células é da ordem de  $10^5$  células.

Baseando-se no fato de que um indivíduo sadio tem em média de 5.000 a 10.000 leucócitos por  $\text{mm}^3$ , e que cerca de 50% da população de leucócitos é constituída por PMN neutrófilos, foram utilizados 33 $\mu\text{l}$  de sangue total (cerca de  $1 \times 10^5$  células). Utilizando este volume de sangue diluído em volume final de 2 ml de tampão fosfato Dulbecco, 10 mM, pH 7,4, foi obtida uma diluição de cerca de 60 vezes. Para evitar interferência da hemoglobina, que possui um alto coeficiente de extinção na região do azul, conseqüentemente interferindo na reação de quimiluminescência, diluições do sangue total de 1:1000 ou ainda maiores seriam ideais (Allen, 1986). Entretanto, diluições com esta ordem de grandeza apresentam o inconveniente de também levar a uma diluição dos PMN, que para o método proposto, se apresentam com número inferior à sensibilidade requisitada. Pode-se pensar em utilizar diluições menores, dependendo do grau de acuracidade que se procura para determinar a atividade de *burst* de PMN (DeChatelet, 1981). Como a intenção era avaliar o comportamento dos PMN presentes no sangue total, pelo método proposto, admitimos a diluição de 1:60 (Bochev, 1993).

### **3.7) Aparelhagem utilizada**

Para as reações de quimiluminescência foi utilizado um contador de cintilação Packard, modelo Tricarb 1900TR, no modo fora de coincidência. A temperatura da sala era mantida entre 22-25°C, com auxílio de um condicionador de ar. As reações eram feitas sem agitação. O número de ciclos era programado conforme o experimento, assim como o tempo de contagem de cada ciclo.

A centrífuga utilizada era da marca Incibrás, modelo Spin IV e não apresentava refrigeração.

A citocentrífuga utilizada era da marca Incibrás, modelo citospin. Todos os citocentrifugados foram feitos utilizando-se 50µl de suspensão celular, centrifugados a 1000 rpm, por 5 minutos.

O espectrofotômetro utilizado para monitorar a redução de citocromo c e para determinação da MPO era da marca Hitachi, modelo U3210, que apresentava um controlador de temperatura que era mantida a 37°C.

### **3.8) Avaliação percentual da população dos PMN presentes na suspensões celulares obtidas por sedimentação espontânea ou por sedimentação em gradiente de densidade**

Para avaliar a população dos PMN presentes nas diferentes preparações, foram feitos citocentrifugados das suspensões celulares, corados pelo método panótico de May-Grünwald-Giemsa modificado por Rosenfeld (Rosenfeld, 1947). As lâminas coradas foram levadas ao microscópio de luz, contadas 200 células e a porcentagem das diferentes populações foi calculada.

### **3.9) Avaliação da viabilidade celular dos PMN obtidos por sedimentação espontânea ou por sedimentação em gradiente de densidade**

Todas as células, obtidas por sedimentação espontânea ou por sedimentação em gradiente de densidade, foram submetidas à avaliação de viabilidade celular pelo método da exclusão do azul de Tripán. Só foram utilizadas, nos experimentos descritos, as preparações que apresentavam viabilidade igual ou superior a 90%.

Em lâmina de microscopia foram adicionadas uma alíquota da suspensão celular e uma alíquota equivalente de solução de azul de Tripán a 2% em solução fisiológica. Eram homogeneizadas e cobertas

com lamínula. Posteriormente, foram levadas ao microscópio de luz, contadas 200 células e avaliada a porcentagem de células viáveis. As células viáveis se apresentavam íntegras e refringentes, enquanto que as células não viáveis permitiam a entrada do corante em seu citoplasma indicando grandes alterações de membrana.

### **3.10) Avaliação da viabilidade celular dos PMN obtidos por sedimentação espontânea ou por sedimentação em gradiente de densidade ao longo do tempo**

As células obtidas por sedimentação espontânea ou por sedimentação em gradiente de densidade foram submetidas a estudo de viabilidade celular ao longo de 2 horas, pelo método de exclusão do azul de Tripán.

As células, após a obtenção, eram mantidas, em suspensão (em tampão fosfato Dulbecco 10mM, pH 7,4), em banho de gelo. Imediatamente após a obtenção uma alíquota da suspensão era submetida ao estudo de viabilidade sendo esta fração considerada tempo zero.

Com a suspensão de células remanescente eram retiradas alíquotas, em intervalos de 30 minutos, e feito estudo de viabilidade.

### **3.11) Avaliação da ativação de PMN obtidos por sedimentação espontânea, por gradiente de densidade ou presentes no sangue total através de quimiluminescência:**

Protocolo de reações:

Foram montados protocolos de reações utilizando frascos de cintilação em que eram adicionados tampão fosfato (10mM, pH7,4, sem glicose),  $2 \times 10^5$  células obtidas por sedimentação em gradiente de

densidade,  $4 \times 10^5$  células obtidas por sedimentação espontânea ou  $33 \mu\text{l}$  de sangue total. É importante ressaltar que nos experimentos de CL, redução do citocromo c e degranulação foram adicionados diferentes números de células quando foram comparadas as células obtidas por sedimentação em gradiente de densidade, sedimentação espontânea ou presentes no sangue total. Estas diferenças representam uma normalização média do número de PMN obtidos em cada processo de separação de células, e é, em média 96% de PMN na sedimentação em gradiente de densidade, 60% de PMN na sedimentação espontânea e cerca de 50% presentes no sangue total. Os PMN obtidos pelos diferentes métodos, foram ativados por PMA (50ng/ml), Zy (2,5 mg/ml) e FMLP ( $4 \times 10^{-6}$  M). Para a detecção da ativação dos PMN o método empregado foi a quimiluminescência utilizando luminol ( $1 \times 10^{-5}$  M) e lucigenina ( $2,5 \times 10^{-5}$  M) como sondas quimiluminescentes. Paralelamente às reações com células na presença dos estímulos foram feitos controles das reações, ou seja, os mesmos sistemas na ausência dos estímulos. Todos os sistemas de reação continham volume final de 2 ml.

A figura 10 mostra o protocolo de reações com 16 sistemas para determinação de CL das células obtidas pelos diferentes métodos de separação.

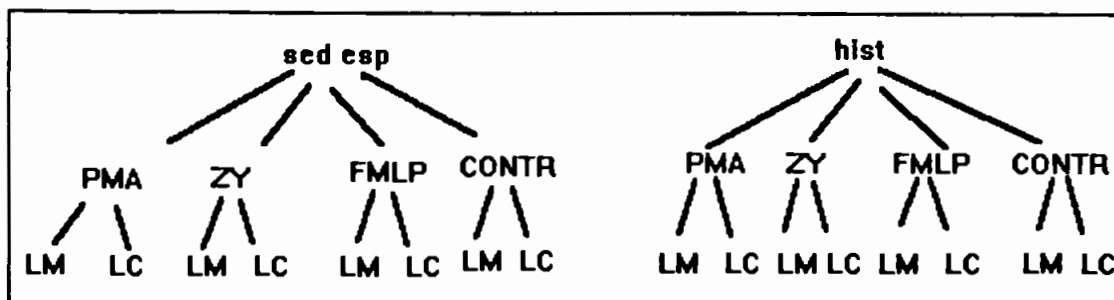
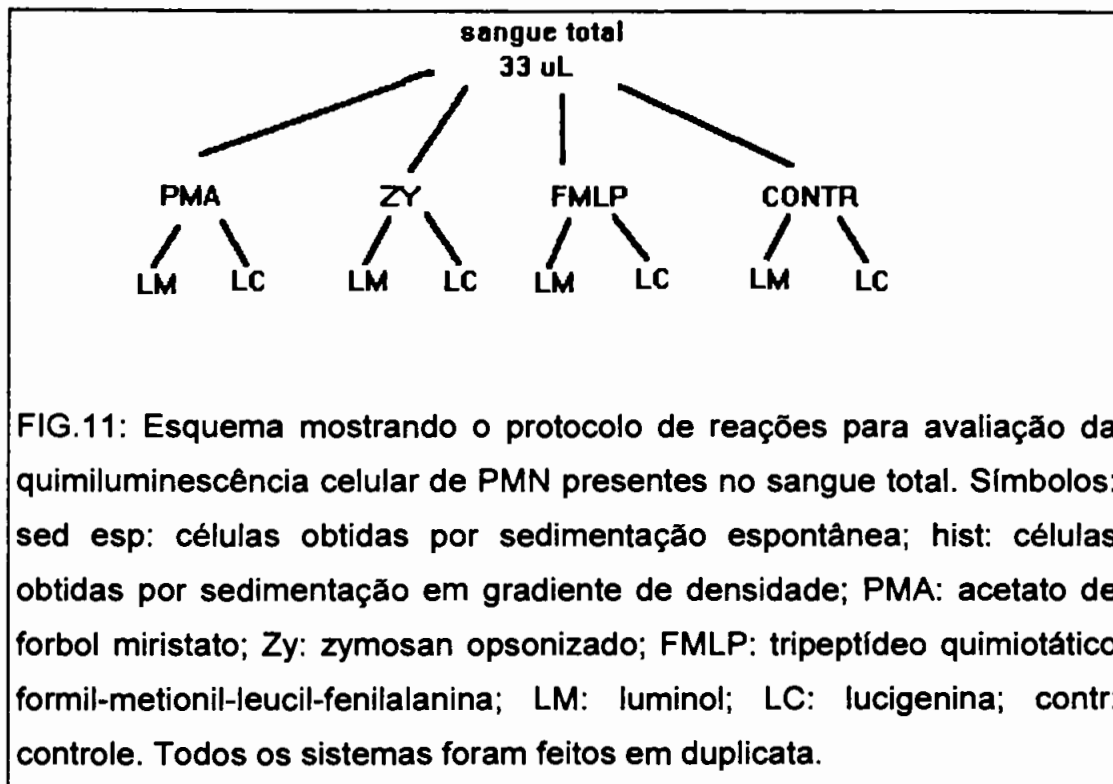


FIG.10: Esquema mostrando o protocolo de reações para avaliação da quimiluminescência celular dos PMN obtidos pelos diferentes métodos. Símbolos: sed esp: células obtidas por sedimentação espontânea; hist: células obtidas por sedimentação em gradiente de densidade; PMA: acetato de forbol miristato; Zy: zymosan opsonizado; FMLP: tripeptídeo quimiotático formil-metionil-leucil-fenilalanina; LM: luminol; LC: lucigenina; contr: controle.

Estes sistemas foram imediatamente levados a um contador de cintilação, onde foram registradas as cpm obtidas em 14 ciclos de 6 segundos para cada sistema. Observar que os frascos de cintilação tinham sua contagem de fundo (*background*) previamente avaliada. Só foram utilizados quando apresentavam até 5000 cpm, segundo Allen, 1975.

Posteriormente foram montados 16 sistemas utilizando 33 $\mu$ l de sangue total em volume final de 2 ml. Adicionava-se a sonda quimiluminescente luminol ( $1 \times 10^{-5}$  M) ou lucigenina ( $2,5 \times 10^{-5}$  M) e os estímulos (PMA, FMLP ou Zy) nas concentrações anteriormente citadas. Os controles foram feitos na ausência de estímulos. Os sistemas montados em duplicata e imediatamente levados a um contador de cintilação, nas mesmas condições descritas para o ensaio anterior. A figura 11 mostra o protocolo de reações com 16 sistemas para determinação de CL dos PMN presentes no sangue total.



### 3.12) Avaliação da ativação dos PMN obtidos por sedimentação espontânea ou por sedimentação em gradiente de densidade através da redução do citocromo c.

Superóxido produzido pelo sistema NADPH oxidase pode ser monitorado pela redução do citocromo c inibível pela superóxido dismutase (Flohé, 1984). Tipicamente este ensaio pode ser utilizado para medir a atividade de  $10^5$  células (Jones, 1994). Para a medida do ânion superóxido produzido por células totais o ensaio foi realizado em cubeta de quartzo de 1 ml contendo  $2 \times 10^5$  células obtidas por sedimentação espontânea ou  $1 \times 10^5$  células obtidas por sedimentação em gradiente de densidade; 100  $\mu$ M de citocromo c em tampão fosfato Dulbecco, pH 7,4, 10 mM, com glicose (1mg/ml). As cubetas foram mantidas por cerca de 2 minutos a 37°C para equilíbrio do sistema. A produção de superóxido era

iniciada pela adição do estímulo. Os estímulos utilizados foram PMA (50ng/ml), FMLP ( $4 \times 10^{-6}$  M) e Zy (2,5 mg/ml). Após adição dos estímulos a reação foi monitorada espectrofotometricamente por até 25 minutos em comprimento de onda de 550nm.

Em outros ensaios, em presença de células totais, foi avaliado se o acréscimo na absorvância era devido à produção do ânion superóxido, ou a algum outro interferente. Neste ensaio, quando a velocidade de redução do citocromo c se aproximava da linearidade, 100 $\mu$ g de superóxido dismutase foi adicionada.

PMN presentes no sangue total não puderam ser avaliados por este método devido à interferência da hemoglobina e outras proteínas do sangue no meio de reação.

Como o zymosan é uma suspensão, turvando o meio de reação, foram feitos experimentos com incubação prévia a 37°C por 10 minutos protegidos da luz, com citocromo c (100  $\mu$ M), células obtidas por um dos dois métodos de separação e o zymosan (2,5mg/ml). Após o tempo de incubação, o sistema foi centrifugado e com o sobrenadante foi avaliada a redução do citocromo c espectrofotometricamente.

### **3.13) Determinação espectrofotométrica da MPO:**

Para determinação da MPO presente em sistema livre de células foi padronizado o método espectrofotométrico utilizando o-dianisidina como substrato da enzima. Foram utilizadas concentrações de MPO de 0,05 UI/ml, 0,5 UI/ml e 5 UI/ml.

Para este ensaio, amostras de 0,1 ml de enzima e 1,0 ml de solução substrato foram misturadas e incubadas em t.a. por exatamente 1 minuto. A reação foi parada com adição de ácido perclórico a 35% e a leitura da absorvância foi feita em comprimento de onda de 560 nm (Dewald, 1986).

### **3.14) Avaliação da degranulação através de CL:**

Células obtidas por sedimentação em gradiente de densidade ( $1 \times 10^5$ ) ou células obtidas por sedimentação espontânea ( $2 \times 10^5$ ) foram incubadas em eppendorff em volume final de  $500 \mu\text{l}$  a  $37^\circ\text{C}$  por 30 minutos na presença de Zy (2,5 mg/ml), FMLP ( $4 \times 10^{-6}$  M), PMA (50 ng/ml) ou na ausência de estímulo (controle). Posteriormente foram centrifugados a 2500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi imediatamente separado e o *pellet* de células foi descartado. Com variações do volume do sobrenadante foi avaliada a presença de MPO através de quimiluminescência, utilizando luminol ( $1 \times 10^{-5}$  M) e peróxido de hidrogênio ( $1 \times 10^{-5}$  M), previamente padronizados. Foi definido o volume de  $150 \mu\text{l}$  como ideal para esta avaliação.

Posteriormente, foram feitos três experimentos utilizando  $2 \times 10^6$  células obtidas por sedimentação espontânea ou  $1 \times 10^6$  células obtidas por sedimentação em gradiente de densidade. Foram incubadas, separadamente, por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  em volume final de  $500 \mu\text{l}$  de tampão fosfato Dulbecco (10mM, pH 7,4) na presença de Zy (2,5 mg/ml), FMLP ( $4 \times 10^{-6}$  M), PMA (50 ng/ml) ou na ausência de estímulo (controle). Após este período foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi imediatamente separado e o *pellet* de células foi descartado. Com  $150 \mu\text{l}$  do sobrenadante foi avaliada a presença de MPO através de quimiluminescência, utilizando luminol ( $1 \times 10^{-5}$  M) e peróxido de hidrogênio ( $1 \times 10^{-5}$  M), previamente padronizados. O aumento no número de células, de  $10^5$  para  $10^6$  células, foi utilizado com intuito de se obter uma melhor resolução na detecção da MPO.

Em outro experimento foram utilizadas  $1 \times 10^6$  células obtidas por sedimentação em gradiente de densidade e  $2 \times 10^6$  células obtidas por sedimentação espontânea, seguindo-se o mesmo protocolo acima descrito, porém na presença de citocalasina B (5  $\mu\text{g/ml}$ ).

Anteriormente a esta avaliação foram feitas padronizações utilizando a HRP, que é uma hemeproteína semelhante a MPO. A concentração da HRP foi variada de  $10^{-6}$  a  $10^{-11}$  M. Foi verificado que no método proposto utilizando peróxido de hidrogênio ( $10^{-5}$  M), luminol ( $10^{-5}$  M) e o contador

de cintilação nas condições já descritas, a concentração de até  $10^{-9}$  M apresentava valores mensuráveis.

Para avaliar o comportamento enzimático ao longo do tempo foram montados sistemas em frasco de cintilação em volume final de 2 ml de tampão fosfato Dulbecco 10mM, pH 7,4, sem glicose. Foi adicionado luminol, peróxido de hidrogênio e disparada a reação com a enzima, variando suas concentrações de 1 a  $10 \times 10^{-9}$  M. O sistema foi imediatamente levado ao contador de cintilação e eram registrados 99 ciclos de 6 segundos.

Ainda com intuito de registrar o comportamento enzimático ao longo do tempo, foram feitas padronizações utilizando MPO de leucócitos humanos.

Para a padronização de ensaios com MPO foi considerado que 1 UI de MPO é equivalente a 1 UI de HRP. Sendo que 642 mg de HRP tem 50.000 UI e que seu peso molecular é de 40.000, foram feitas conversões de valores de concentração da HRP para unidades. Baseados nestas unidades foram feitas soluções de MPO em tampão fosfato Dulbecco (10mM, pH 7,4) correspondentes à grandeza de  $10^{-9}$  M.

As concentrações de MPO em UI/ml foram de 0,001947; 0,003894; 0,007788; 0,015576; 0,031152 e 0,062304; correspondentes à 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10 e  $20 \times 10^{-9}$  M, respectivamente.

### **3.15) Avaliação da viabilidade celular dos PMN obtidos por sedimentação espontânea ou por sedimentação em gradiente de densidade ao longo do tempo e na presença de *enhancer***

As células obtidas por sedimentação espontânea ou por sedimentação em gradiente de densidade foram submetidas ao estudo de viabilidade celular ao longo de 2 horas na presença dos *enhancers*.

As células obtidas foram suspensas em tampão fosfato Dulbecco (10 mM, pH 7,4) e divididas em duas frações, uma delas foi mantida em banho de gelo e a outra fração foi mantida nas mesmas condições em

presença do *enhancer* em concentrações 10 vezes superiores àquelas empregadas nos experimentos de *enhancement*. Imediatamente após a obtenção celular foi avaliada a viabilidade celular do controle (tempo zero), posteriormente foi adicionado o *enhancer* na segunda fração de suspensão celular e avaliada a viabilidade celular (tempo zero, para células com *enhancer*). Foram retiradas alíquotas a cada 30 minutos e feito estudo de viabilidade celular, para células na presença do *enhancer*. Para células controle apenas mais uma alíquota no tempo 70 minutos foi avaliada.

### **3.16) Avaliação do 4-Br-fenol, 1-Br-2-naftol e luciferina como possíveis *enhancers* da reação de CL nas condições propostas para células.**

Foram feitas padronizações prévias para avaliar se o método proposto para células apresentava condições de *enhancement*. Em frascos de cintilação em volume final de 2 ml de tampão fosfato Dulbecco (10mM, pH 7,4) sem glicose foram adicionados luminol ( $1 \times 10^{-5}$  M) e peróxido de hidrogênio ( $1 \times 10^{-5}$  M), os resultados obtidos foram considerados *background*. Posteriormente, foi adicionada peroxidase ( $1 \times 10^{-9}$  M), imediatamente levados ao contador de cintilação e os resultados foram considerados como experimento sem amplificação. Finalmente, foi adicionado *enhancer*. Como *enhancers* foram utilizados o 4-Br-fenol na concentração de  $0,5 \times 10^{-5}$  M, o 1-Br-2-naftol na concentração de  $0,5 \times 10^{-5}$  M e a luciferina (4,5-dihidro-2-[6-hidroxi-2-benzotiazil]-ácido-4-tiazol carboxílico) na concentração de  $17,8 \times 10^{-8}$  M. Foi utilizada também a concentração de  $1,0 \times 10^{-5}$  M de bromofenol, para avaliação da influência da concentração do *enhancer* no método proposto.

### **3.17) Avaliação da quimiluminescência celular dos PMN obtidos por sedimentação em gradiente de densidade ou por sedimentação espontânea ou presentes no sangue total utilizando *enhancers*.**

Para avaliar se os diferentes *enhancers* poderiam melhorar os resultados de CL para células foram montados 16 sistemas em frascos de cintilação contendo  $2 \times 10^5$  células obtidas por sedimentação em gradiente de densidade e  $4 \times 10^5$  células obtidas por sedimentação espontânea ou  $33 \mu\text{l}$  de sangue total em volume final de 2 ml de tampão fosfato Dulbecco (10mM, pH 7,4). Foram utilizados PMA (50ng/ml), Zy (2,5 mg/ml) e FMLP ( $4 \times 10^{-6}$  M) como estímulos e luminol ( $1 \times 10^{-5}$  M) como sonda quimiluminescente. Os sistemas foram montados adicionando-se, inicialmente, as células em volume final de 2 ml, posteriormente, o luminol e os estímulos e finalmente o *enhancer*.

Foram feitos dois controles, o controle da reação de quimiluminescência, que continha as células na ausência dos estímulos; e o controle da reação de *enhancement*, que continha as células, os estímulos ou não, na ausência do *enhancer*. A figura 12 mostra o protocolo de reações de CL para os PMN presentes no sangue total na presença ou não dos *enhancers*.

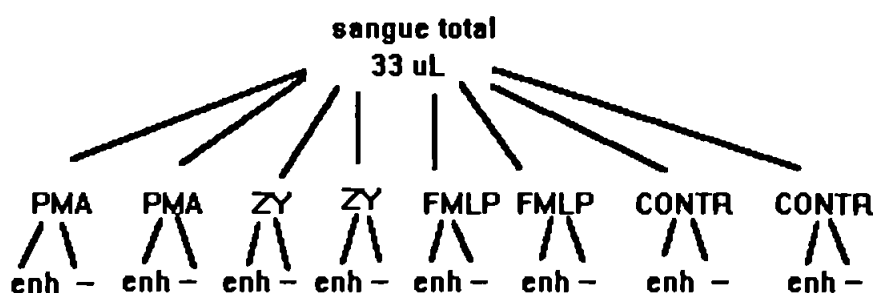
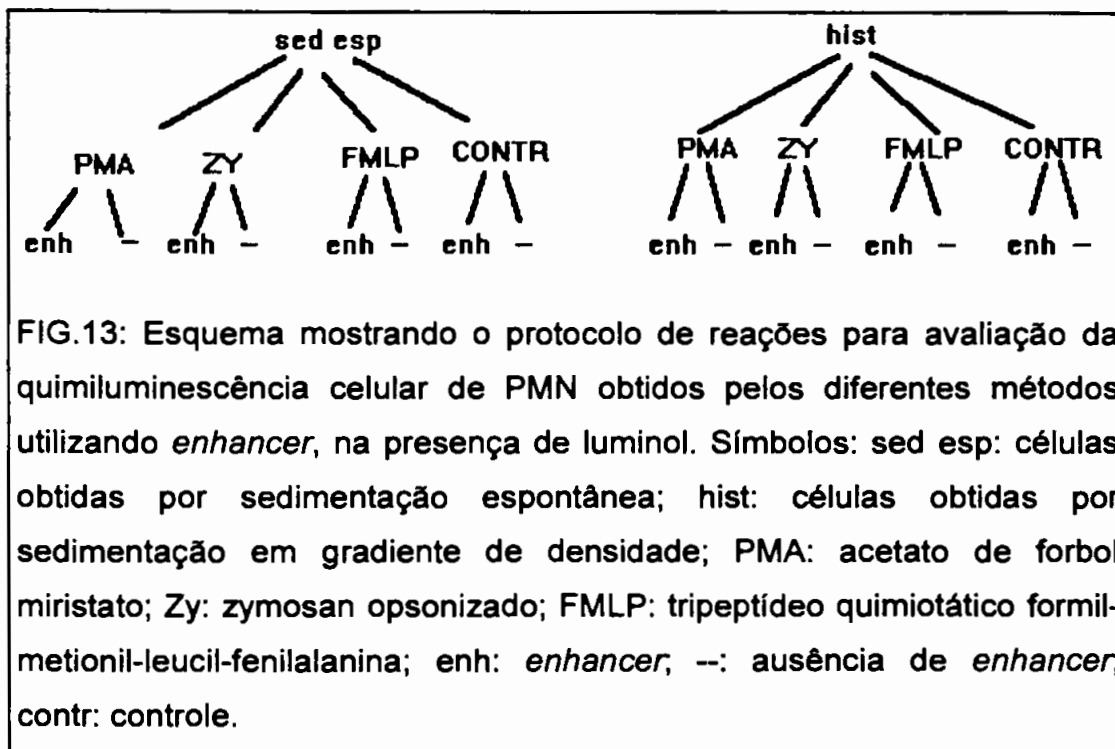


FIG.12: Esquema mostrando o protocolo de reações para avaliação da quimiluminescência celular dos PMN presentes no sangue total utilizando *enhancer* e luminol. Símbolos: PMA: acetato de forbol miristato; Zy: zymosan opsonizado; FMLP: tripeptídeo quimiotático formil-metionil-leucil-fenilalanina; enh: *enhancer*, --: ausência de *enhancer*, contr: controle.

A figura 13 mostra o protocolo de reações de CL para os PMN obtidos por sedimentação espontânea ou por sedimentação em gradiente de densidade na presença ou não de *enhancers*.



Os sistemas foram imediatamente levados a um contador de cintilação e foram registrados 14 ciclos de 6 segundos.

Como *enhancers* foram utilizados Bromofenol (4-Br-fenol) na concentração de  $0,5 \times 10^{-5} \text{M}$ , Bromonaftol (1-Br-2naftol) na concentração de  $0,5 \times 10^{-5} \text{M}$  e luciferina (4,5-dihidro-2-[6hidroxi-2-benzotiazil]-ácido-4-tiazol carboxílico) na concentração de  $17,8 \times 10^{-8} \text{M}$ .

### **3.18) Avaliação da quimiluminescência do sobrenadante, na presença de *enhancer*, de células obtidas por sedimentação espontânea e tratadas com FMLP**

Células ( $4 \times 10^5$ ) obtidas por sedimentação espontânea foram incubadas em volume final de 500 $\mu$ l de tampão fosfato Dulbecco (10mM, pH 7,4) na presença de FMLP ( $4 \times 10^{-6}$  M) ou na ausência do estímulo (controle), durante 30 minutos a 37°C. Após este período foram centrifugadas a 2.500 rpm por 5 minutos e com o sobrenadante foi avaliada a quimiluminescência na presença ou na ausência (controle) do *enhancer*. O *enhancer* utilizado foi o bromofenol ( $0,96 \times 10^{-5}$  M). A quimiluminescência foi avaliada em um contador de cintilação. Em frascos de cintilação foram montados sistemas contendo 200 $\mu$ l de sobrenadante celular, luminol ( $1 \times 10^{-5}$  M) e *enhancer* 4-Br-fenol ( $0,96 \times 10^{-5}$  M) em volume final de 2 ml de PBS Dulbecco (10mM, pH 7,4). Os controles foram feitos na ausência de *enhancer*. Observar que também foi montado controle da reação de quimiluminescência, que era composto por sobrenadante de células não tratadas com estímulo (FMLP). A figura 14 mostra o protocolo de reações para avaliação da CL do sobrenadante dos PMN em presença ou não do *enhancer*.

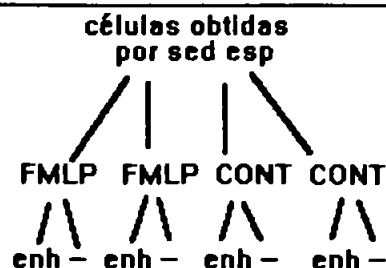


FIG.14: Esquema mostrando o protocolo de reações para avaliação da quimiluminescência do sobrenadante dos PMN obtidos por sedimentação espontânea na presença de FMLP ( $4 \times 10^{-6}$  M) ou na sua ausência (controle), utilizando *enhancer* e luminol. Símbolos: sed esp: células obtidas por sedimentação espontânea; FMLP: tripeptídeo quimiotático formil-metionil-leucil-fenilalanina; enh: *enhancer*; --: ausência de *enhancer*; cont: controle. Os sistemas foram feitos em duplicata.

### 3.19) Análise estatística

Para a análise dos resultados foram utilizados testes não paramétricos, levando-se em consideração a natureza das variáveis estudadas. Foram aplicados os seguintes testes:

1- Análise de variância por postos de Friedman (Siegel, 1975), com a finalidade de comparar os estímulos (PMA, Zy, FMLP e controle) em relação à quimiluminescência, redução do citocromo c e degranulação. Esta análise também foi utilizada para comparar a existência de diferença com significância estatística entre os processos de obtenção de células (sedimentação espontânea, sedimentação em gradiente de densidade e PMN presentes no sangue total). Quando mostrou diferença significativa esta análise foi complementada pelo teste de comparações múltiplas (Hollander, 1973). Neste teste confrontou-se cada estímulo contra o controle.

2- Teste de Wilcoxon para duas amostras não independentes (Siegel, 1975) com o objetivo de comparar, para cada estímulo, os processo de separação de células (sedimentação espontânea e sedimentação em gradiente de densidade). Este teste foi aplicado em separado, para o método da degranulação e da redução do citocromo c. Quando este teste foi aplicado para a comparação dos processos de separação independente dos estímulos, utilizou-se a aproximação com a curva normal (z calculado), em decorrência do tamanho da amostra.

Em todos os testes fixou-se em 0,05 ou 5% o nível para a rejeição da hipótese de nulidade, assinalando-se com um asterisco os valores significantes.

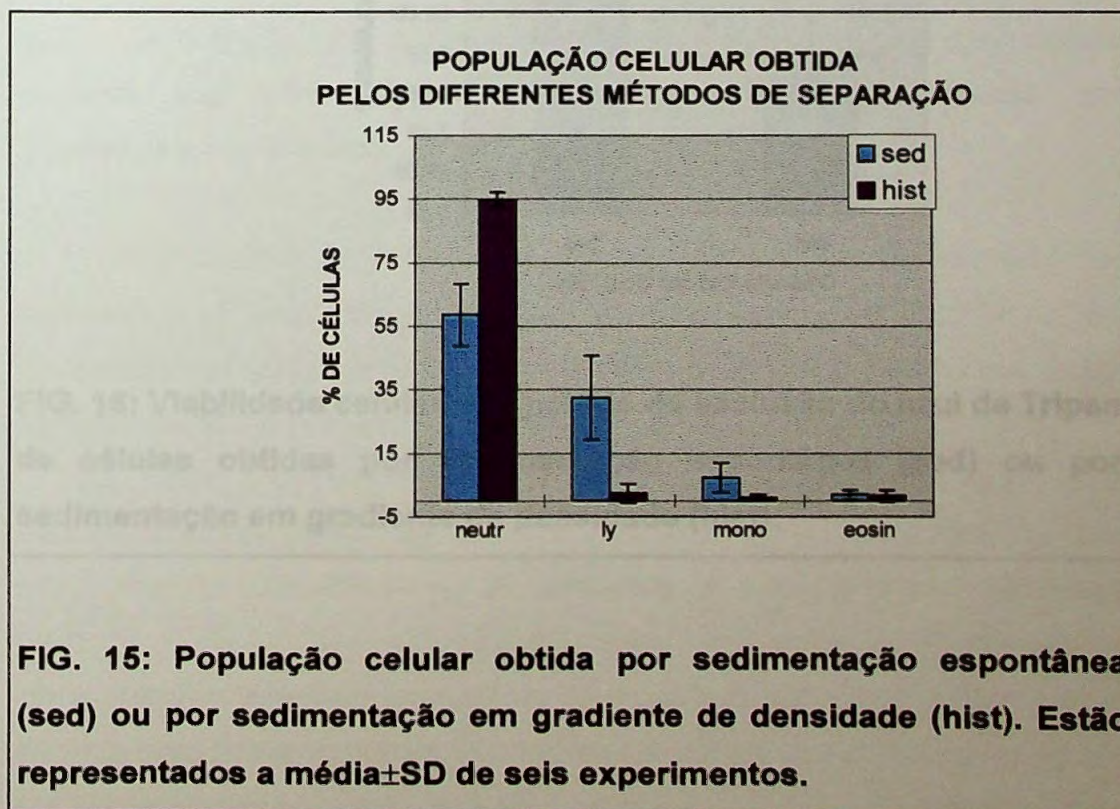
#### 4) RESULTADOS:

##### 4.1) *População celular obtida pelos diferentes métodos de separação:*

O percentual dos diferentes tipos celulares obtidos por sedimentação espontânea ou por sedimentação em gradiente de densidade são mostrados na figura 15.

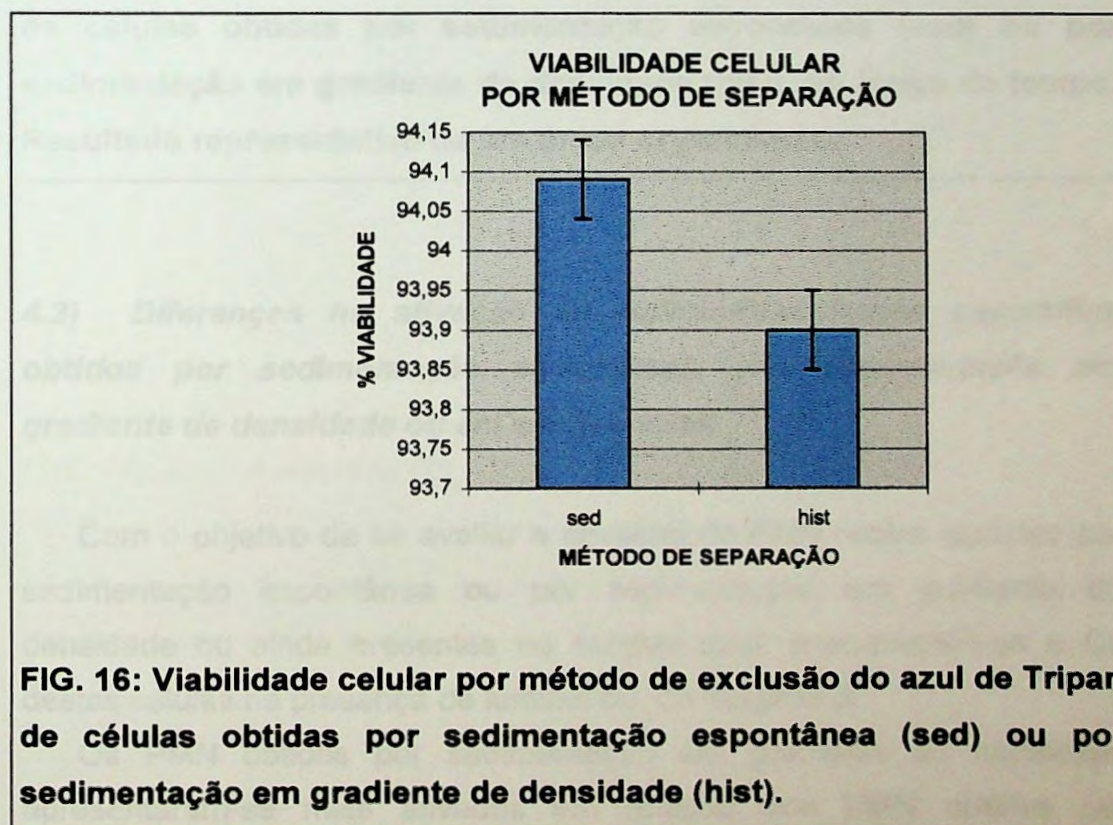
O grau de pureza de neutrófilos é maior quando as células são obtidas por sedimentação em gradiente de densidade. A obtenção de células por sedimentação espontânea mostra uma presença significativa de linfócitos e monócitos, representando ao redor de 30 e 8% respectivamente.

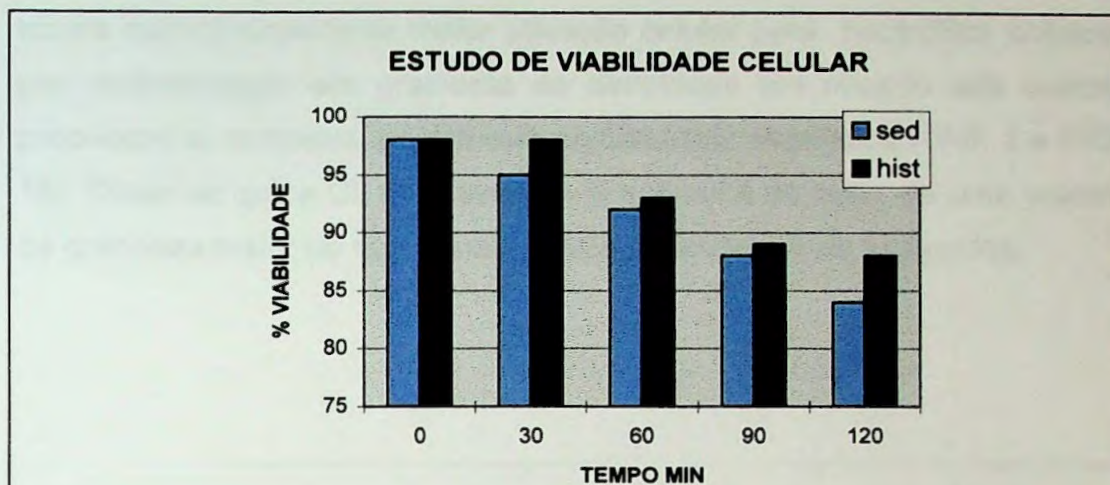
Eosinófilos, que apresentam intensa CL amplificada por luminol, estão presentes equivalentemente em ambas as preparações.



#### 4.2) Ensaios de viabilidade celular

A viabilidade de PMN isolados por sedimentação espontânea e por sedimentação em gradiente de densidade foi avaliada pelo método de exclusão do azul de Tripan (FIG. 16). Ao final do processo de obtenção dos PMN, a viabilidade destes é equivalente para ambos os métodos. Com o passar do tempo ocorre perda de viabilidade também equivalente para ambos os métodos de obtenção de células (FIG. 17). Após duas horas de incubação, as preparações perdem cerca de 13% da viabilidade.





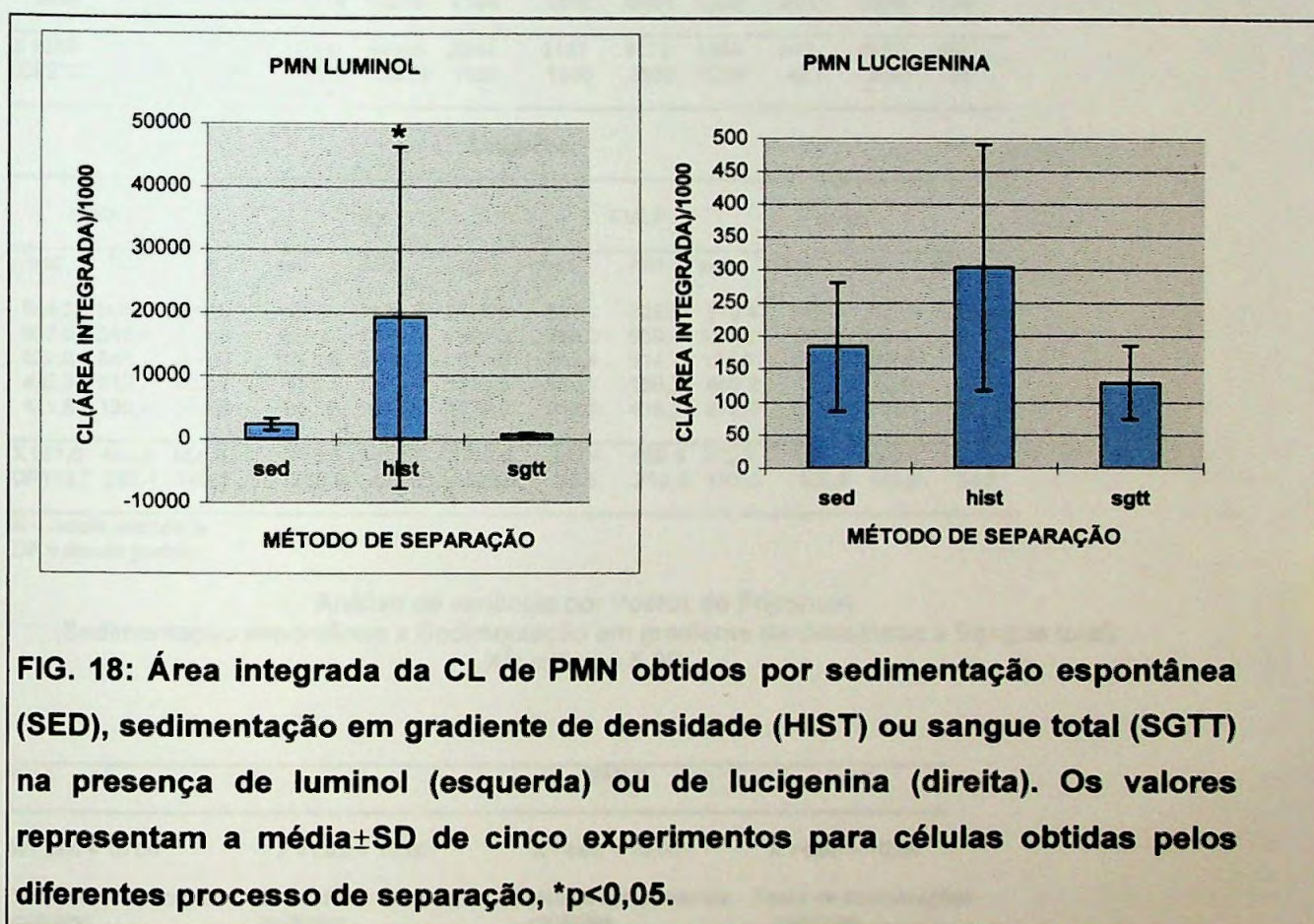
**FIG. 17:** Viabilidade celular por método de exclusão do azul de Tripán de células obtidas por sedimentação espontânea (sed) ou por sedimentação em gradiente de densidade (hist), ao longo do tempo. Resultado representativo de um único experimento.

#### **4.3) Diferenças na ativação de polimorfonucleares neutrófilos obtidos por sedimentação espontânea, por sedimentação em gradiente de densidade ou em sangue total:**

Com o objetivo de se avaliar a ativação de PMN recém isolados por sedimentação espontânea ou por sedimentação em gradiente de densidade ou ainda presentes no sangue total, acompanhou-se a CL destas células na presença de luminol ou de lucigenina.

Os PMN obtidos por sedimentação em gradiente de densidade apresentaram-se mais ativados em relação aos PMN obtidos por sedimentação espontânea ou os presentes no sangue total. A diferença para os PMN obtidos por sedimentação em gradiente de densidade apresentou-se significativamente maior em relação aos PMN presentes no sangue total nos ensaios de CL realizados utilizando luminol como sonda quimiluminescente, sendo que para ensaios utilizando lucigenina como

sonda quimiluminescente maior ativação celular para neutrófilos obtidos por sedimentação em gradiente de densidade em relação aos outros processos se reproduz, porém sem significância estatística (TAB. 1 e FIG 18). Observar que a CL na presença de luminol é ao redor de uma ordem de grandeza maior do que aquela obtida na presença de lucigenina.



**FIG. 18:** Área integrada da CL de PMN obtidos por sedimentação espontânea (SED), sedimentação em gradiente de densidade (HIST) ou sangue total (SGTT) na presença de luminol (esquerda) ou de lucigenina (direita). Os valores representam a média $\pm$ SD de cinco experimentos para células obtidas pelos diferentes processo de separação, \* $p < 0,05$ .

TABELA 1: Estado de ativação celular segundo método de quimiluminescência entre os diferentes processos de obtenção de células, sedimentação espontânea (sed), sedimentação por gradiente de densidade (hist) ou presentes no sangue total (sgtt), utilizando acetato de forbol miristato (PMA), formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP), zymosan (Zy) como estímulos celulares, ou ausência de estímulos (contr) em presença de luminol ou lucigenina como sondas quimiluminescentes.

Luminol											
PMA			Zy			FMLP			contr		
sed	hist	sgtt	sed	hist	sgtt	sed	hist	sgtt	sed	hist	sgtt
10207	36624	2950	15781	37105	4324	5690	14167	3394	1340	7970	147
10049	35016	1936	10841	30095	2256	3377	6517	324	1011	9719	206
4584	39936	1577	7431	60306	2507	1219	9069	920	282	5212	265
9834	42451	2020	9974	12275	2134	2466	6964	1332	591	5928	175
X 8669	38507	1697	11006	34945	2244	3187	9179	1194	806	7207	196
DP2727	3333	585	3496	19879	1024	1880	3506	1334	464	2041	51

Lucigenina											
PMA			Zy			FMLP			contr		
sed	hist	sgtt	sed	hist	sgtt	sed	hist	sgtt	sed	hist	sgtt
644,2	685,0	747,0	659,9	1388,6	2120,9	397,1	723,5	370,4	347,6	595,0	125,4
637,0	398,4	449,0	959,4	1270,0	992,3	268,3	659,8	123,8	117,9	297,4	76,8
822,0	845,7	396,0	1097,6	2134,4	673,2	243,4	514,7	134,5	141,7	322,9	96,4
432,9	213,7	632,1	453,3	1213,4	1293,5	190,1	168,3	460,2	89,1	90,6	219,9
421,8	180,4	556,0	657,8	1042,4	1270,0	318,1	418,2	272,0	152,2	213,9	130,0
X 551,6	464,6	556,0	765,6	1409,7	1270,0	283,4	469,9	272,2	169,7	303,9	129,7
DP113,7	292,4	140,8	258,9	423,8	538,0	78,5	219,3	146,6	102,4	186,2	54,9

X = média aritmética  
DP = desvio padrão

Análise de variância por Postos de Friedman  
(Sedimentação espontânea x Sedimentação em gradiente de densidade x Sangue total)  
 $X^2_r$  crítico = 5,99

Luminol			
PMA	Zy	FMLP	contr
$X^2_r$ calc = 10,00*	$X^2_r$ calc = 10,00*	$X^2_r$ calc = 10,00*	$X^2_r$ calc = 10,00*
Teste de comparações múltiplas	Teste de comparações múltiplas	Teste de comparações múltiplas	Teste de comparações múltiplas
hist >sgtt	hist >sgtt	hist >sgtt	hist >sgtt

Lucigenina			
PMA	Zy	FMLP	contr
$X^2_r$ calc = 1,6	$X^2_r$ calc = 4,8	$X^2_r$ calc = 3,6	$X^2_r$ calc = 5,2

Em seguida observou-se a intensidade da CL amplificada por luminol e lucigenina quando os PMN foram estimulados com PMA, ZY ou FMLP. As figuras 19-21 e as tabelas 2-4 mostram respectivamente a CL amplificada por luminol e lucigenina de PMN, obtidos por sedimentação em gradiente de densidade, sedimentação espontânea ou presentes no sangue total e estimulados a seguir com PMA, ZY ou FMLP.

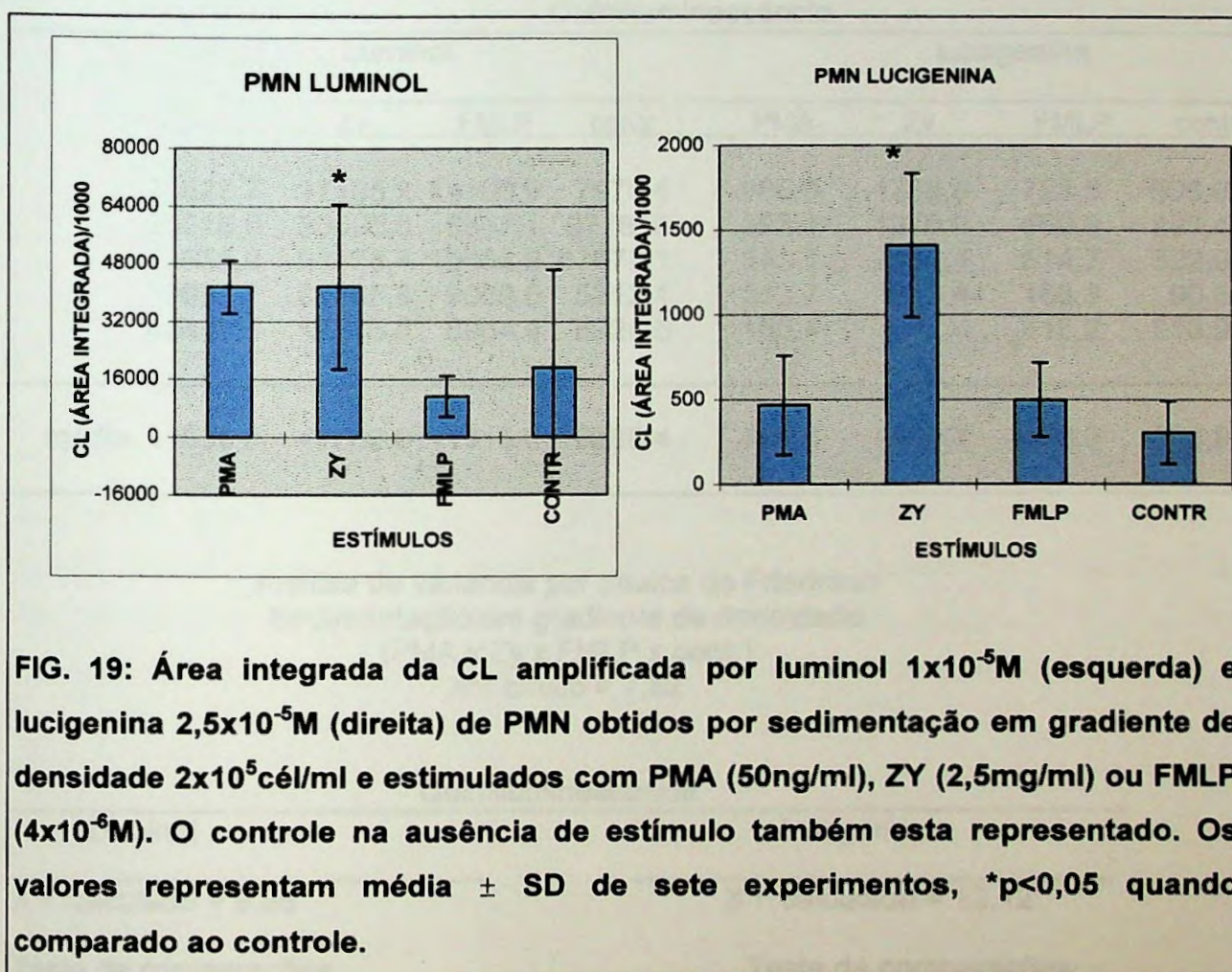


TABELA 2: Neutrófilos, presentes em sangue humano, obtidos por sedimentação em gradiente de densidade, segundo o estado de ativação avaliado pelo método de quimiluminescência utilizando luminol ou lucigenina como sondas quimiluminescentes acetato de forbol miristato (PMA), formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) ou zymosan (Zy) utilizados como estímulos ou ausência de estímulos (contr).

Quimiluminescência								
Luminol				Lucigenina				
PMA	Zy	FMLP	contr	PMA	Zy	FMLP	contr	
36623,7	37105,2	14166,9	7970,4	685,0	1388,6	723,5	595,0	
35016,0	30095,0	6517,1	9718,6	398,4	1270,0	659,8	297,4	
53655,0	68528,4	19856,9	67572,1	845,7	2134,4	514,7	322,9	
39936,1	60305,8	9069,0	5212,1	213,7	1213,4	168,3	90,6	
42450,9	12275,5	6964,4	5928,5	180,4	1042,4	418,2	213,9	
média	41536,3	41662,0	11315,0	19280,4	464,6	1409,7	496,9	303,9

Análise de variância por postos de Friedman  
Sedimentação em gradiente de densidade  
(PMA x Zy x FMLP x contr)  
 $X^2_r$  crítico = 7,82

Quimiluminescência	
Luminol	Lucigenina
$X^2_r$ calculado = 9,96*	$X^2_r$ calculado = 12,12*
Teste de comparações múltiplas	Teste de comparações múltiplas
Zy>controle	Zy>controle

TABELA 3: Neutrófilos presentes em sangue humano, obtidos por sedimentação espontânea, segundo o método de ativação avaliado pelo método de quimioluminescência utilizando luminol ou lucigenina como sondas quimioluminescentes, acetato de fosfato metilato (PMA), formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) e zymosan (Zy) utilizadas como

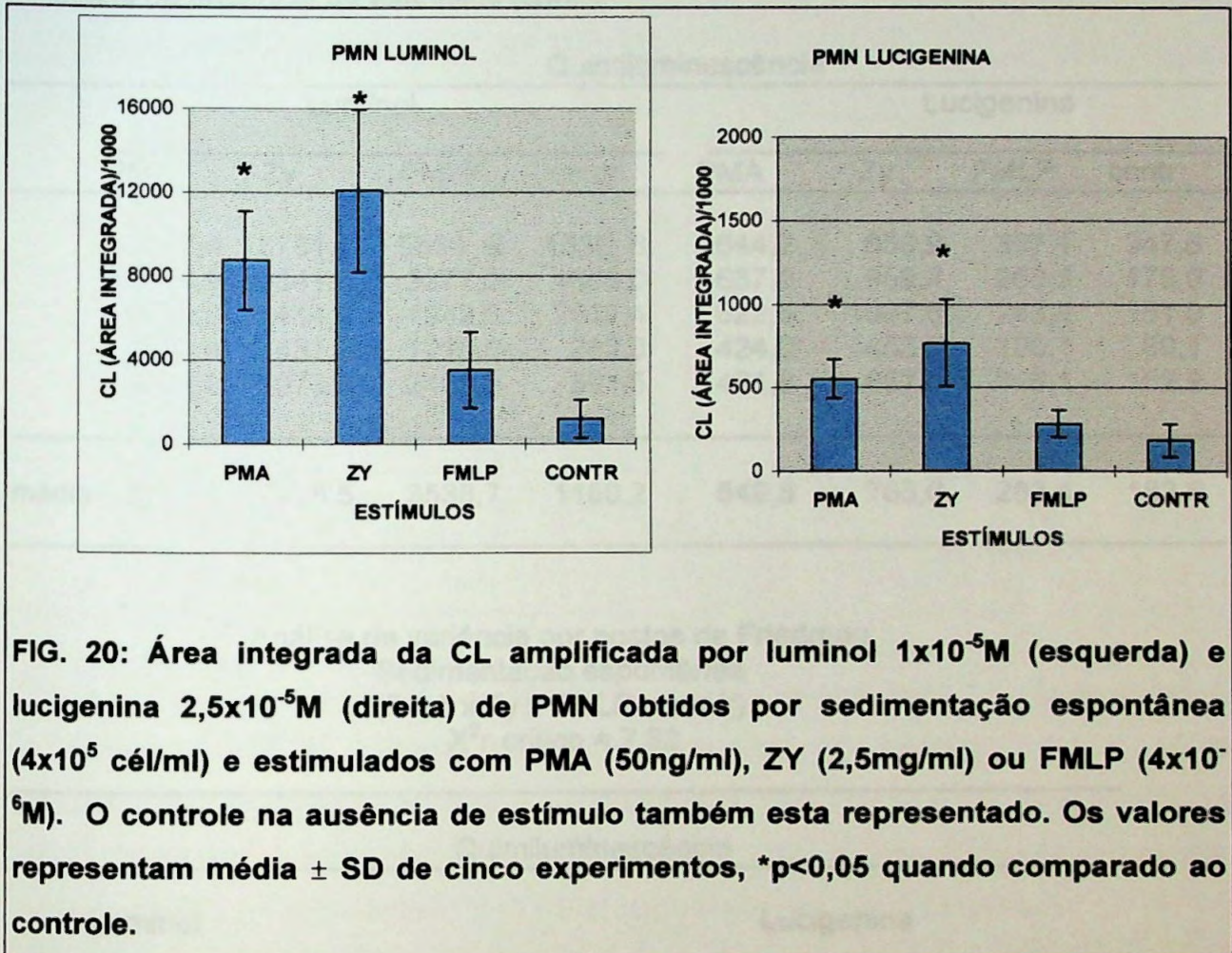
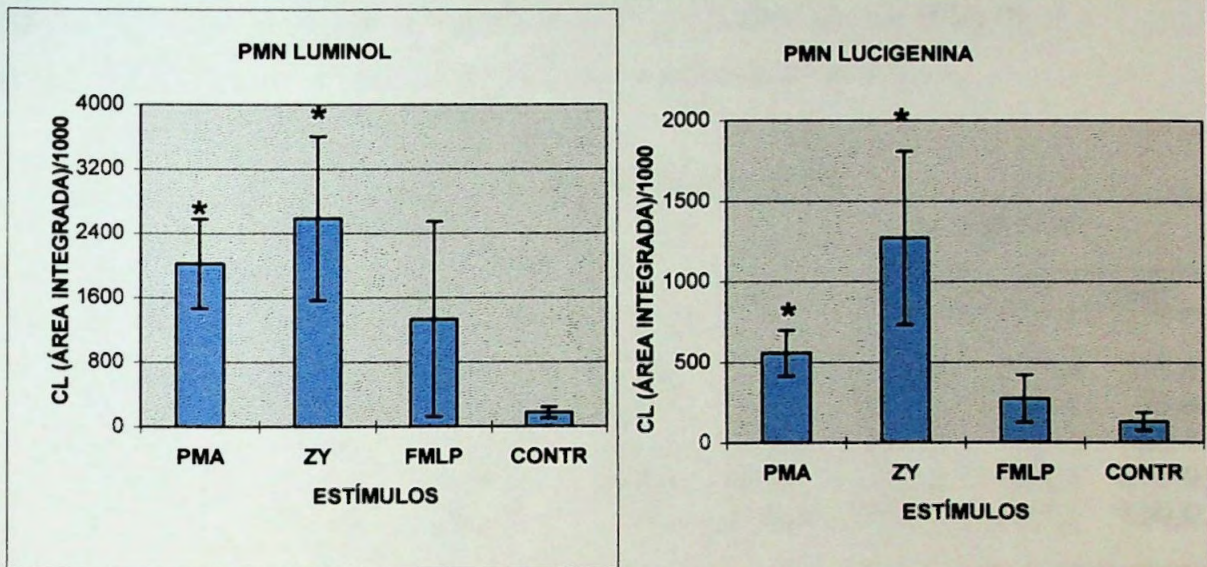


TABELA 3: Neutrófilos, presentes em sangue humano, obtidos por sedimentação espontânea, segundo o estado de ativação avaliado pelo método de quimiluminescência utilizando luminol ou lucigenina como sondas quimiluminescentes, acetato de forbol miristato (PMA), formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) ou zymosan (Zy) utilizados como estímulos ou ausência de estímulos (contr).

Quimiluminescência								
Luminol				Lucigenina				
PMA	Zy	FMLP	contr	PMA	Zy	FMLP	contr	
10207,4	15781,4	5689,6	1339,6	644,2	659,9	397,1	347,6	
10048,9	10841,5	3377,0	1068,0	637,0	959,4	268,3	178,0	
9030,9	16414,9	4942,6	2619,4	622,0	1097,6	243,4	151,0	
4584,4	7431,3	1218,6	282,3	424,0	453,3	190,1	89,1	
9834,0	9973,6	2465,9	591,5	421,8	657,8	318,1	152,2	
média	8741,1	12088,5	3538,7	1180,2	549,8	765,6	283,4	183,6

Análise de variância por postos de Friedman  
Sedimentação espontânea  
(PMA x Zy x FMLP x contr)  
 $X^2_r$  crítico = 7,82

Quimiluminescência	
Luminol	Lucigenina
$X^2_r$ calculado = 15,00*	$X^2_r$ calculado = 15,20*
Teste de comparações múltiplas	Teste de comparações múltiplas
Zy e PMA > contr	Zy e PMA > contr



**FIG. 21:** Área integrada da CL amplificada por luminol  $1 \times 10^{-5} \text{M}$  (esquerda) e lucigenina  $2,5 \times 10^{-5} \text{M}$  (direita) de PMN presentes no sangue total ( $33 \mu\text{l}$ ) e estimulados com PMA ( $50 \text{ng/ml}$ ), ZY ( $2,5 \text{mg/dl}$ ) ou FMLP ( $4 \times 10^{-6} \text{M}$ ). O controle na ausência de estímulo também está representado. Os valores representam média  $\pm$  SD de quatro experimentos,  $*p < 0,05$  quando comparados ao controle.

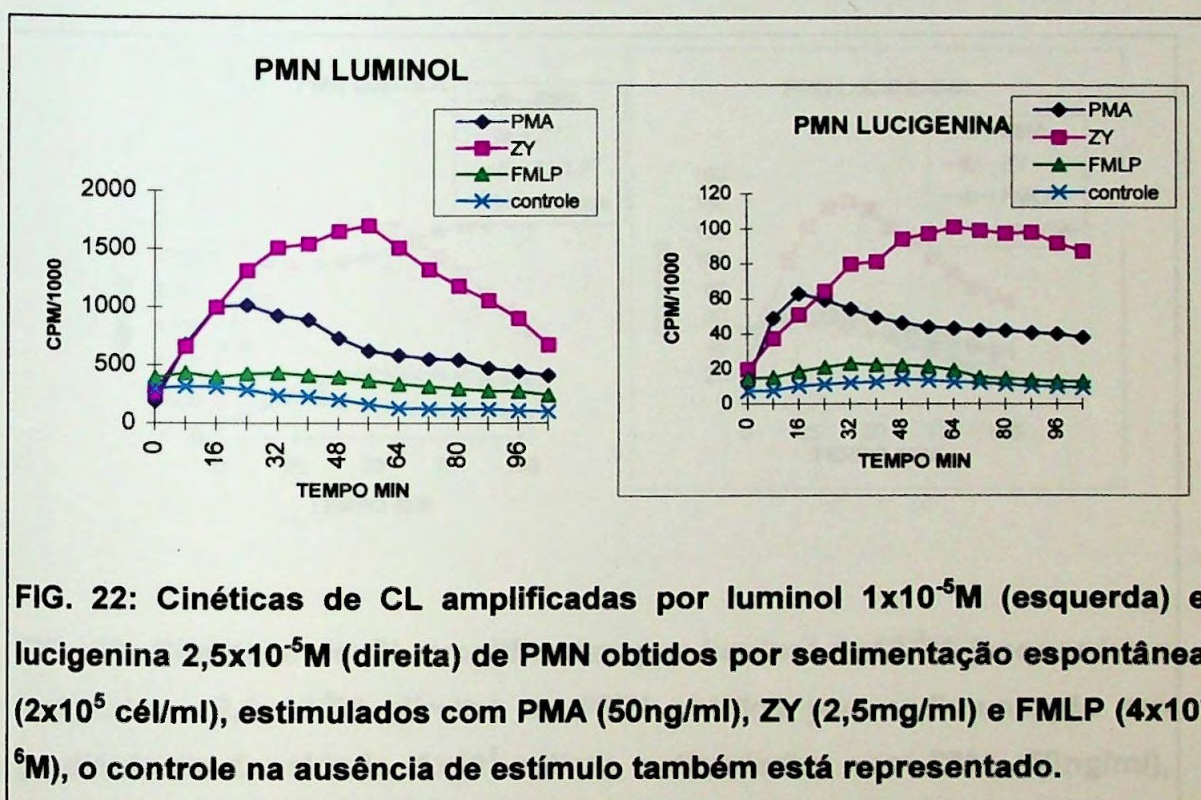
TABELA 4: Neutrófilos, presentes em sangue total humano, segundo o estado de ativação avaliado pelo método de quimiluminescência utilizando luminol ou lucigenina como sondas quimiluminescentes e acetato de forbol miristato (PMA), formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) ou zymosan (Zy) como estímulos ou ausência de estímulos (contr).

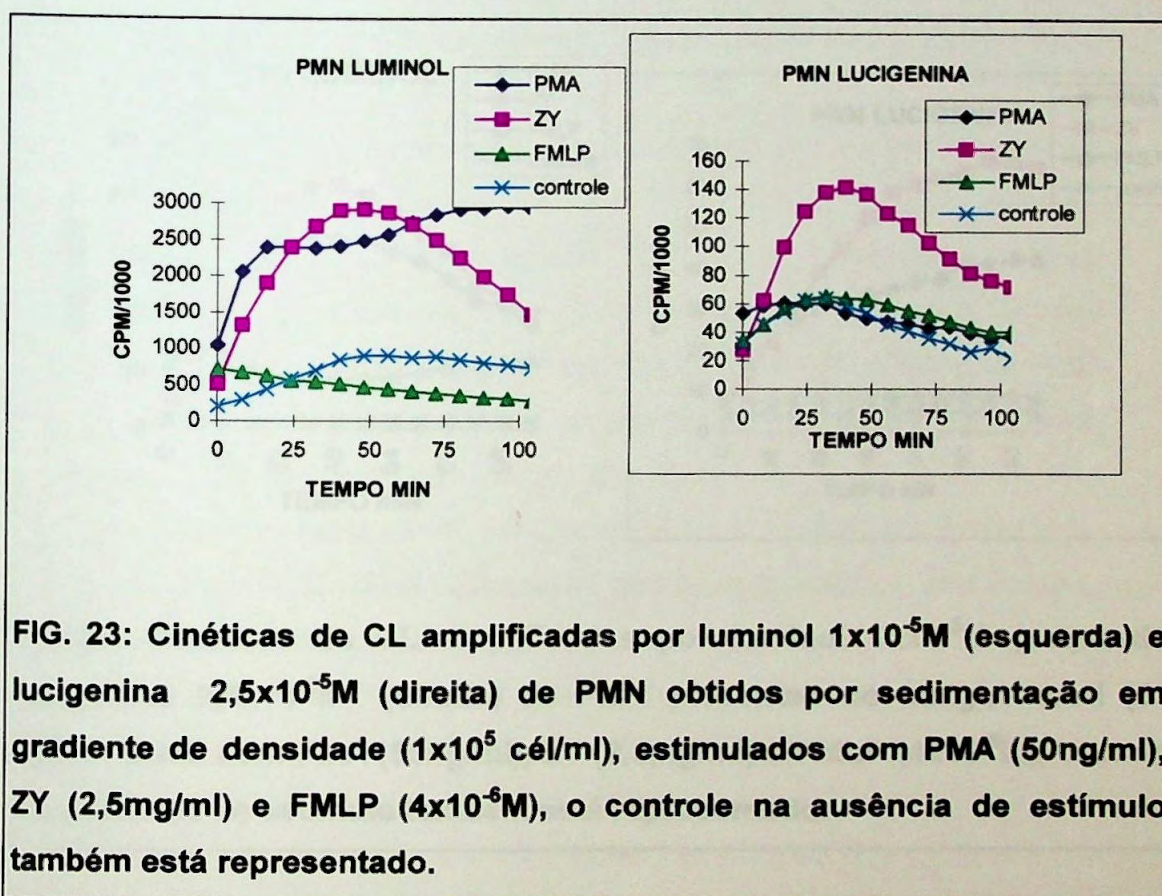
Quimiluminescência								
Luminol				Lucigenina				
PMA	Zy	FMLP		PMA	Zy	FMLP	contr	
2950,2	4323,6	3394,2	146,6	747,0	2120,9	370,4	125,4	
1936,2	2256,2	323,6	206,1	449,0	992,3	123,8	76,8	
1616,9	1699,0	692,2	82,2	396,0	673,2	134,5	96,4	
1577,1	2507,4	920,2	265,4	632,1	1293,5	460,2	219,9	
2020,0	2134,1	1332,5	175,0	556,0	1270,0	272,0	130,0	
média	2020,1	2584,1	1332,5	175,1	556,0	1270,0	272,2	129,7

Análise de variância por postos de Friedman  
Sangue Total  
(PMA x Zy x FMLP x contr)  
 $X^2_r$  crítico = 7,82

Quimiluminescência	
Luminol	Lucigenina
$X^2_r$ calculado = 14,04*	$X^2_r$ calculado = 15,00*
Teste de comparações múltiplas	Teste de comparações múltiplas
PMA > contr Zy > contr	PMA > contr Zy > contr

As figuras 22-24 ilustram as cinéticas regularmente obtidas para PMN obtidos por sedimentação espontânea, sedimentação em gradiente de densidade e sangue total, respectivamente.

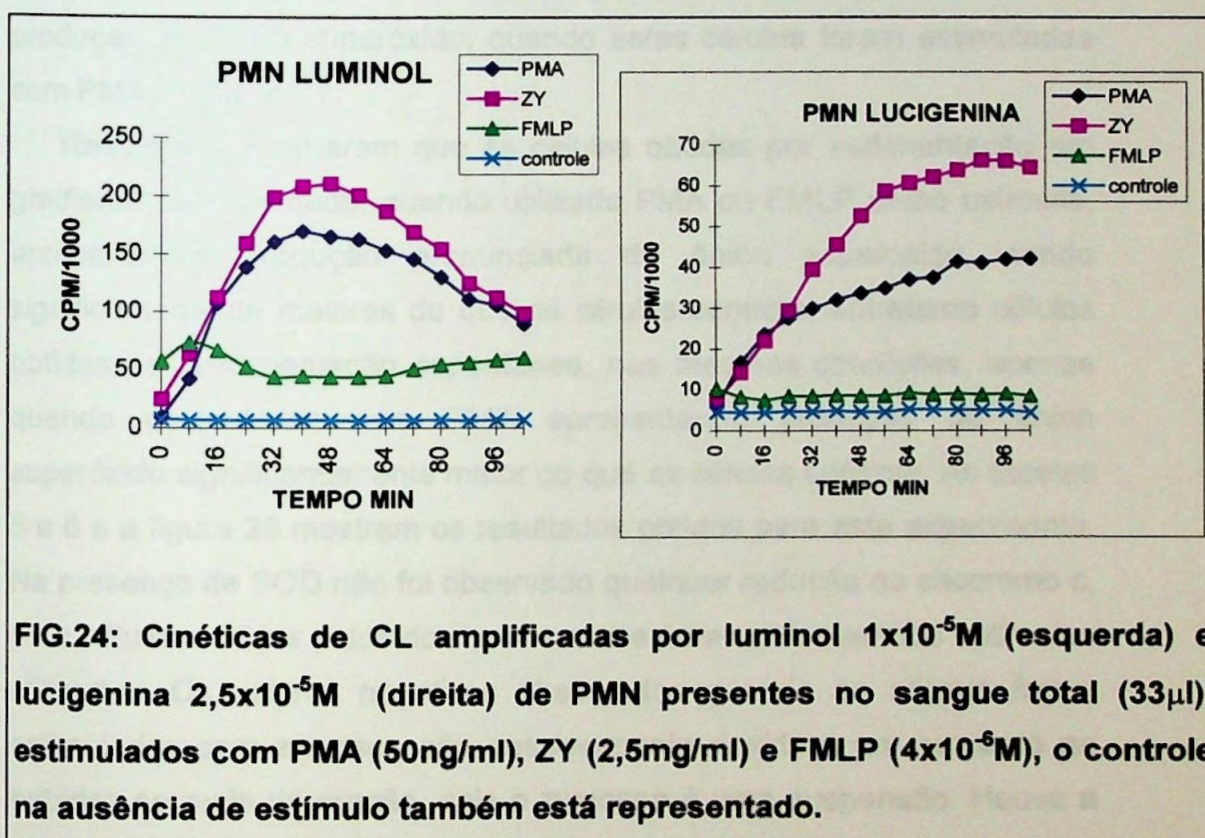




**FIG. 23: Cinéticas de CL amplificadas por luminol  $1 \times 10^{-5} \text{M}$  (esquerda) e lucigenina  $2,5 \times 10^{-5} \text{M}$  (direita) de PMN obtidos por sedimentação em gradiente de densidade ( $1 \times 10^5$  cél/ml), estimulados com PMA (50ng/ml), ZY (2,5mg/ml) e FMLP ( $4 \times 10^{-6} \text{M}$ ), o controle na ausência de estímulo também está representado.**

4.4 Diferença na adreção de PMN ativada por sedimentação espontânea ou por sedimentação em gradiente de densidade monitorizada pela redução de luminol et

Com intuito de avaliar a diferença de adreção entre as PMN ativadas através de sedimentação em gradiente de densidade ou sedimentação espontânea, foram estudadas as mudanças de fluorescência com o tempo



redução de luminol e, porém não foi observada redução de fluorescência com o tempo. PMN presentes no sangue total não puderam ser analisados devido a forte interferência da hemoglobina sobre o meio de reação.

Foi aplicado também o teste de Wilcoxon para avaliar a existência de diferenças significativas entre os processos de adreção de células (sedimentação em gradiente de densidade e sedimentação espontânea) em relação ao método de captura de células e, devido ao tamanho da amostra ( $n=4$ ) não conseguimos detectar diferenças significativas entre os

**4.4) Diferença na ativação de PMN obtidos por sedimentação espontânea ou por sedimentação em gradiente de densidade monitorados pela redução do citocromo c:**

Com intuito de avaliar a diferença de ativação entre os PMN obtidos através de sedimentação em gradiente de densidade ou sedimentação espontânea, foram feitos estudos da redução do citocromo c, que avalia a produção de ânion superóxido, quando estas células foram estimuladas com PMA, FMLP e ZY.

Resultados mostraram que as células obtidas por sedimentação em gradiente de densidade, quando utilizado PMA ou FMLP como estímulo, apresentaram produção pronunciada de ânion superóxido, sendo significativamente maiores do que as células controle; entretanto células obtidas por sedimentação espontânea, nas mesmas condições, apenas quando estimuladas com PMA apresentaram produção de ânion superóxido significativamente maior do que as células controle. As tabelas 5 e 6 e a figura 25 mostram os resultados obtidos para este experimento. Na presença de SOD não foi observado qualquer redução do citocromo c, para células obtidas pelos dois processos e para quaisquer dos estímulos utilizados. Os valores negativos observados quando as células foram estimuladas com zymosan são possivelmente devido a um aumento na turbidez no meio de reação, pois o zymosan é uma suspensão. Houve a tentativa de centrifugar o material antes da análise do espectro de redução do citocromo c, porém não foi observada redução do citocromo c.

PMN presentes no sangue total não puderam ser avaliados devido a forte interferência da hemoglobina sobre o meio de reação.

Foi aplicado também o teste de Wilcoxon para avaliar a existência de diferenças significantes entre os processo de obtenção de células (sedimentação em gradiente de densidade e sedimentação espontânea) em relação ao método da redução do citocromo c. Devido ao tamanho da amostra (n=4) não conseguimos detectar diferenças significantes entre os

processo de separação, apesar das diferenças aparentes. A tabela 7 mostra os resultados obtidos.

O teste de Wilcoxon foi, ainda aplicado para o método da redução do citocromo c, para a comparação entre os dois processos de obtenção de células independente do estímulo. Os resultados são mostrados na tabela 8. Os valores obtidos para sedimentação em gradiente de densidade foram significativamente maiores do que os obtidos para sedimentação espontânea.

TABELA 5: Neutrófilos, presentes em sangue humano, obtidos por sedimentação em gradiente de densidade, segundo o estado de ativação avaliado pelo método da redução do citocromo c, acetato de forbol miristato (PMA), formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) ou zymosan (Zy) utilizados como estímulos ou ausência de estímulos (contr).

	Redução do citocromo c			
	PMA	Zy	FMLP	contr
	0,0117	-0,0164	0,0235	0,0066
	0,0158	-0,0095	0,0095	0,0000
	0,0127	-0,0135	0,0064	0,0033
	0,0144	-0,005	0,0131	0,0001
média	0,0136	-0,0111	0,0131	0,0025

Análise de variância por postos de Friedman  
Sedimentação em gradiente de densidade  
(PMA x Zy x FMLP x contr)  
 $X^2_r$  crítico = 7,82

	Redução do citocromo c
$X^2_r$ calculado = 8,20*	
Teste de comparações múltiplas	
PMA > controle	

TABELA 6: Neutrófilos, presentes em sangue humano, obtidos por sedimentação espontânea, segundo o estado de ativação avaliado pelo método da redução do citocromo c, acetato de forbol miristato (PMA), formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) ou zymosan (Zy) utilizados como estímulos ou ausência de estímulos (contr).

Redução do citocromo c				
	PMA	Zy	FMLP	contr
	0,0021	-0,0162	0,0001	-0,0009
	0,0075	-0,0083	0,0006	0
	0,0069	-0,0136	-0,0014	0
	0,0053	-0,0003	0,0002	0,0004
média	0,0054	-0,0096	-0,0008	-0,0005

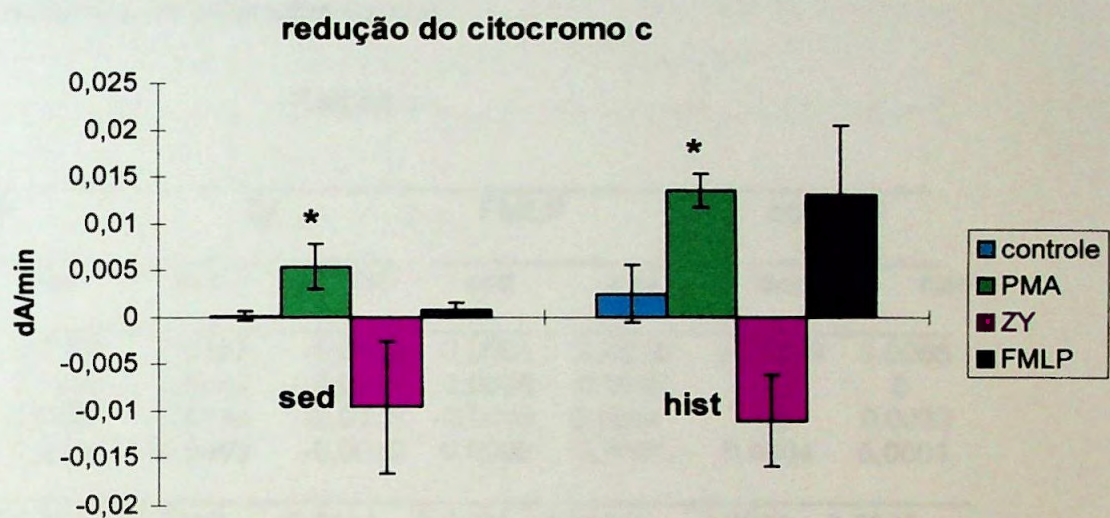
Análise de variância por postos de Friedman  
Sedimentação espontânea  
(PMA x Zy x FMLP x contr)  
 $X^2_r$  crítico = 7,82

Redução do citocromo c

$X^2_r$  calculado = 8,20\*

Teste de comparações múltiplas

PMA>controle



**FIG.25: Redução do citocromo c na presença de PMN obtidos por sedimentação espontânea  $2 \times 10^{-5}$  cél/ml (SED) ou sedimentação em gradiente de densidade  $1 \times 10^{-5}$  cél/ml (HIS) e estimulados com zymosan (ZY) 2,5 mg/ml; PMA 50ng/ml; FMLP  $4 \times 10^{-6}$  M. Os valores representam a média  $\pm$  SD de quatro experimentos. \* $p < 0,05$  quando os estímulos são comparados ao controle.**

TABELA 7: Estado de ativação celular segundo método de redução do citocromo c entre os diferentes processos de obtenção de células, sedimentação espontânea (sed), sedimentação por gradiente de densidade (hist), utilizando acetato de forbol miristato (PMA), formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP), zymosan (Zy) como estímulos celulares, ou ausência de estímulos (contr).

## Red cit c

	PMA		Zy		FMLP		contr	
	sed	hist	sed	hist	sed	hist	sed	hist
	0,0021	0,0177	-0,0162	-0,0164	0,0001	0,0235	-0,0009	0,0066
	0,0075	0,0158	-0,0083	-0,0095	0,0006	0,0095	0	0
	0,0069	0,0127	-0,0136	-0,0135	-0,0014	0,0064	0	0,0033
	0,0053	0,0144	-0,0003	-0,0050	0,0002	0,0131	0,0004	0,0001
X	0,0055	0,0151	-0,0096	-0,0111	-0,0001	0,0131	-0,0001	0,0025

## Teste de Wilcoxon

(Sedimentação espontânea x Sedimentação em gradiente de densidade)

PMA	ZY	FMLP	contr
Tcalc. = 10,00	Tcalc. = 9,00	Tcalc. = 10,00	Tcalc. = 5,00

**TABELA 8: Estado de ativação celular segundo método de redução do citocromo c entre os diferentes processos de separação de células, sedimentação espontânea (sed) ou sedimentação em gradiente de densidade (hist).**

**Teste de Wilcoxon**

**z crítico = 1,96**

**redução do citocromo c**

---

**z calculado = 2,56\***

**$\bar{X}$  hist = 0,0045**

**$\bar{X}$  sed = -0,0011**

**teste de comparações  
múltiplas**

**hist > sed**

---

#### **4.5) Determinação de MPO espectrofotometricamente:**

Foram realizadas determinações de MPO através do método espectrofotométrico, utilizando orto dianisidina, 0,1% em etanol, como substrato da reação enzimática. As concentrações de MPO utilizadas foram de 0,5 e 5 U/ml, ou seja, 10 e 100 vezes mais concentradas do que as utilizadas para os experimentos de CL. A sensibilidade deste método só detecta absorvância para concentrações superiores a 5 U/ml. A tabela 9 mostra os resultados de absorvância obtidos por esta técnica.

MPO (u/ML)	ABS
0 (referência)	0,0415
0,5	0,0465
5	0,0643

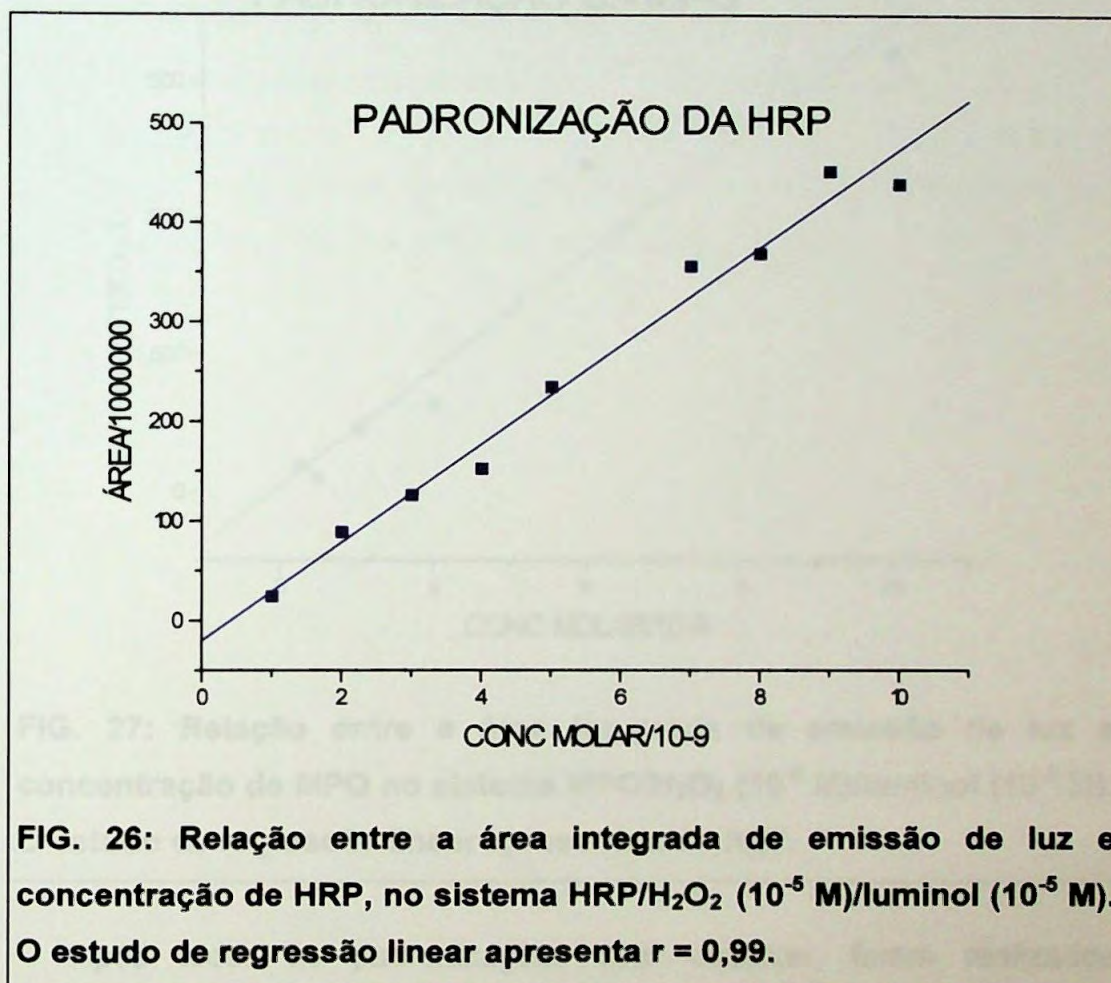
TABELA 9: Absorvância obtida para ensaio de MPO utilizando o-o-dianisidina como substrato.

#### **4.6) Estudo de Degranulação:**

Para avaliar se as diferentes formas de obtenção de PMN modificam especificamente o sistema MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-HOCL, foram feitos estudos de degranulação.

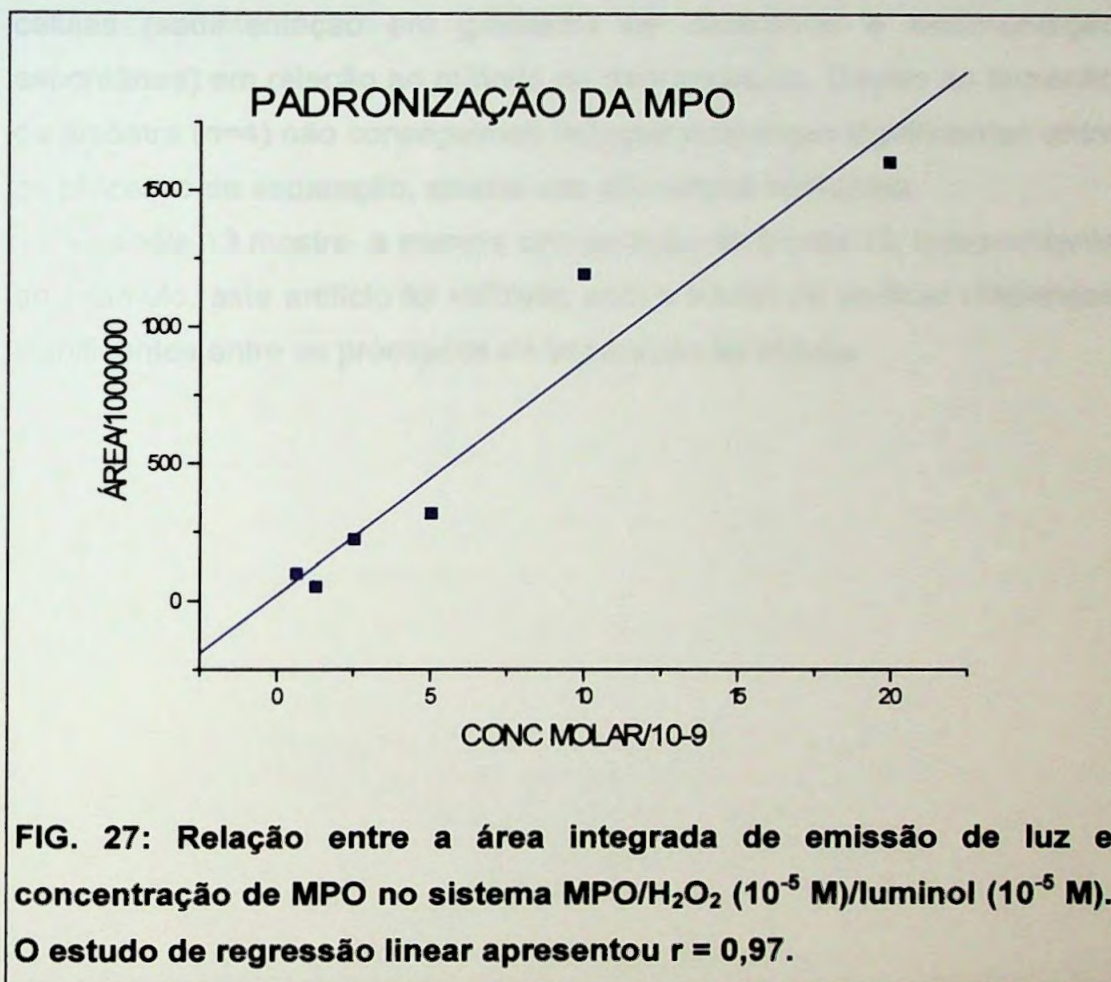
Visto que a HRP é uma hemeproteína semelhante a mieloperoxidase, padronizamos condições de reação onde seria possível determinar a concentração da enzima. Baseados nos resultados de padronização com variação da concentração da enzima HRP, foi verificado que a concentração da ordem de 10<sup>-9</sup> M apresentava resposta ao longo do tempo com valores mensuráveis pelo método proposto, não apresentando contagens muito baixas, próximas a da contagem de fundo, e nem muito altas, sobrecarregando o contador de cintilação.

Variando-se a concentração da enzima de 1 a  $10 \times 10^{-9}$  M, foram feitos estudos de padronização utilizando luminol  $10^{-5}$  M,  $H_2O_2$   $10^{-5}$  M, em volume final de 2 ml de PBS Dulbecco 10mM, pH 7,4, sem glicose. A figura 26 representa os resultados obtidos para área integrada de CL em função da variação da concentração da enzima.



Posteriormente foram feitos estudos de padronização utilizando a enzima mieloperoxidase de leucócitos humanos, obtida comercialmente. Foi considerado que 1UI de MPO é igual a 1UI de HRP. Sendo que 642 mg de HRP tem 50.000UI e conhecendo o peso molecular da HRP que é de 40.000, foram feitas conversões dos valores de concentração da HRP

para unidades. Baseados nestas unidades foram feitas soluções de MPO, correspondentes a grandeza de  $10^{-9}$  M. A figura 27 ilustra o comportamento da MPO ao longo do tempo relacionando área e concentração molar.



Após todas as padronizações com enzimas, foram realizados experimentos com sobrenadante de células. Inicialmente foram realizados experimentos variando o volume do sobrenadante, com intuito de verificar a possível ocorrência de degranulação e possibilidade de detecção de acordo com a sensibilidade do método utilizado.

Com base nos resultados obtidos do estudo de degranulação com variação do volume do sobrenadante celular, foram feitos experimentos utilizando o volume de 150 $\mu$ l. A figura 28 e a tabela 10 mostram os

resultados obtidos para o sobrenadante livre de células, enquanto a figura 29 e a tabela 11 estão relacionadas aos dados obtidos de células previamente tratadas com citocalasina B.

A tabela 12 mostra o teste de Wilcoxon aplicado para avaliar a existência de diferenças significantes entre os processos de separação de células (sedimentação em gradiente de densidade e sedimentação espontânea) em relação ao método de degranulação. Devido ao tamanho da amostra ( $n=4$ ) não conseguimos detectar diferenças significantes entre os processos de separação, apesar das diferenças aparentes.

A tabela 13 mostra a mesma comparação da tabela 12, independente do estímulo, este artifício foi utilizado com o intuito de verificar diferenças significantes entre os processos de separação de células.

TABELA 10: Neutrófilos, presentes em sangue humano, obtidos por sedimentação em gradiente de densidade, segundo o estado de ativação avaliado pelo método da degranulação, acetato de forbol miristato (PMA), formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) ou zymosan (Zy) utilizados como estímulos ou ausência de estímulos (contr).

		Degranulação							
		sem citocalasina B				com citocalasina B			
		PMA	Zy	FMLP	contr	PMA	Zy	FMLP	contr
		241,2	2707,0	421,3	281,7	529,4	8274,6	50485,9	332,0
		209,5	3996,5	280,2	101,4	126,4	1665,5	514,4	289,0
		1253,7	9673,1	1075,4	2262,4	234,2	13163,6	90961,8	308,7
		390,6	811,5	306,3	1952,9	1227,5	9994,7	59981,5	348,2
média		419,0	4297,0	520,8	1149,6	529,4	8274,6	50485,9	319,5

Análise de variância por postos de Friedman  
Sedimentação em gradiente de densidade  
(PMA x Zy x FMLP x contr)  
 $X^2_r$  crítico = 7,82

		Degranulação	
		sem citocalasina B	com citocalasina B
		$X^2_r$ calculado = 5,70	$X^2_r$ calculado = 9,90*
			Teste de comparações múltiplas
			FMLP > contr

TABELA 11: Neutrófilos, presentes em sangue humano, obtidos por sedimentação espontânea, segundo o estado de ativação avaliado pelo método da degranulação, acetato de forbol miristato (PMA), formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) ou zymosan (Zy) utilizados como estímulos ou ausência de estímulos (contr).

Degranulação								
sem citocalasina B				com citocalasina B				
PMA	Zy	FMLP	contr	PMA	Zy	FMLP	contr	
69,3	425,4	86,2	344,8	351,6	243,2	361,2	144,1	
42,9	178,8	102,2	94,8	128,7	162,6	101,1	106,8	
107,9	5102,0	88,1	64,4	553,8	182,2	480,8	41,3	
676,2	863,8	163,9	988,0	372,4	374,7	501,8	284,1	
média	224,1	1642,5	110,1	373,0	351,6	240,7	361,2	144,1

Análise de variância por postos de Friedman

(PMA x Zy x FMLP x contr)

$X^2_r$  crítico = 7,82

Degranulação	
com citocalasina B	sem citocalasina B
$X^2_r$ calculado = 5,70	$X^2_r$ calculado = 5,10

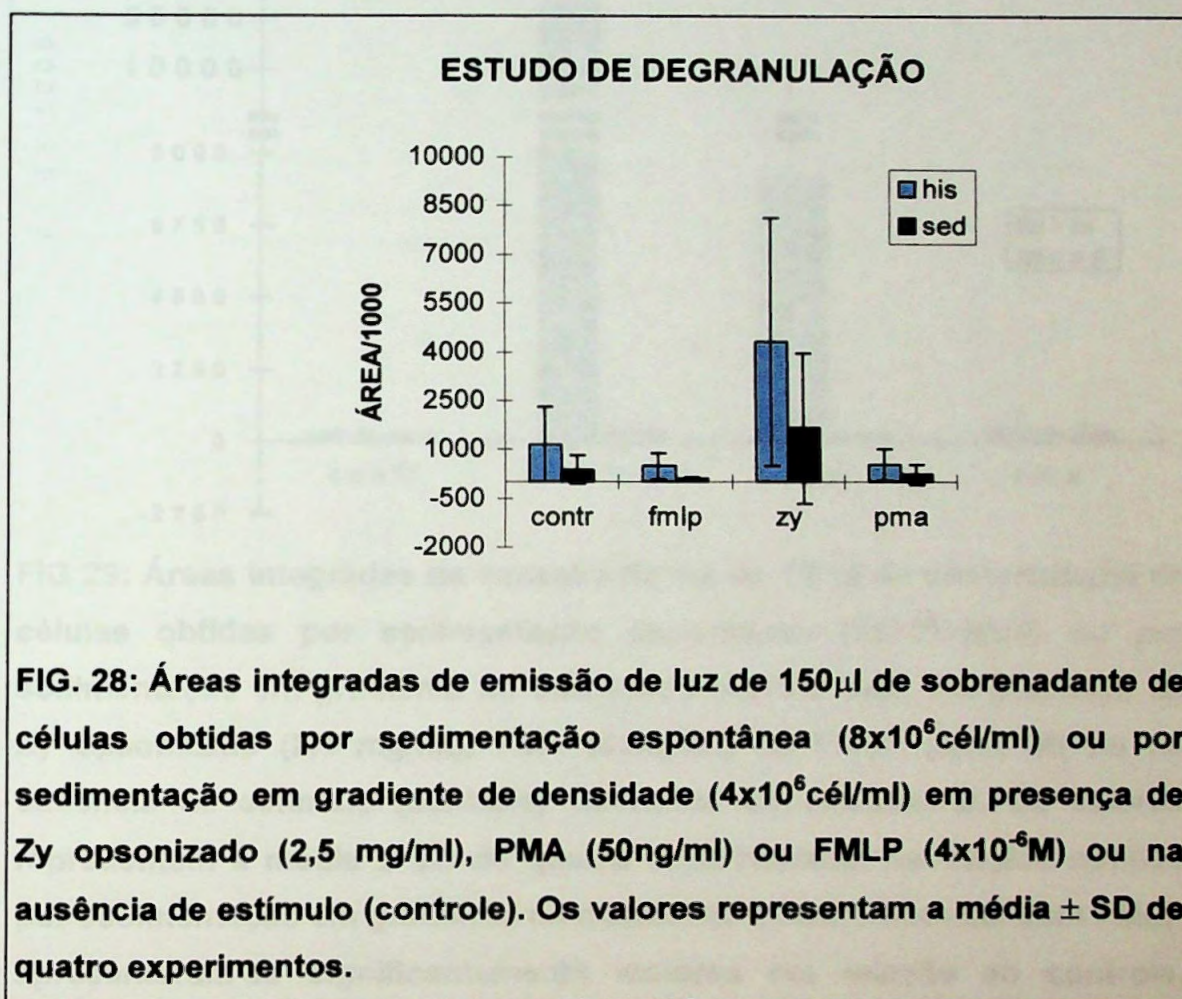


TABELA 12 Efeito da citocalasina B sobre a degranulação de células obtidas por sedimentação espontânea ou por sedimentação em gradiente de densidade em presença de Zy opsonizado, PMA ou FMLP. Os valores representam a média  $\pm$  SD de quatro experimentos. As células obtidas por sedimentação em gradiente de densidade quando tratadas com FMLP apresentaram-se significativamente maiores em relação ao controle,  $p > 0,05$ .

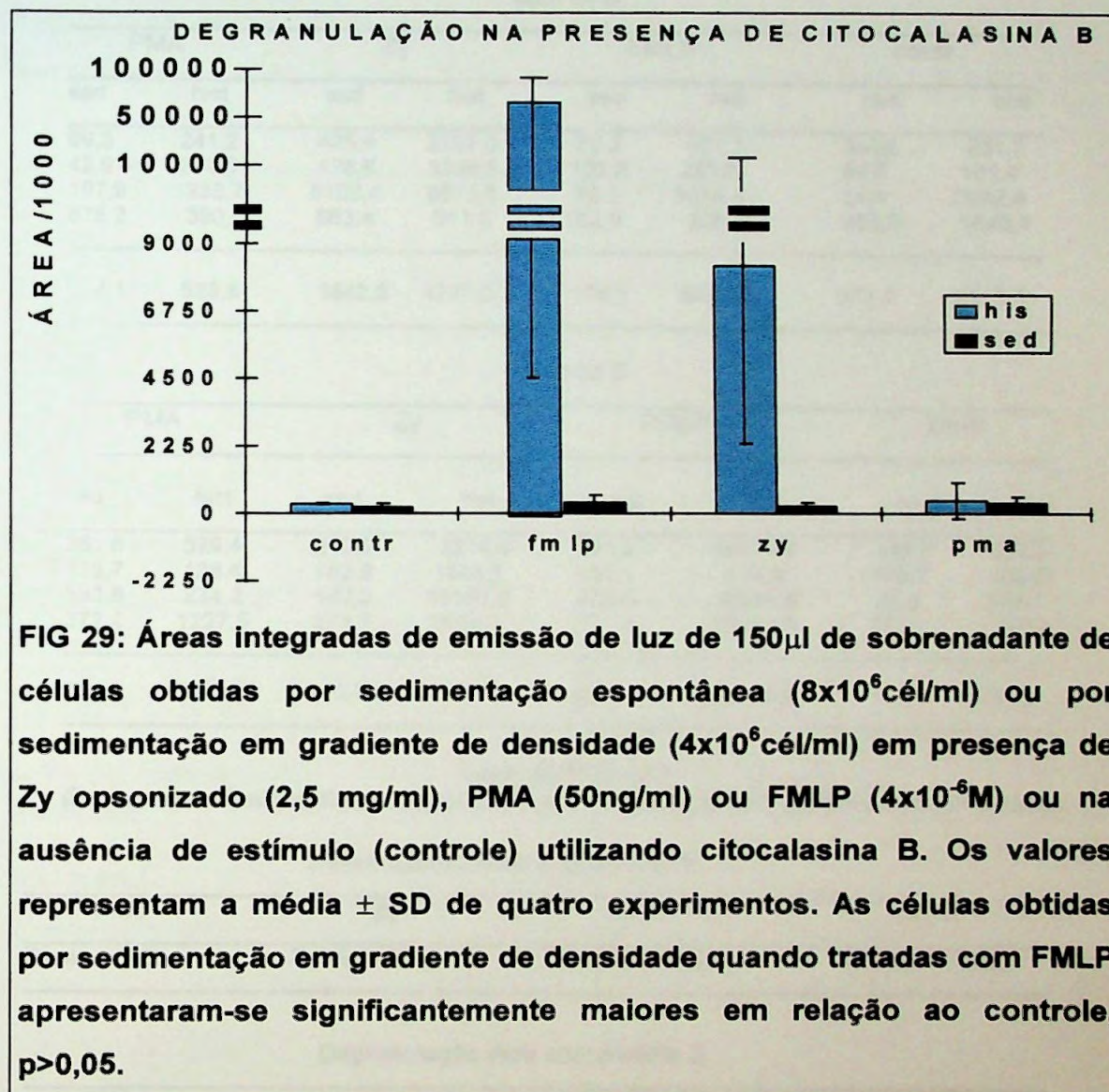


TABELA 12: Estado de ativação celular segundo método de degranulação em presença ou não de citocalasina b (cit B) entre os diferentes processos de obtenção de células, sedimentação espontânea (sed), sedimentação por gradiente de densidade (hist), utilizando acetato de forbol miristato (PMA), formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP), zymosan (Zy) como estímulos celulares, ou ausência de estímulos (contr).

com cit B							
PMA		Zy		FMLP		contr	
sed	hist	sed	hist	sed	hist	sed	hist
69,3	241,2	425,4	2707,0	82,3	421,3	344,8	281,7
42,9	209,5	178,8	3996,5	102,2	280,2	94,8	101,4
107,9	1253,7	5102,4	9673,1	88,1	1075,4	64,4	2262,4
676,2	390,6	863,4	811,5	163,9	306,2	988,0	1649,1
224,1	523,8	1642,5	4297,0	109,1	520,8	373,0	2147,3
sem cit B							
PMA		Zy		FMLP		contr	
sed	hist	sed	hist	sed	hist	sed	hist
351,6	529,4	243,2	8274,6	361,2	50485,9	144,1	332,0
128,7	126,4	162,6	1665,5	101,1	514,4	106,8	289,0
553,8	234,2	182,2	13163,6	480,8	90961,8	41,3	358,7
372,4	1227,5	374,7	9994,7	501,8	59981,5	284,1	348,2
351,6	529,4	240,7	8274,6	361,2	50485,9	144,1	332,0

Teste de Wilcoxon  
(Processo de Sedimentação espontânea x Sedimentação em gradiente de densidade)

Degranulação sem citocalasina B

PMA	Zy	FMLP	contr
T calc. = 7,00	T calc. = 9,00	T calc. = 10,00	T calc. = 8,00

Degranulação com citocalasina B

PMA	Zy	FMLP	contr
T calc. = 10,00	T calc. = 10,00	T calc. = 10,00	T calc. = 10,00

TABELA 13: Estado de ativação celular segundo método de degranulação em presença ou não de citocalasina b (cit b) entre os diferentes processos de separação de células, sedimentação espontânea (sed) ou sedimentação em gradiente de densidade (hist).

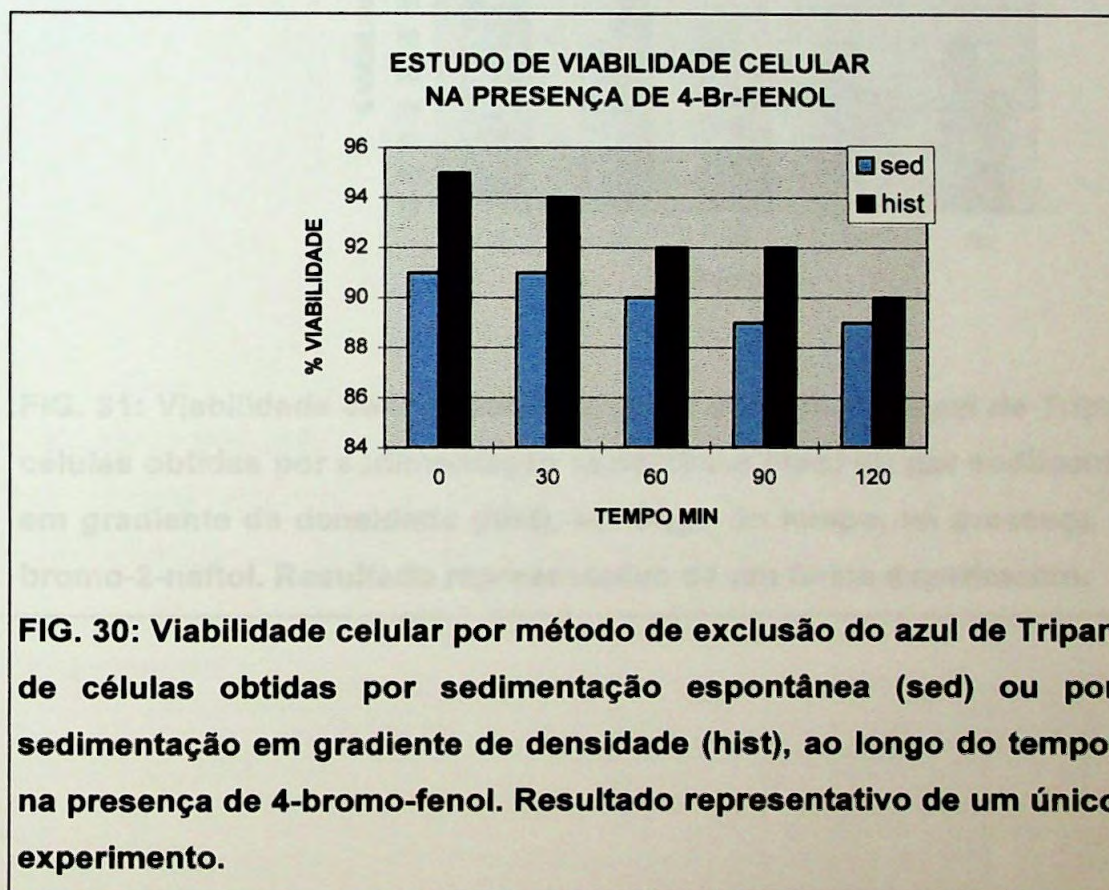
Teste de Wilcoxon

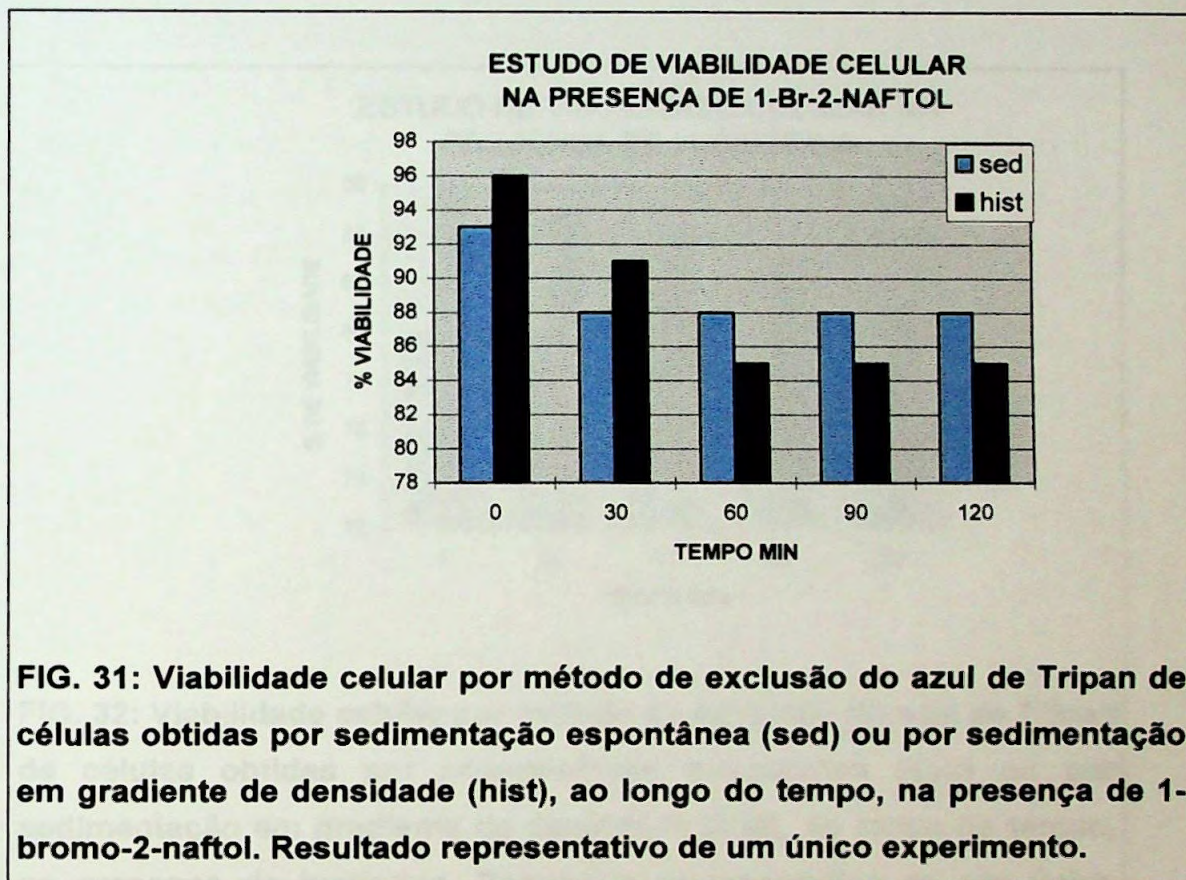
z crítico = 1,96

com cit b	sem cit b
z calculado = 3,10*	z calculado = 2,84*
$\bar{X}$ hist = 1872,2	$\bar{X}$ hist = 14905,5
$\bar{X}$ sed = 587,2	$\bar{X}$ sed = 274,4
teste de comparações múltiplas	teste de comparações múltiplas
hist > sed	hist > sed

#### 4.7) Ensaios de viabilidade celular na presença de "enhancers":

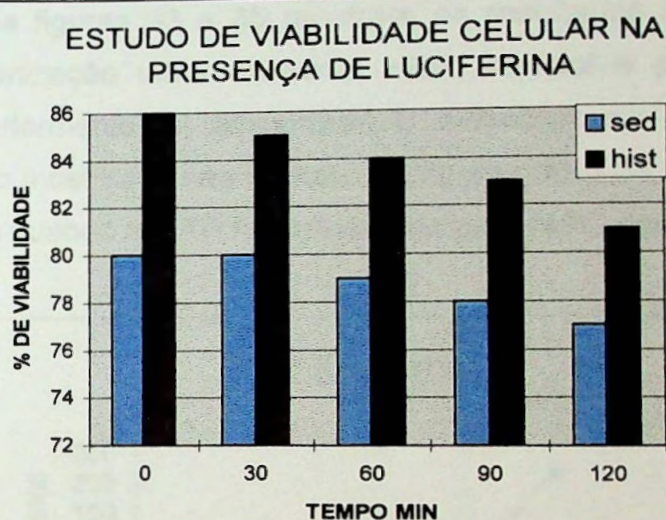
A viabilidade também foi avaliada para células em presença de 4-bromo-fenol, 1-bromo-2-naftol e luciferina. Estes *enhancers* não causam perda de viabilidade celular ao longo do tempo diferente daquela na ausência dos *enhancers* (FIG. 30, 31 e 32).





### 4.2) Efeito do "enzima-teste" do sistema celular

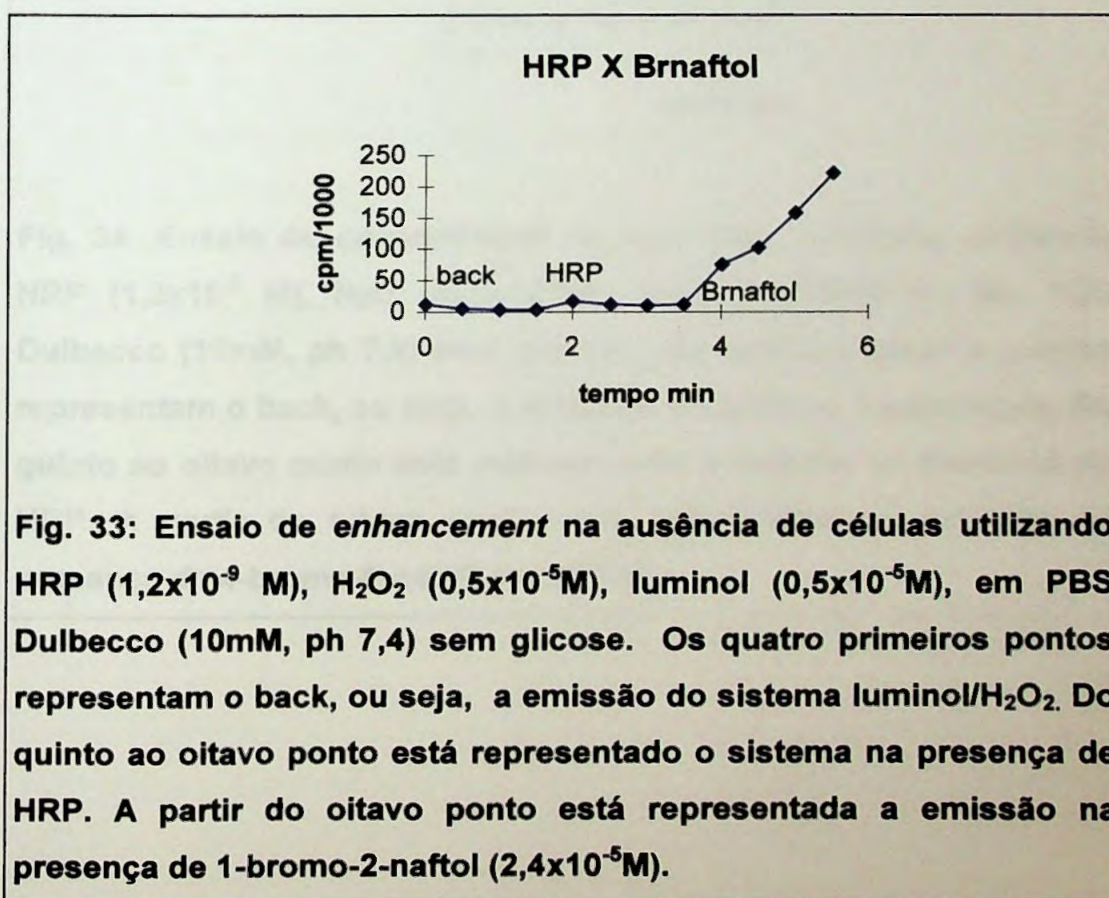
Estudo na literatura relatando sobre o aumento da atividade celular catalizada por peroxidase em resposta à presença de luciferina na presença de diversos compostos sintéticos. Este estudo tem como objetivo investigar se algum desses compostos interfere na atividade da enzima luciferase. Para isso, foram realizados os seguintes experimentos:

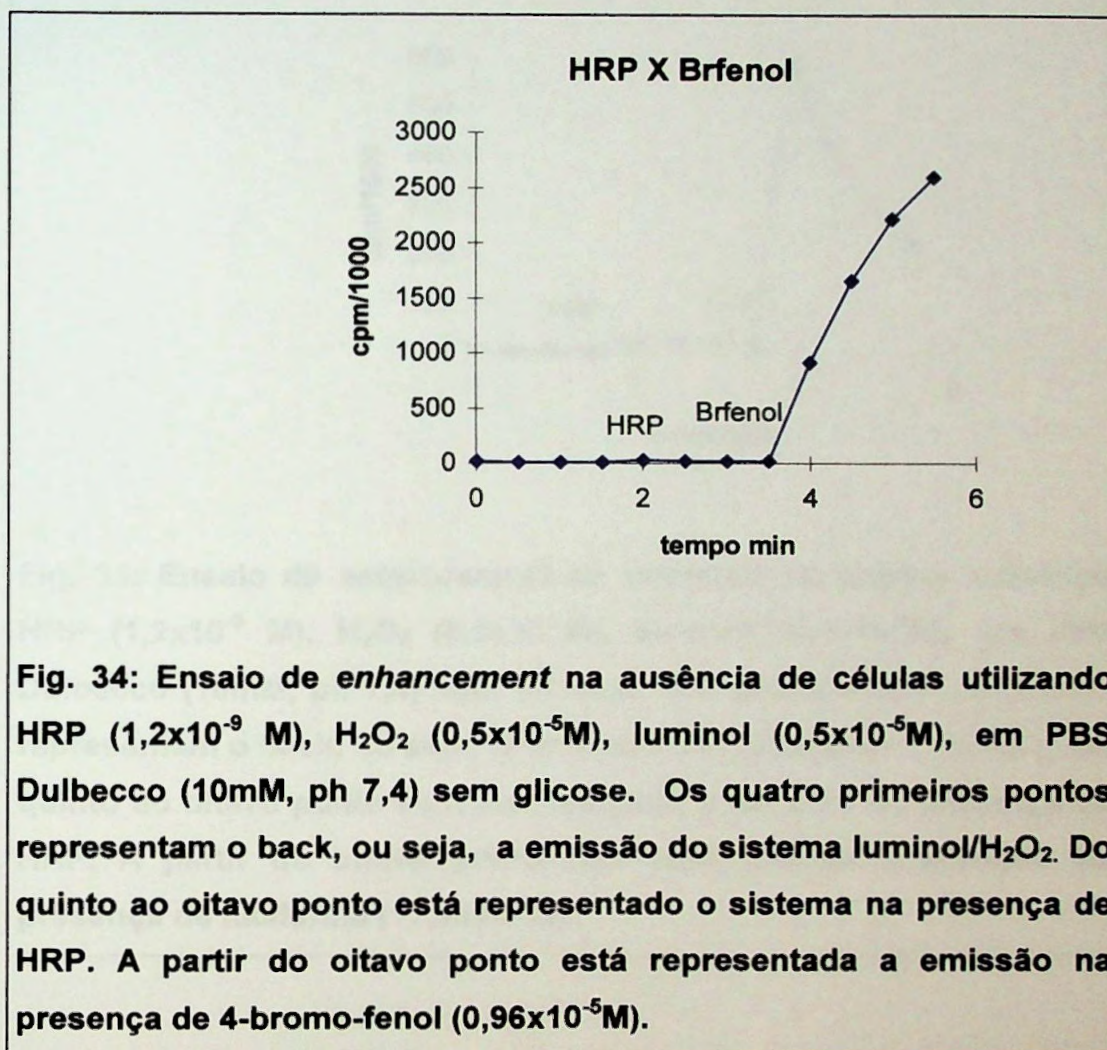


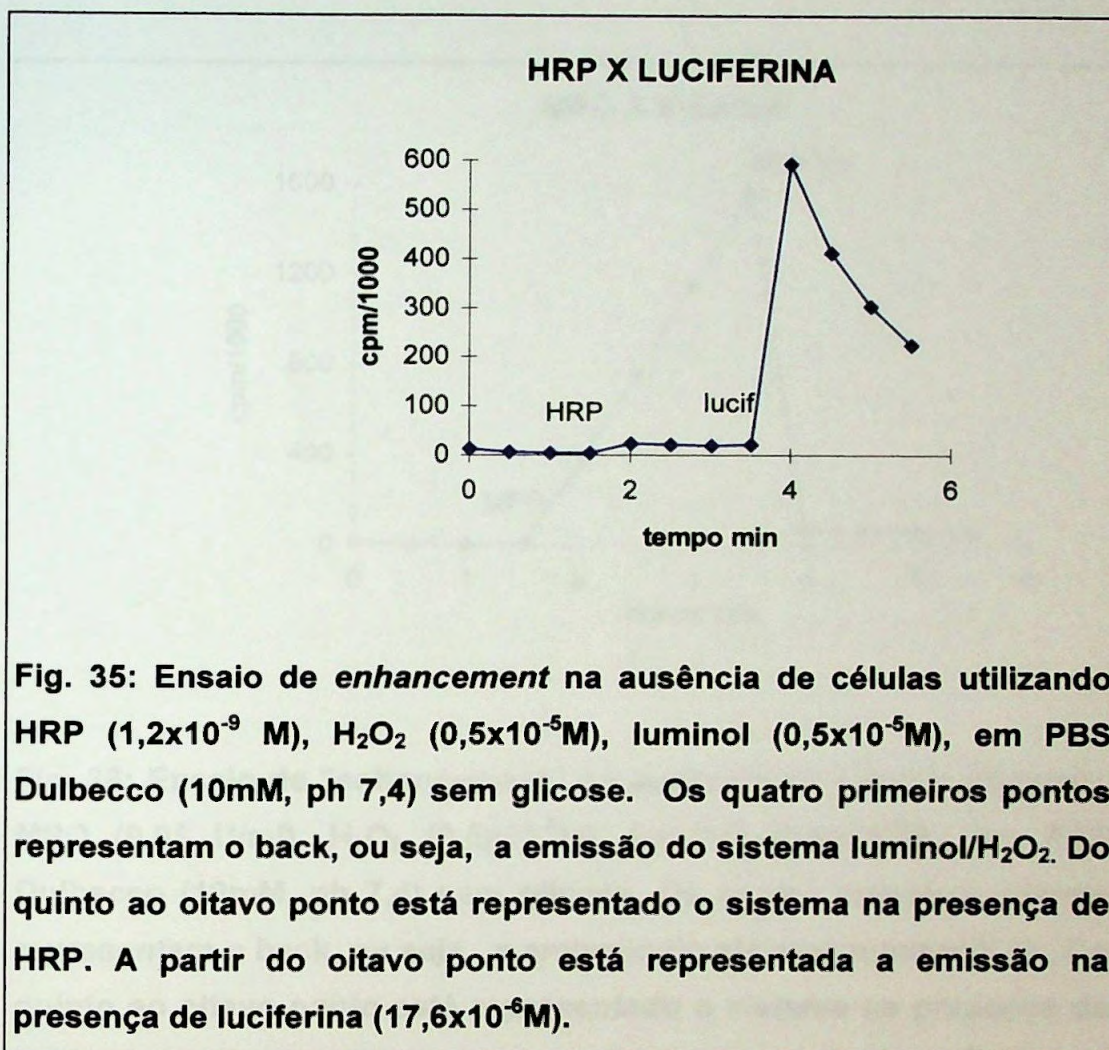
**FIG. 32: Viabilidade celular por método de exclusão do azul de Tripán de células obtidas por sedimentação espontânea (sed) ou por sedimentação em gradiente de densidade (hist), ao longo do tempo, na presença de luciferina. Resultado representativo de um único experimento.**

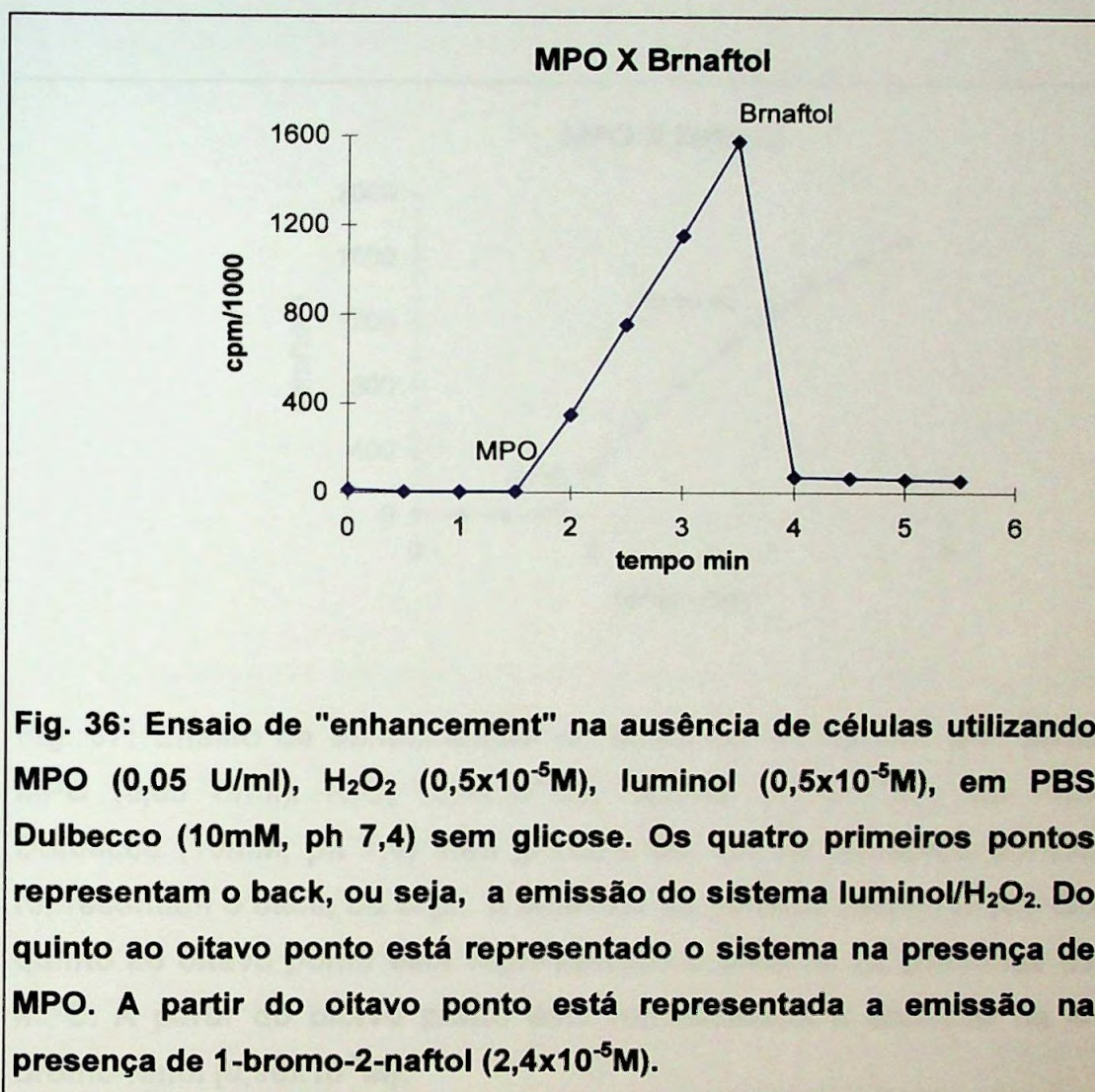
#### 4.8) Ensaio de "enhancement" do sistema celular:

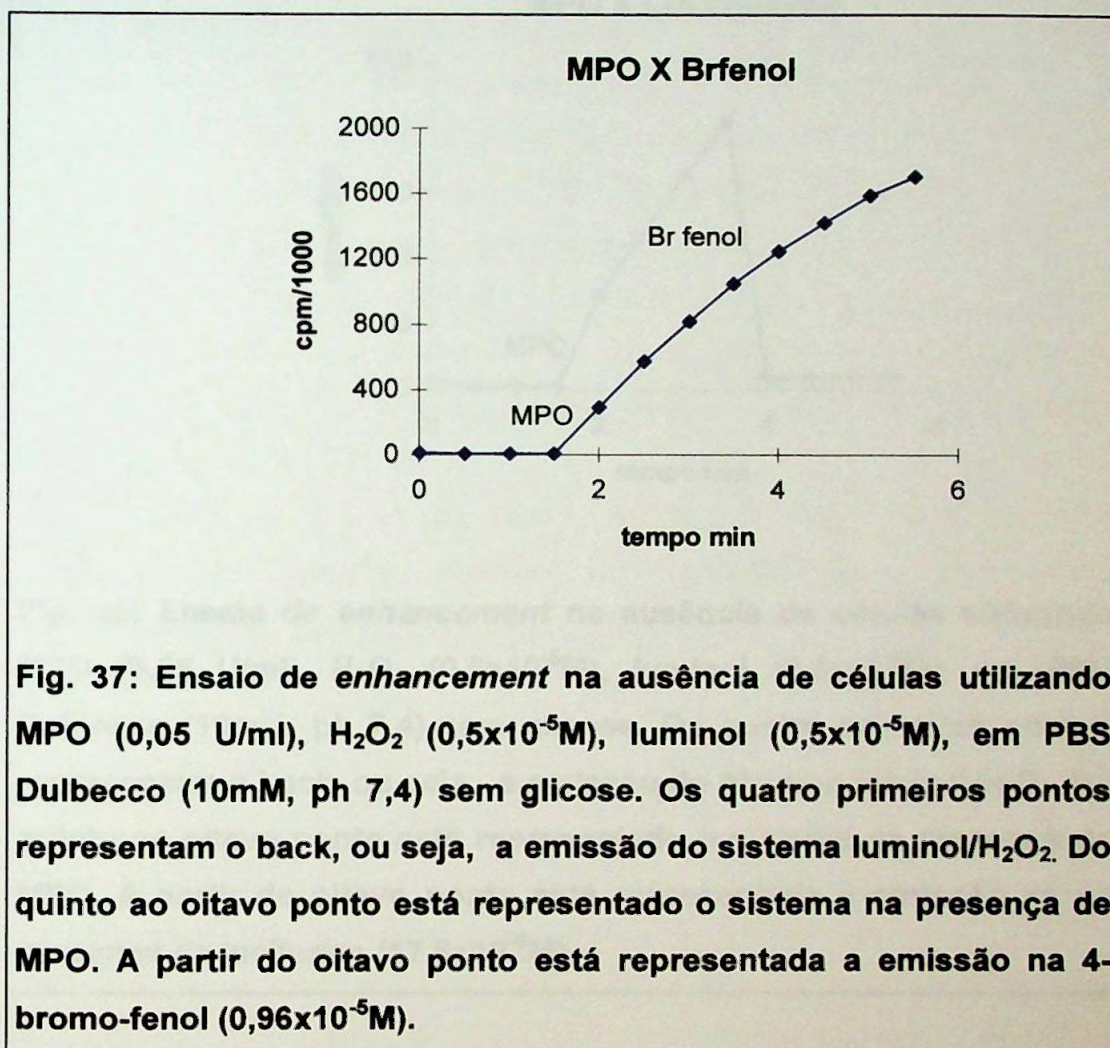
Existem na literatura referências sobre o aumento da CL de reações catalisadas por peroxidase, em especial a oxidação do luminol na presença de diferentes compostos denominados *enhancers*. Visando averiguar se algum destes compostos poderia ter o mesmo efeito sobre a reação MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/luminol 4-bromo-fenol, 1-bromo-2-naftol e luciferina foram testados. As figuras 33 a 35 mostram os resultados obtidos nos estudos de padronização utilizando-se a HRP, luminol e peróxido de hidrogênio. Posteriormente foi adicionado o *enhancer* em estudo. As concentrações são mostradas nas figuras. As figuras 36 a 38 mostram os resultados obtidos quando a HRP foi substituída pela MPO comercial.

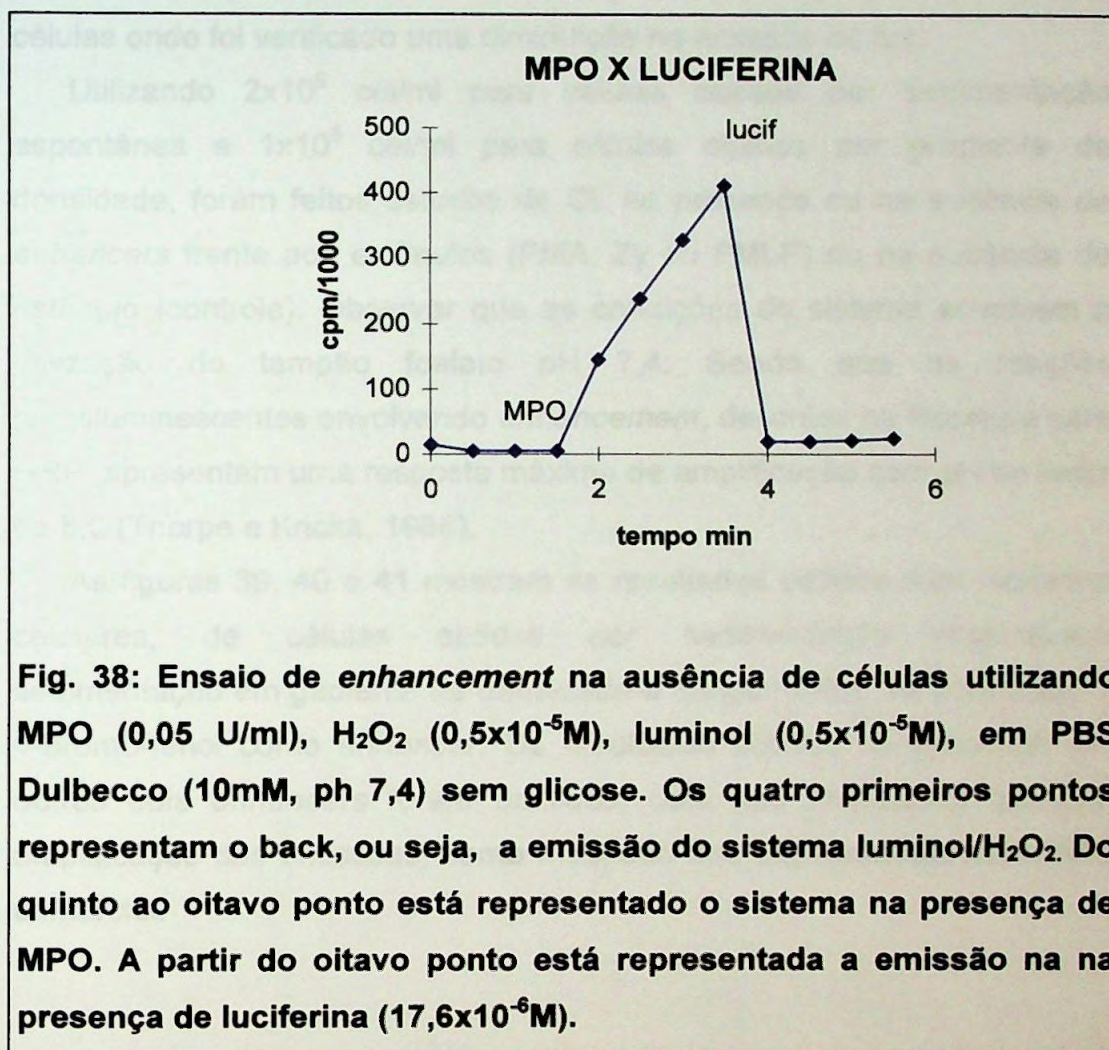










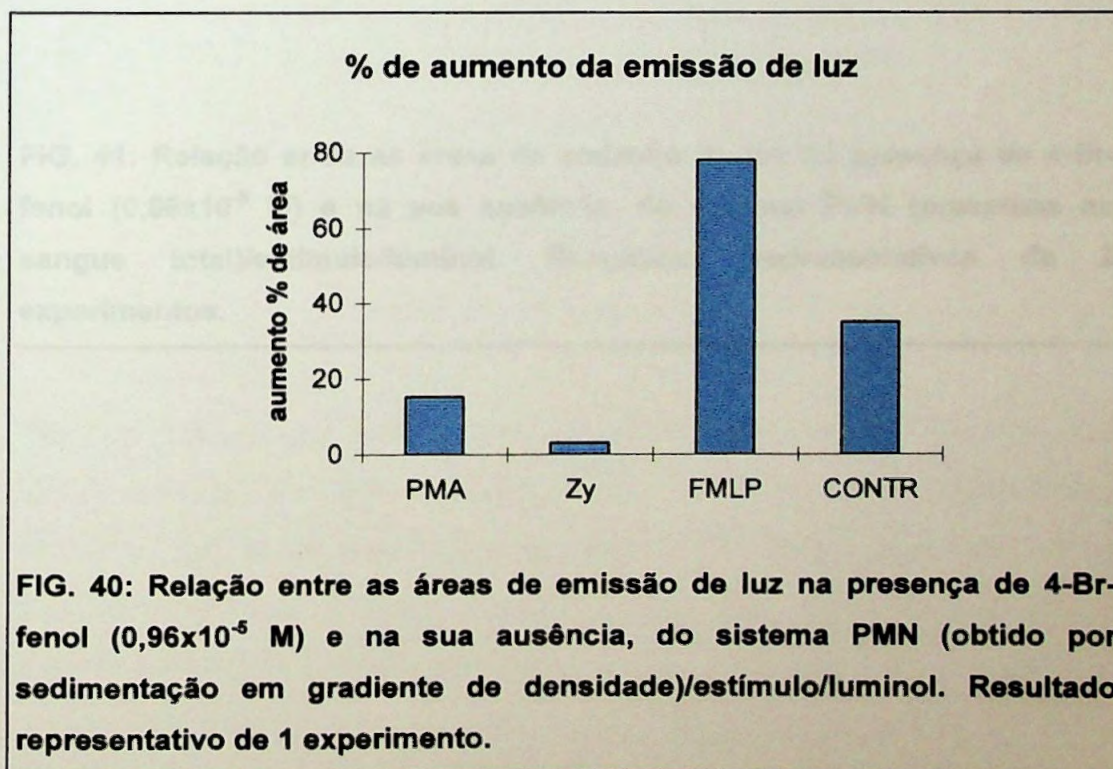
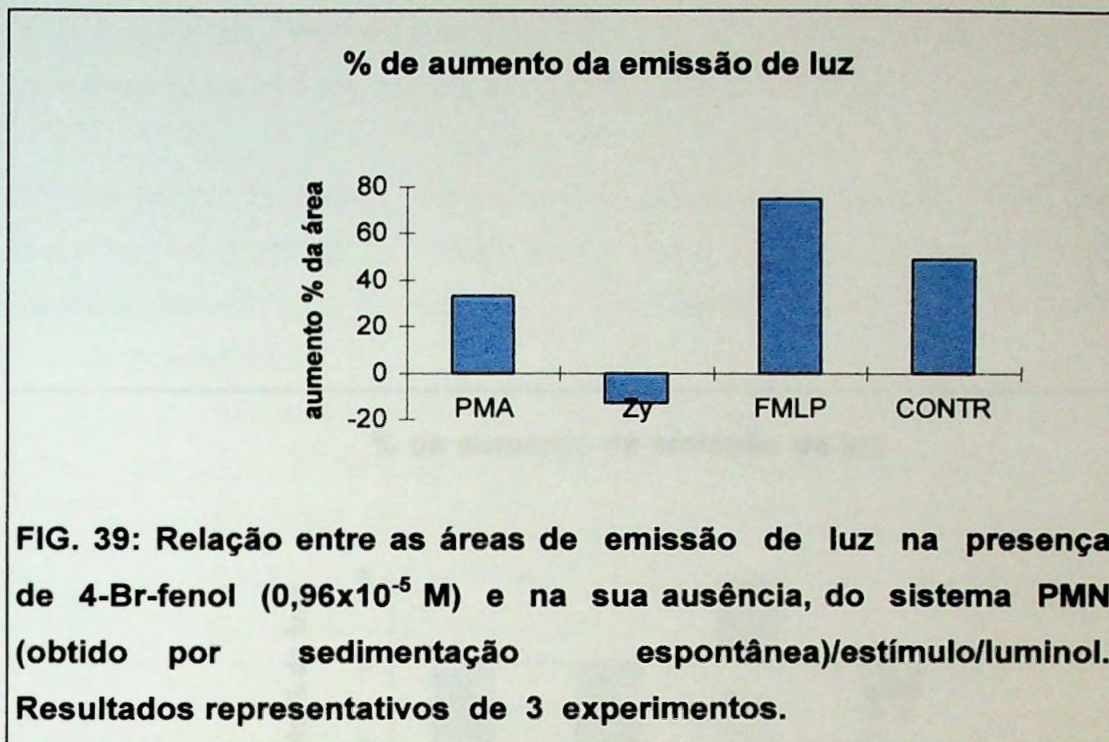


De acordo com as figuras 36 e 38, podemos observar que o 1-bromo-2-naftol ou a luciferina não são apropriados para reações de *enhancement* nas condições onde são efetuados os ensaios com o sistema celular.

Este resultado está de acordo com os resultados para sistemas com células onde foi verificado uma diminuição na emissão de luz.

Utilizando  $2 \times 10^5$  cél/ml para células obtidas por sedimentação espontânea e  $1 \times 10^5$  cél/ml para células obtidas por gradiente de densidade, foram feitos estudos de CL na presença ou na ausência de *enhancers* frente aos estímulos (PMA, Zy ou FMLP) ou na ausência de estímulo (controle). Observar que as condições do sistema envolvem a utilização do tampão fosfato pH 7,4. Sendo que as reações quimiluminescentes envolvendo *enhancement*, descritas na literatura para HRP, apresentam uma resposta máxima de amplificação com pH ao redor de 8,6 (Thorpe e Kricka, 1986).

As figuras 39, 40 e 41 mostram os resultados obtidos com sistemas celulares, de células obtidas por sedimentação espontânea, sedimentação em gradiente de densidade e sangue total, na presença de 4-bromo-fenol como *enhancer*. Os resultados obtidos na presença dos outros dois *enhancers* foram omitidos, pois não mostraram qualquer amplificação das emissões, como mostrado nos experimentos com MPO comercial.



#### 4.3) Efeito do "barramento" de comunicação de células citadas por endonúcleos de células de sangue total

Para verificar se o sistema PMN (presentes no sangue total) estimula a produção de luz na presença de 4-br-fenol, foram realizados experimentos com o sistema PMN (presentes no sangue total) e estímulo/luminol. Os resultados são apresentados na figura 41.

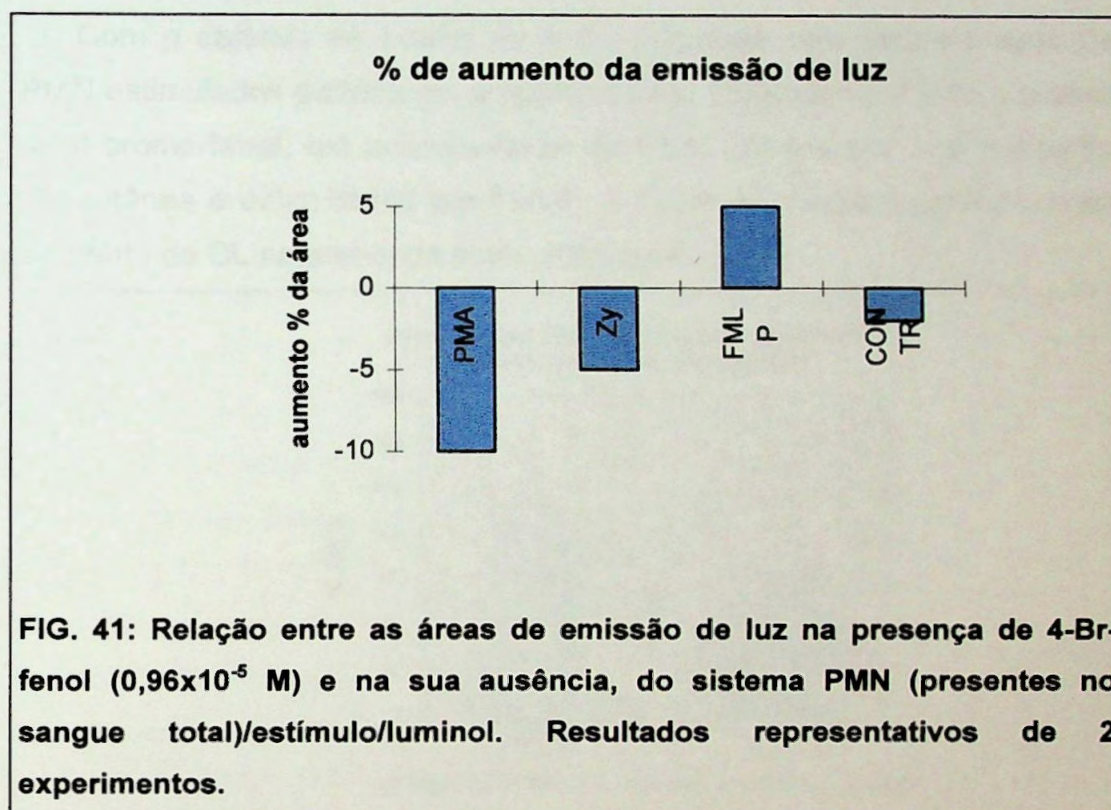


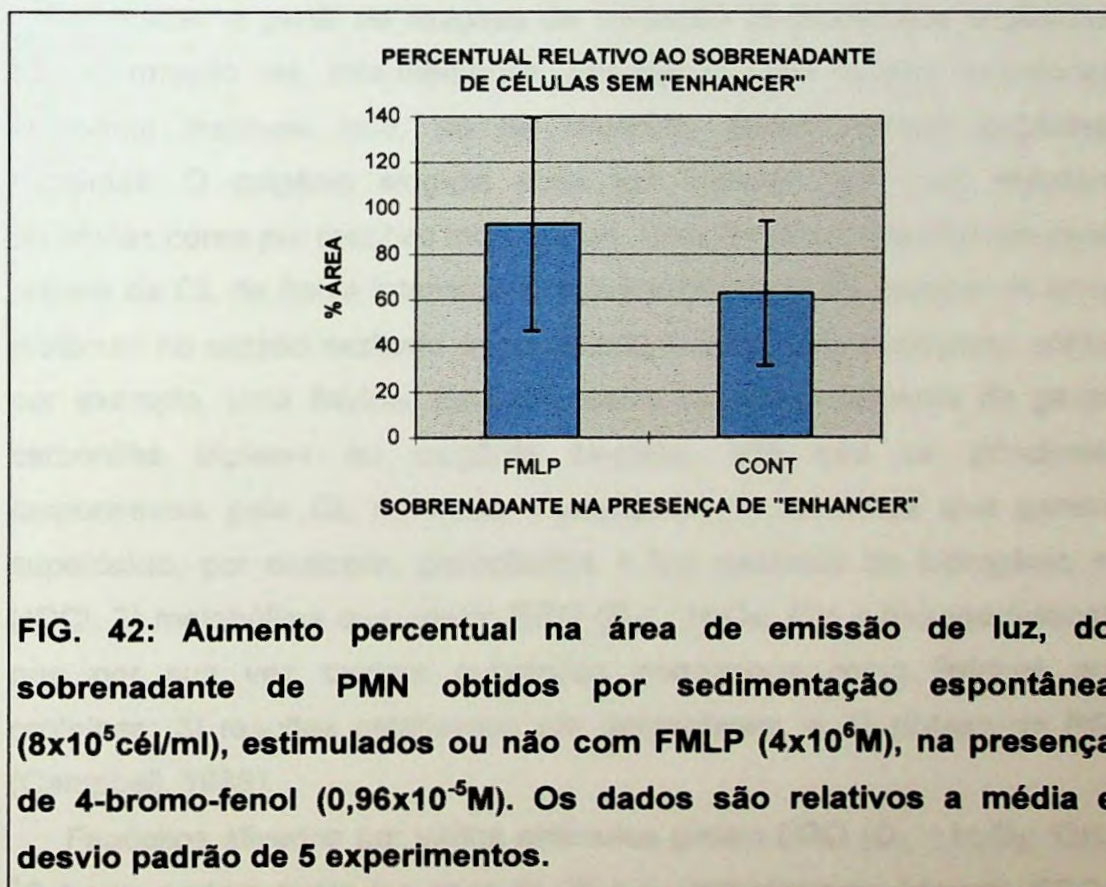
FIG. 42: Aumento da área de emissão de luz na presença de PMN (presentes no sangue total) e estímulo/luminol. Os resultados são apresentados na figura 42.

Nota-se que apesar de não haver estímulo, a presença de estímulo...

#### 4.9) Ensaio de "enhancement" do sobrenadante de células obtidas por sedimentação espontânea e estimuladas com FMLP:

Foi verificado que o sobrenadante de células tratadas com FMLP não apresentava resposta no estudo de CL, com o intuito de verificar uma possível amplificação da resposta foi feito estudo de *enhancement* com este sobrenadante.

Com o objetivo de avaliar se a CL originada pela degranulação de PMN estimulados poderia ser amplificada por *enhancers* foi feita a adição de 4-bromo-fenol, em sobrenadante de PMN obtidos por sedimentação espontânea e estimulados por FMLP. A figura 42 ilustra o percentual de aumento de CL na presença deste *enhancer*.



Nota-se que apesar de existir amplificação esta parece independe da presença do estímulo.

## 5) DISCUSSÃO:

Apesar de não existirem mamíferos bioluminescentes, há algumas células e tecidos capazes de gerar CL de ultra baixa intensidade, invisível a olho nu, mas detectável por equipamentos sensíveis. Esta CL reflete diversas reações oxidativas que ocorrem no interior das células. Foi observada CL em órgãos como fígado, cérebro, pulmão e coração, tanto *in situ* como em órgãos reperfundidos. Esta CL também foi verificada em plaquetas (originária de síntese de PG) e fagócitos (ativação de células). A CL pode ter origem em processos orgânicos ou inorgânicos.

Os dois principais produtos responsáveis pelas emissões celulares são carbonilas tripletes e oxigênio singlete. As carbonilas tripletes podem ser formadas a partir de reações de oxidação de substratos orgânicos com formação de intermediários dioxetânicos ou outras estruturas altamente instáveis que, ao se clivarem, podem formar espécies excitadas. O oxigênio singlete pode ser formado tanto por reações orgânicas como por reações inorgânicas. Uma terceira possibilidade para origem da CL de baixa intensidade é a transferência de energia de uma molécula no estado excitado a um agente fluorescente endógeno, como por exemplo, uma flavina. Existem quatro caminhos capazes de gerar carbonilas tripletes ou oxigênio singlete, que são os principais responsáveis pela CL de baixa intensidade: 1) caminhos que gerem superóxido, por exemplo, cloroplastos + luz; peróxido de hidrogênio + HOCl; 2) metabólitos que gerem ERO ( $O_2^{\cdot-}$ ;  $H_2O_2$ ;  $\cdot OH$  e hidroperóxidos) que por sua vez oxidam substratos endógenos como lipídeos ou proteínas; 3) reações catalisadas por peroxidases, e 4) síntese de PG (Campbell, 1988).

Fagócitos ativados por vários estímulos geram ERO ( $O_2^{\cdot-}$ ;  $H_2O_2$ ;  $\cdot OH$ ;  $^1O_2$ ) que, podem direta (no caso do  $^1O_2$ ) ou indiretamente (demais ERO) gerar CL. O sinal luminoso pode ser amplificado por substratos de reações quimiluminescentes como luminol ou lucigenina (Ginsburg e cols., 1993; Westman, 1986). A ativação dos fagócitos pode ocorrer *in*

*vivo* ou *in vitro*. Os PMN conhecidos como fagócitos profissionais exercem importantes funções na defesa do organismo contra agentes invasores. Estas células são a primeira linha de defesa do organismo produzindo substâncias microbidas e, podem também, mediar a resposta inflamatória lançando citocinas e levando a amplificação da resposta (Gabrilovich e cols., 1994).

Os PMN exercem importante papel na homeostasia e em diversos processos patológicos. Os graus de ativação dos PMN nestes processos têm sido de grande interesse. Por exemplo, no caso da artrite reumatóide, a presença de PMN ativados parece estar relacionada com o quadro clínico da doença (Arnhold e cols., 1994). Gabrielovich, 1993 descreveu a influência dos PMN ativados por antígenos do HIV na progressão da doença. Nos indivíduos com doença granulomatosa crônica, em que os PMN são inoperantes em relação à ativação de *burst*, infecções severas são recorrentes e podem levar até a morte destes indivíduos (Boxer, 1995). Estes exemplos mostram a importância destas células e de seus estados de ativação frente às diversas patologias. Como consequência, a obtenção e a influência que os processos de separação celular podem exercer sobre as mesmas é fundamental. Inferências dos resultados obtidos, levadas por uma ativação prévia das células dependente do método de separação empregado e não necessariamente da patologia em estudo, podem levar a erros de interpretação.

Para avaliar se diferentes processos de obtenção de células poderiam interferir no estado de ativação celular separamos as células por sedimentação espontânea, por sedimentação em gradiente de densidade ou utilizamos o sangue total e acompanhamos a CL na presença de luminol ou de lucigenina, a produção de ânion superóxido pelo método da redução do citocromo c, a degranulação do sobrenadante destas células estimuladas em presença de luminol e a possibilidade de amplificação por *enhancers* clássicos da HRP (Thorpe e Kricka, 1986).

A população celular obtida pelos diferentes processos de separação foi avaliada através de extensões coradas (Rosenfeld, 1947). O processo

de separação por sedimentação em gradiente de densidade mostrou maior homogeneidade contendo em média 95% de neutrófilos, 2% de linfócitos, 1,5% de monócitos e 1,5% de eosinófilos. O processo de separação por sedimentação espontânea apresentou população mista de células em média com 58,5% de neutrófilos, 32,5% de linfócitos, 7,5% de monócitos e 1,5% de eosinófilos. Dentre estas células, além dos neutrófilos, os monócitos e eosinófilos respondem a estímulos e iniciam *burst* oxidativo e processo de CL. A CL originária dos monócitos e eosinófilos é respectivamente 10% e 400% daquela originária de neutrófilos.

A viabilidade celular imediatamente após a obtenção das células é equivalente para ambos os processos (94%) e, ao final de 2 horas de incubação decresce cerca de 13%.

A CL de PMN na presença de luminol é de uma a duas ordens de grandeza maior do que aquela obtida na presença de lucigenina. Os PMN obtidos por sedimentação em gradiente de densidade apresentaram-se mais ativados em relação aos PMN obtidos por sedimentação espontânea ou os presentes no sangue total mesmo quando avaliados sem a adição de qualquer estímulo. O grau de ativação na presença de luminol como amplificador de CL foi significativamente maior para PMN obtidos por sedimentação em gradiente de densidade em relação aos presentes no sangue total. Para os ensaios onde a lucigenina foi utilizada como amplificador de CL a maior ativação dos PMN obtidos por sedimentação em gradiente de densidade em relação aos outros processos se reproduz, porém sem significância estatística. Estes resultados sugerem que os PMN obtidos por sedimentação em gradiente de densidade além de se mostrarem mais ativados, em relação aos demais processos de obtenção de células, mostram que esta ativação depende principalmente do caminho que requer MPO, pois sabemos que o luminol é um bom detector do sistema MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HOCl (Brestel, 1985) enquanto a lucigenina reage com O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Faulkner e Fridovich, 1993).

Ainda em relação à CL foi avaliada a resposta das células quando estimuladas por zymosan, PMA ou FMLP em relação ao controle. Os resultados mostraram estimulação celular com aumento da resposta de CL, em relação ao controle, das células obtidas em todos os processos de separação. As células obtidas por sedimentação espontânea ou presentes no sangue total apresentaram-se significativamente mais ativadas quando estimuladas por Zy ou por PMA, tanto na presença de luminol como de lucigenina. Quando as células foram obtidas por sedimentação em gradiente de densidade apenas as estimuladas por Zy apresentaram-se significativamente mais ativadas em relação ao controle, para qualquer dos amplificadores utilizados. A utilização de PMA como estímulo neste processo de obtenção de células não se apresentou significativamente maior em relação ao controle pois em um dos experimentos o controle apresentou uma emissão muito elevada, superior inclusive àquela obtida com o uso do estímulo. Este fato levou o teste estatístico a não considerar o PMA com resultados maiores do que o controle. O resultado deste experimento isolado pode ter ocorrido por diversos fatores:

- erro aleatório, associado a um erro técnico: variação no número de células do frasco controle, variação na concentração do estímulo, ou a sua degradação, assim como, variação na concentração do luminol, etc.
- erro devido ao próprio equipamento. O contador de cintilação é usado no modo fora de coincidência, ou seja, uma das fotomultiplicadoras está desligada, o que leva uma tendência a um erro maior. Este fato era visualizado quando não conseguíamos reproduzir alguns resultados de alguns ensaios. Outro possível fator de interferência nos resultados obtidos seria a sedimentação das células no fundo dos frascos, pois eles se encontravam em repouso, diminuindo, assim, as interações com o meio de reação.

É importante observar que a amplitude das emissões de CL, quando foi usado luminol, eram cerca de 2 e 10 vezes maiores para células obtidas por sedimentação em gradiente de densidade em relação às

células obtidas por sedimentação espontânea ou presentes no sangue total, respectivamente. Outra observação importante é a de que a amplitude das emissões e os perfis de resposta das células aos diferentes estímulos, quando foi utilizada a lucigenina, não parece diferir entre os diferentes processos de obtenção.

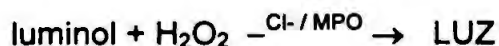
Para avaliar a produção de  $O_2^{\cdot-}$  pelas células obtidas pelos diferentes processos de separação foi utilizado o método de redução do citocromo c (Flohé, 1984; Jones, 1994). Foi verificado que as células obtidas por sedimentação em gradiente de densidade, quando estimuladas por PMA ou por FMLP, apresentaram produção significativamente mais pronunciada de  $O_2^{\cdot-}$ , quando comparadas às células controle e, que as células obtidas por sedimentação espontânea, apenas quando estimuladas por PMA, apresentaram produção de ânion superóxido significativamente maior do que as células controle. Os PMN presentes no sangue total não puderam ser avaliados por este método devido a forte interferência da hemoglobina sobre o meio de reação. Com o objetivo de comprovar que as reduções do citocromo c observadas eram originárias exclusivamente da produção do ânion superóxido foram feitos experimentos controle na presença de SOD onde não foi verificada qualquer redução do citocromo c. Os valores negativos obtidos quando as células foram estimuladas por Zy são possivelmente devido a um aumento da turbidez do meio de reação, já que o Zy é uma suspensão. Para contornar este problema foram realizados experimentos de incubação prévia das células com Zy com posterior centrifugação, porém não foi observada redução do citocromo c, apenas uma tendência a zerar os valores negativos.

Para avaliar se havia diferenças significantes entre os processos de obtenção de células (sedimentação em gradiente de densidade e sedimentação espontânea) foi aplicado teste estatístico, que não conseguiu detectar diferenças significantes devido ao tamanho da amostra ( $n=4$ ), apesar das diferenças aparentes. Entretanto, quando esta comparação foi feita independente do estímulo, o teste estatístico mostrou

que os valores obtidos para sedimentação em gradiente de densidade foram significativamente maiores do que os obtidos para sedimentação espontânea (Tab. 8)

Os resultados obtidos para a redução do citocromo c parecem estar de acordo com os resultados de ativação obtidos pelo método de CL, uma vez que é necessária a presença de  $O_2^-$ , que ao se dismutar leva a formação de  $H_2O_2$  e que em presença de MPO/HOCI provenientes do processo de degranulação (Smolen e Boxer, 1995) pode reagir principalmente com o luminol (Dahlgren e Stendhal, 1983). Observar que para as células obtidas por sedimentação espontânea foi detectada a produção de  $O_2^-$  somente quando se utilizou o PMA como estímulo e que para as células obtidas por sedimentação em gradiente de densidade a produção de  $O_2^-$  foi observada quando as células foram estimuladas por PMA e por FMLP. A maior produção de ânion superóxido pelas células obtidas pelo processo de sedimentação em gradiente de densidade parece relacionar-se diretamente com a maior CL em presença de luminol obtida para estas células em relação às demais (sedimentação espontânea e presentes no sangue total).

Os diferentes métodos de separação celular poderiam, a princípio, estar interferindo direta ou indiretamente com o processo de degranulação. A degranulação de grânulos azurófilos pode ser avaliada por ensaios de CL em presença de luminol (Briheim e cols., 1984), e sua avaliação foi um dos objetivos deste trabalho.



A liberação de MPO para o meio extracelular pode ser avaliada em estudos onde se utiliza o sobrenadante (Rosen e Klebanoff, 1976) das incubações de células com estímulos.

Uma tentativa de compararmos os resultados de determinação de MPO por CL com espectrofotometria, mostrou que o primeiro método é muito mais sensível. Por espectrofotometria só se consegue medir

atividades de MPO superiores a 5 UI/ml, concentração esta maior do que a presente em nosso meio.

O método de CL é linear a baixas atividades peroxidásicas visto tanto pelo ensaio com HRP quanto com MPO. A HRP foi utilizada para a padronização das condições de reação, ou seja, concentração de peróxido de hidrogênio e luminol.

Apesar da grande variação, a média dos experimentos mostra uma tendência do sobrenadante de células obtidas por sedimentação em gradiente de densidade apresentar emissões maiores, ou seja, maior liberação de MPO para o meio extracelular. Nos três experimentos de sobrenadante, quando analisados separadamente, as células estimuladas com zymosan, apresentaram as maiores emissões. Como a citocalasina B inibe a fagocitose favorecendo a degranulação extracelular (Dalghren e Stendhal, 1983) sua adição ao meio permite estimar os fenômenos intracelulares de degranulação.

O zymosan induz o processo de degranulação de grânulos primários ricos em MPO (Tauber, 1987). Ao se adicionar a citocalasina B que inibe o processo de fagocitose e favorece o processo de degranulação extracelular, as emissões quimiluminescentes do sobrenadante de células tendem a se elevar, como nos resultados apresentados para as células obtidas por sedimentação em gradiente de densidade. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos no estudo do metabolismo oxidativo pelo método de CL utilizando-se luminol e Zy como estímulo. Como o luminol pode detectar tanto eventos intra como extracelulares, pois penetra no interior das células (Westman, 1986), as emissões quimiluminescentes podem também ser originárias do processo de degranulação intracelular.

É conhecido que o FMLP, também, leva a degranulação de grânulos primários, ricos em MPO, e que este evento ocorre tanto intra como extracelularmente (Dalghren, 1988), o que é confirmado com o uso de citocalasina B nos estudos de degranulação com sobrenadante de células. Os resultados mostraram aumento significativo das emissões

quando comparadas àquelas obtidas na ausência de citocalasina B, para as células obtidas por sedimentação em gradiente de densidade. É possível que, com o aumento do número de células, obteríamos resultados de CL de células totais consistentes com os resultados obtidos para o processo de degranulação, como mostrado por Dalghren em 1987. Este pesquisador conseguiu observar CL amplificada por luminol em células estimuladas por FMLP e PMA, e relacionou os perfis de emissão de CL com o número de células presentes no meio. Os experimentos foram realizados em um luminômetro, onde a temperatura era mantida a 37°C. Os resultados obtidos com  $10^5$  células e estimuladas por FMLP ( $10^{-7}$  M) não apresentaram cinéticas de emissão bimodal, já para experimentos realizados com  $5 \times 10^5$  ou  $10^6$  células as cinéticas de emissão apresentaram-se com curvas bimodais (Dalghren, 1987).

Para as células estimuladas com PMA o uso de citocalasina B não interfere nas emissões do sobrenadante, uma vez que o PMA estimula principalmente a degranulação de grânulos secundários que não possuem MPO (Tauber, 1987). Os resultados mostraram que não há diferenças de emissões com ou sem uso de citocalasina B com este estímulo em relação ao controle, para qualquer dos processos de obtenção de células avaliados. As emissões obtidas para o método de CL utilizando luminol e PMA não devem ser exclusivas do processo de degranulação devendo estar associada a formação de outras EROS. A formação de  $\text{OONO}^-$ , formado a partir de  $\cdot\text{NO}$  e  $\text{O}_2^-$ , produzidos por PMN estimulados por PMA (Radi, 1993), contribui na CL dependente de luminol de PMN humanos (Carreras e cols., 1994; Wang e cols., 1991). Assim sendo, esta via ou ainda, uma possível oxidação intracelular do luminol (Briheim e cols., 1984) poderiam ser responsáveis pela CL aqui observada.

Como análise geral, foi verificado então, que na presença de citocalasina B, apenas as células obtidas por sedimentação em gradiente de densidade e estimuladas com FMLP apresentaram alterações com significativo aumento das emissões em relação às células controle e

---

quando as células foram estimuladas com Zy houve aumento das emissões porém não significantes. Já para as células obtidas por sedimentação espontânea a presença de citocalasina B não parece alterar as emissões para nenhum dos estímulos utilizados. Foi aplicado teste estatístico, que não conseguiu detectar diferenças significantes entre os dois processos de obtenção de células devido ao tamanho da amostra (n=4), apesar das marcadas diferenças. A mesma comparação, ou seja, a utilização do mesmo teste estatístico porém não se levando em consideração o estímulo, mostrou que o processo de sedimentação em gradiente de densidade é significativamente maior do que o processo de sedimentação espontânea (TAB. 13). Sendo assim, uma importante observação a ser feita, pelo conjunto de resultados obtidos na presença e ausência de citocalasina B, é que o processo de degranulação extra e intracelular está aumentado nas células obtidas por sedimentação em gradiente de densidade.

Finalmente, uma das propostas deste trabalho foi o de avaliar a possibilidade de amplificação do sinal de CL, obtido pela ativação de PMN, com a adição de *enhancers*. Caso este *enhancement* fosse obtido se viabilizariam estudos utilizando sangue total. O interesse em avaliar os graus de ativação de células presentes no sangue total é importante, pois além de facilitar a operacionalidade do método, evita-se também o manuseio e o contato excessivo das células com reagentes que possam interferir nos seus processos metabólicos, mantendo-as, assim, em condições semelhantes às fisiológicas. Ainda importante é a utilização de um menor número de células isoladas por qualquer um dos métodos. Estas têm sido metas presentes em diversas pesquisas.

Com o intuito de amplificar as emissões de CL, foram utilizados *enhancers* clássicos da enzima HRP, que é semelhante à MPO de neutrófilos humanos.

Os *enhancers* podem ser divididos em três classes: 1) fenóis substituídos; 2) naftóis substituídos; 3) 6-hidroxibenzotiazóis (Thorpe e

Kricka, 1986). Foram utilizados três *enhancers*, o 4-bromo-fenol, o 1-bromo-2-naftol e a luciferina, sendo um de cada classe respectivamente.

Os *enhancers* utilizados em concentrações até 100 vezes superiores às utilizadas nos experimentos não levaram a perda de viabilidade celular.

Todos os *enhancers* em presença de HRP, peróxido de hidrogênio e luminol, nas condições dos experimentos com células, mostraram-se amplificadores de reação (FIG. 33, 34 e 35), entretanto a magnitude da amplificação é muito menor do que a observada por Kricka e cols. nas condições ideais, pH 8,5 (Thorpe e Kricka, 1986). Esta pequena amplificação é perdida quando a HRP é substituída por MPO. Mesmo assim, o 4-bromo-fenol foi ensaiado na presença de células. Este *enhancer* quando em presença de células obtidas por qualquer um dos dois processos de separação (sedimentação espontânea ou sedimentação em gradiente de densidade) apresentou um aumento suave das emissões e proporcionalmente semelhante para ambos os processos. Para o sangue total as emissões são as mesmas daquelas obtidas na ausência do *enhancer*. O *enhancement* do sobrenadante de células obtidas por sedimentação espontânea e estimuladas por FMLP ou não estimuladas (controle) em presença de 4-bromo-fenol também apresentou um suave aumento das emissões em relação às células sem adição do *enhancer*, porém este aumento não parece depender da presença do estímulo. A razão do insucesso de *enhancement* com MPO deverá ser elucidado em experimentos futuros.

## **6) CONCLUSÕES:**

1) Não foram observadas diferenças na viabilidade dos PMN obtidos por sedimentação espontânea ou por sedimentação em gradiente de densidade. Apesar de não ser significativa, a CL amplificada por luminol e por lucigenina de PMN obtidos por sedimentação em gradiente de densidade mostrou uma clara tendência à ativação, mesmo na ausência de qualquer estímulo. Por outro lado, quando comparados a PMN presentes no sangue total, as diferenças foram significativas. A avaliação através da redução do citocromo c mostrou que as células obtidas pelos dois diferentes processos de separação (sedimentação espontânea ou sedimentação em gradiente de densidade) foram significativamente diferentes com maior produção de ânion superóxido pelas células obtidas por sedimentação em gradiente de densidade. As células presentes no sangue total não puderam ser avaliadas por este método devido a forte interferência da hemoglobina no meio de reação.

2) A avaliação da liberação de MPO para o meio extracelular mostrou que o processo de sedimentação em gradiente de densidade leva a uma significativamente maior liberação da enzima em relação ao processo de sedimentação espontânea. Este resultado é confirmado na presença de citocalasina B, um inibidor clássico da fagocitose. As células obtidas pelo processo de sedimentação em gradiente de densidade e estimuladas por FMLP ou Zy em presença de citocalasina B mostraram maior CL do que as obtidas por sedimentação espontânea.

3) Os *enhancers* clássicos do sistema HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Luminol parecem não ser eficientes para o sistema MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Luminol. O insucesso da amplificação do sistema MPO deverá ser elucidado em estudos futuros.

## **7) RESUMO:**

Neutrófilos polimorfonucleares (PMN) têm um importante papel na defesa do hospedeiro contra infecções. Estas células produzem grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (especialmente,  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ ) com atividade microbicida. Muitos estudos *in vitro* têm sido usados para estimar a produção de espécies reativas *in vivo*. Nestes estudos PMN isolados de sangue periférico por gradientes de densidade (gradiente de Ficoll-Hypaque e sedimentação em dextran) são comumente usados. Este método resulta na obtenção de alta homogeneidade celular, entretanto, leva a prévia ativação celular devido a perturbações na membrana. Neste trabalho foi comparada a produção de espécies reativas de oxigênio por PMN obtidos por gradiente de densidade ( $1 \times 10^5$  cels/ml) com PMN obtidos por sedimentação espontânea ( $2 \times 10^5$  cels/ml) ou presentes no sangue sem qualquer manipulação. Embora o processo de sedimentação espontânea não leve a uma população celular homogênea, é suposto que preserve as células de estimulação durante o isolamento.

A produção de  $O_2^-$  e a ativação do sistema  $H_2O_2$ /MPO foi monitorada respectivamente por quimiluminescência dependente de lucigenina ( $2,5 \times 10^{-5}$  M) e luminol ( $1 \times 10^{-5}$  M). A produção de  $O_2^-$  foi também monitorada pela redução do citocromo c. A produção de  $O_2^-$  e a ativação do sistema  $H_2O_2$ /MPO foram maiores para as células isoladas por gradiente de densidade com ou sem qualquer estimulação (2,5 mg/ml de zymosan opsonizado, 50 ng/ml de acetato de forbol miristato e  $4 \times 10^{-6}$  M de formil-metionil-leucil-fenilalanina). Adicionalmente a liberação de MPO foi significativamente maior para as células obtidas por gradiente de densidade quando comparadas às células obtidas por sedimentação espontânea.

Os amplificadores clássicos da reação HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/luminol parecem ser ineficientes para as reações do sistema MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/luminol. A razão para esta ausência de amplificação deverá ser elucidada em estudos posteriores.

Este trabalho mostra claramente que os processos de obtenção de PMN devem afetar respostas celulares importantes, contribuindo para alguns erros de interpretação de resultados obtidos *in vitro*.

### **8)ABSTRACT:**

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) have an important role in the host defense response to infection. These cells produce large amounts of reactive oxygen species ( $O_2^-$  and  $H_2O_2$ ) with microbicidal activity. Several *in vitro* studies have been used in order to estimate the yield of reactive species *in vivo*. In these studies PMN isolated from peripheral blood by density gradients (Ficoll-Hypaque gradient and dextran sedimentation) are commonly used. This method yield a high homogeneity in cellular population whereas leads to prior cellular activation due to membrane perturbation. In this work it was compared the reactive oxygen production of PMN isolated by density gradient ( $1 \times 10^5$  cells/mL) with PMN obtained by spontaneous sedimentation ( $2.5 \times 10^5$  cells/mL) or present in blood without any manipulation. Although spontaneous sedimentation does not lead to a homogeneous cellular population it is suppose to preserve the cells from spurious stimulus during isolation.

The production of  $O_2^-$  and the evaluation of the  $H_2O_2$ /myeloperoxidase (MPO) system was followed by lucigenin ( $2.5 \times 10^{-5}M$ ) and luminol ( $1 \times 10^{-5}M$ ) enhanced chemiluminescence, respectively.  $O_2^-$  production was also followed by cytochrome c reduction. Both,  $O_2^-$  and MPO/ $H_2O_2$  system, were higher for cells isolated by density with or without any added stimuli (2.5 mg/mL opsonized zymosan, 50 ng/mL phorbol myristate acetate and  $4 \times 10^{-6}M$  N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine). Furthermore, the release of MPO was significantly higher for cells obtained by density gradient when compared to cells obtained by spontaneous sedimentation.

The classical enhancers of the HRP/ $H_2O_2$ /luminol reaction seems to be ineffective for the MPO/ $H_2O_2$ /luminol reaction. The failure of this enhancement haven't known and may be elucidate in future studies.

This work clearly show that the PMN isolation procedure might affect important cellular responses contributing to some misinterpret *in vitro* results.

### 9) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ALLEN, R.C. Phagocytic leucocyte oxygenation activities and chemiluminescence: a kinetic approach to analysis. chemiluminescence. Methods Enzymol., New York, v. 133, p. 449-93, 1986.
- ALLEN, R.C. Halide dependence of the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system of the polymorphonuclear leucocyte in the phenomenon of eletronic excitation. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, v. 63, n. 3, p. 675- 83, 1975.
- ALLRED, C.D.; MARGETTS, J.; HILL, H.R. Luminol-induced neutrophil chemiluminescence. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v. 631, p. 380-5, 1980.
- ANDREWS, P.C.; KRINSKY, N.I. Human myeloperoxidase and hemi-myeloperoxidase. Methods Enzymol., New York, v. 132, p.368-78, 1986.
- ARNESON, R.M. Substrate-induced chemiluminescence of xantine oxidase and aldehyde oxidase. Arch. Biochem. Biophys., New York, v. 136, p. 352-60, 1970.
- ARNHOLD, J., SONNTAG, K., SAUER, H., HÄNTZSCHEL, H., ARNOLD, K. Increasead native chemiluminescence in granulocytes isolated from synovial fluid and peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. J.Biolumin. Chemilumin., v. 9, p. 79-86, 1994.
- ATHENS, J.W. Granulocytes-netrophils. In: LEE, G.R., BITHELL, T.C., FOERSTER, J., ATHENS, J.W., LUKENS, J.N., eds. Wintrobe's Clinical hematology. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.
- BABIOR, B.M. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. N. Engl. J.Med., Boston, v. 298, p. 659-63, 1978.
- BAGGIOLINI, M., THELEN, M. The phagocytes and the respiratory burst. In: SIES, H., ed., Oxidative stress. London: Academic Press, 1991. p. 400-19.
-

- BAINTON, D.F. Morphology of neutrophils, eosinophils and basophils. In: WILLIAMS, W., BEUTLER, E., MARSHALL, A.L., BARRYS, S.C., THOMAS, J.K. Hematology 5.ed., New York: Mc Graw-Hill, 1995. p.753- 65.
- BAINTON, D.F., ULLYOT, J.L., FARQUHAR, M.G. The development of neutrophilic polymorphonuclear leucocytes in human bone marrow. J. Exp.Med., New York, v. 134, p. 907-34, 1971.
- BAKKENIST, A.R.J., DE BOER, J.E.G., PLAT, H., WEVER, R. The halide complexes of myeloperoxidase and the mechanism of the halogenation reaction. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v. 613, p. 337-48, 1980.
- BAZZONI, F., CASSATELLA, M.A., ROSSI, F., CESKA, M., DEWALD, B., BAGGIOLINI, M. Phagocytosing neutrophils produce and release high amount of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. J. Exp. Med., New York, v. 173, p. 221-4, 1991.
- BOCHEV, B.G., MAGRISSO, M.J., BOCHEV, P.G., MARKOVA, V.I., ALEXANDROVA, M.L. Dependence of whole blood luminol chemiluminescence on PMNL and RBC count. J. Biochem.Biophys. Methods, Amsterdam, v. 27, p. 301-9, 1993.
- BÖYUM, A. Isolation of leukocytes from human blood. Further observations. Paper II. Scand J.Clin. Lab. Invest. Suppl., Oslo, v. 97P, p. 31-50, 1968a.
- BÖYUM, A. A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. Paper III. Scand. J.Clin. Lab. Invest. Suppl., Oslo, v. 97P, p. 51-76, 1968b.
- BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Paper IV. Scand J.Clin. Lab. Invest. Suppl., Oslo, v. 97P, p. 77-89, 1968c.
- BOXER, L.A. Neutrophil disorders: qualitative abnormalities of the neutrophil In: WILLIAMS, W., BEUTLER, E., MARSHALL, A.L., BARRYS, S.C., THOMAS, J.K. Hematology 5.ed., New York: Mc Graw-Hill, 1995.p. 835-9.
- BRESTEL, E.P. Co-oxidation of luminol by hipochlorite and hydrogen peroxide implications for neutrophil chemiluminescence. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, v. 126, p. 482-88, 1985.
- BRIHEIM, G., STENDHAL, O., DALGHREN, C. Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. Infect. Immun., Washington, v. 45, p. 1-5, 1984.

- CAMPA, A. Biological roles of plant peroxidases: known and potential function. In: EVERSE, J., EVERSE, K.E., GRISHAN, M.B., eds., Peroxidases in chemistry and biology. Boca Raton: CRC Press, 1991. v.2, p. 26-42.
- CAMPBELL, A.K. Chemiluminescence: principles and applications in biology and medicine. DEERFIELD BEACH, FL.: VCH, ed., Chichester: Horwood, 1988.
- CANDEIAS, L.P., PATEL, K.B., STRATFORD, M.R.L., WARDMAN, P. Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil-derived species superoxide anion and hypochlorous acid. FEBS Lett., Amsterdam, v. 333, p. 151-3, 1993.
- CARRERAS, M.C., PARGAMENT, G.A., CATZ, S.D., PODEROSO, J.J., BOVERIS, A. Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. FEBS Lett., Amsterdam, v. 341, p.65-8, 1994.
- CASTAGNA, M., TAKAI, Y., KAIBUCHI, K., SANO, K., KIKKAWA, U., NISHIZUKA, Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 257, p. 7847-51, 1982.
- CHANOCK, S.J., BENNA, J., SMITH, R.M., BABIOR, B.M. The respiratory burst oxidase. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 269, p. 24519-22, 1994.
- CLARK, R.A., LEIDAL, K.G., PEARSON, D.W., NAUSEEF, W.M. NADPH oxidase of human neutrophils. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 262, p. 4065-74, 1987.
- CLARK, R.A., VOLPP, B.D., LEIDAL, K.G., NAUSEEF, W.M. Two cytosolic components of the human neutrophil respiratory burst oxidase translocate to the plasma membrane during cell activation. J. Clin. Invest., New York, v. 85, p. 714-21, 1990.
- CLAY, R. A study of fixation and dye. In: BAKER, J. R., ed., Principles of biological microtechnique. London: Methuen, 1958.
- COCKCROFT, E. The role of inositol phospholipid metabolism and diacylglycerol production in neutrophil signal transduction. In: HALLET, M.B., ed., The neutrophil: cellular biochemistry and physiology. 2. ed., Boston: CRC Press, 1989. p.168-87.
- COOKE, E., AL-MOHANNA, F.A., HALLET, M.B.  $Ca^{2+}$ -dependent and independent mechanisms in neutrophil activation; roles of kinase C, diacylglycerol, and unidentified intracellular messengers. In: HALLET,

- M.B., ed., The neutrophil: cellular biochemistry and physiology. 2. ed., Boston: CRC Press, 1989. p.220-234
- CROSS, A.R., JONES, O.T.G. The molecular mechanism of oxygen reduction by neutrophil oxidase. In: HALLET, M.B., ed., The neutrophil: cellular biochemistry and physiology. 2. ed., Boston: CRC Press, 1989. p.98-104.
- CURNUTE, J.T. Activation of human neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced (triphosphopyridine nucleotide, reduced) oxidase by acid in a cell-free system. J.Clin Invest., New York, v. 75, p.1740-3, 1985.
- CZARNETZKI, M.B., DALE, H.C., BELCHER, R.W. The effects of polyanions on NBT reduction hexose monophosphate shunt activity, and ultrastructure of polymorphonuclear leucocytes. Am. J. Clin. Pathol., Philadelphia, v. 64, p. 34-9, 1975.
- DAHLGREN, C., STENDHAL, O. Role of myeloperoxidase in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leucocytes. Infect. Immun., Washington, v. 39, p. 736-41, 1983.
- DAHLGREN, C. Polymorphonuclear leukocyte chemiluminescence induced by formylmethionyl-leucyl-phenylalanine and phorbol myristate acetate: effects of catalase and superoxide dismutase. Agents Actions, Basel, v.21, p.104-12, 1987.
- DAHLGREN, C. Effects on intra- and extracellular localized, chemoattractant-induced, oxygen radical production in neutrophils following modulation of conditions for ligand-receptor interaction. Inflammation, New York, v. 12, p. 335-49, 1988.
- DECHATELET, L.R., SHIRLEY, P.S. Evaluation of chronic granulomatous disease by a chemiluminescence assay of microliter quantities of whole blood. Clin.Chem., Winston-Salem, v. 27, p. 1739-41, 1981.
- DEXTER, T.M., PONTING, I.L.O., ROBERTS, R.A., SPOONER, E., HEYWORTH, C., GALLAGHER, J.T. Growth and differentiation of hematopoietic stem cells. In: GUNN, R.B., PARKER, J.C., eds., cell physiology of blood. New York: Rockefeller University Press, 1988.
- DEWALD, B., BAGGIOLINI, M. Methods for assessing exocytosis by neutrophil leukocytes. Methods Enzymol., New York, v. 132, p. 267-77, 1986.
- DI VIRGILIO, F., TREVES, S., LEW, D., POZZAN, T. Role of calcium in neutrophil activation. In: HALLET, M.B., ed., The Neutrophil: cellular biochemistry and physiology. 2. ed., Boca Raton: CRC Press, 1989.

p. 200-213.

- DJEU, J.Y., SERBOUSEK, D., BLANCHARD, D.K.. Release of tumor necrosis factor by human polymorphonuclear leukocytes. Blood, New York, v. 76, p. 1405-9, 1990.
- DUNFORD, H.B. Horseradish peroxidase: structure and kinetic properties. In: EVERSE, J., EVERSE, K.E., GRISHAN, M.B., eds., Peroxidases in chemistry and biology. Boca Raton: CRC Press, 1991. v.2, p.2-16.
- EL-HAG, A., CLARK, R.A. Immunossupression by activated human neutrophils - dependence of myeloperoxidase system. J. Immunol., Baltimore, v. 139, p. 2406-13, 1987.
- FALLON, H.J., FREI, E., DAVIDSON, J.D., TRIER, J.S., BURK, D. Leukocyte preparations from human blood: evaluation of their morphologic and metabolic state. J. Lab. Clin. Med., St. Louis, v. 59, p. 779-91, 1962.
- FARRAM, E., NELSON, D.S. Mechanism of action of mouse macrophages as antitumor effector cells: role of arginase. Cell. Immunol., New York, v. 55, p.283-93, 1980.
- FAULKNER, K., FRIDOVICH, I. Luminol and lucigenin as detectors for superoxide. Free Radical Biol. Med., New York, v. 15, p.447-51, 1993.
- FLOHÉ, L., ÖTTING, F. Superoxide dismutase assays. Methods Enzymol., New York, v.105, p. 93-104, 1984.
- FLUKS, A.J. Three-step isolation of human blood monocytes using discontinuous density gradients of percoll. J. Immunol. Methods, Amsterdam, v. 41, p. 225-33, 1981.
- FRANKLIN, D.Z., HIRSH, J.G. Electron microscope studies on the degranulation of rabbit peritoneal leukocytes during phagocytosis. J. Exp. Med., New York, v. 120, p. 569-75, 1964.
- GABRILOVICH, D.I., SHEPELEVA, G.K., SEREBROVSKAYA, L.V., POKROVSKY, V. Polymorphonuclear neutrophils modify functional activity of lymphocyte and monocyte in HIV infection. Scand. J. Immunol., Oxford, v. 37, p. 459-67, 1993.
- GABRILOVICH, D.I., IVANOVA, L., SEREBROVSKAYA, L.V., SHEPELEVA, G.K., POKROVSKY, V. Clinical significance of neutrophil functional activity in HIV infection. Scand. J. Infect. Dis., Stockholm, v. 26, p. 41-7, 1994.

- GINSBURG, I., MISGAV, R., GIBBS, D.F., VARANI, J., KOHEN, R.  
Chemiluminescence in activated human neutrophils: role of buffers and scavengers. Inflammation, New York, v. 17, p. 227-43, 1993.
- GMELIG-MEYLING, F., WALDMANN, T. A. Separation of human blood monocytes and lymphocytes on a continuous percoll gradient. J. Immunol. Methods, Amsterdam, v. 33, p. 1-9, 1980.
- GREENLE, L., FRIDOVICH, I., HANDLER, P. Chemiluminescence induced by the operation of iron flavoproteins. Biochemistry, Washington, v. 1, p. 779-83, 1962.
- GRISHAM, M.B. Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine. AUSTIN, R.G., ed. Landes, 1992. p. 4-22.
- HALLET, MB. The significance of stimulus-response coupling in the neutrophil for physiology and pathology. In: HALLET, M.B., ed., The Neutrophil: cellular biochemistry and physiology. 2. ed., Boca Raton: CRC Press, 1989. p.1-18.
- HALLIWELL, B. Free radicals in biology and medicine. HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., eds. Oxford: Clarendon Press, 1989
- HAMERS, M.N., DIRK, R. Oxidative stress in human neutrophilic granulocytes: host defense and self defense. In: SIES, H., ed., Oxidative stress London: Academic Press, 1985. p.351-81.
- HARDY, S.J., ROBBINSON, B.S., POULOS, A., HARVEY, D.P., FERRANTE, A., MURRAY, A.W. The neutrophil respiratory burst. Eur. J. Biochem., Berlin, v. 198, p.801-6, 1991.
- HEYWORTH, P.G., BADWEY, J.A. Protein phosphorylation associated with the stimulation of neutrophils. Modulation of superoxide production by protein kinase C and calcium. J. Bioenerg Biomembr., New York, v. 22, n. 1, p. 1-26, 1990.
- HIRSCHHORN, R., WEISSMANN, G. Isolation and properties of human leukocytes lysosomes *in vitro*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., New York, v.119, p.36-9, 1965.
- HOFFBRAND, A.U., PETTIT, J.E. Essential hematology. 3. ed. Blackwell Scientific Publications, 1993.
- HOLLANDER, M., WOLFE, D.A. Nonparametric statistical methods. New York: John Wiley, ed., 1973. p.503
- HOLTZMAN, E. Lysosomes. New York: Plenum Press, 1989.

- HOOGLAND, H., VAN KUILENBURG, A., VAN RIEL, C., MUIJSTERS, A.O., WEVER, R. Spectral properties of myeloperoxidase compounds II and III. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v. 916, p. 76-82, 1987.
- HURST, J.K. Myeloperoxidase: active site structure and catalytic mechanisms. In: EVERSE, J.; EVERSE, K.E., GRISHAN, M.B., eds., Peroxidases in chemistry and biology Boca Raton: CRC Press, 1991. v.1, p.38-57.
- IYER, G.Y.N., ISLAM, M.F., QUASTEL, J.H. Biochemical aspects of phagocytosis. Nature, London, v. 192, p. 535-41, 1961.
- JESAITIS, A.J., QUINN, M.T., MUKHERJEE, G., WARD, P.T., DRATZ, E.A. Regulation of NADPH oxidase activity. In: JESAITIS, A.J., DRATZ, E.A., eds., Molecular basis of oxidative damage by leukocytes. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 3-4.
- JONES, O.T.G., HANCOCK, J.T. Assays of plasma membrane NADPH oxidase. Catalysts in oxygen radical reactions. Methods Enzymol., New York, v. 233, p. 222-9, 1994.
- KANOFSKY, J.R. Peroxidase catalyzed generation of singlet oxygen and of free radicals. In: EVERSE, J., EVERSE, K.E., GRISHAM, M.B., eds., Peroxidases in chemistry and biology. Boca Raton: CRC Press, 1991. v. 2, p. 219-31.
- KETTLE, A.J., WINTERBOURN, C.C. Superoxide modulates the activity of myeloperoxidase and optimize the production of hypochlorous acid. Biochem. J., London, v. 252, p. 529, 1988.
- KLEBANOFF, S.J. Myeloperoxidase: occurrence and biological function. In: EVERSE, J., EVERSE, K.E., GRISHAN, M.B. Peroxidases in chemistry and biology Boca Raton: CRC Press, 1991. v.1, p.2-20.
- LEGG, K.D., HERCULES, D.M. Electrochemically generated chemiluminescence of lucigenin. J. Am. Chem. Soc., Washington, v. 91, p. 1902-07, 1969.
- MERENYI, G., LIND, J.S. Role of peroxide intermediate in the chemiluminescence of luminol. A mechanistic study. J. Am. Chem. Soc., Washington, v. 102, p. 5830-5, 1980.
- NACCACHE, P.H., SHA'AFI, R.I., BERGEAT, P. Mobilization, metabolism, and biological effects of eicosanoids in polymorphonuclear leucocytes. In: HALLET, M.B., ed., The Neutrophil: cellular biochemistry and physiology. 2. ed., Boca Raton: CRC Press, 1989. p.114-130.
-

- NAKAJIMA, R., YAMAZAKI, I. The mechanism of oxypoxidase formation from ferryl peroxidase and hydrogen peroxide. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 262, p. 2576-81, 1987.
- NATHAN, D.G. Introduction to the regulation of hematopoiesis. In: GUNN, R.B., PARKER, J.C., eds., Cell physiology of blood. New York: Rockefeller University Press, 1988.
- NATHANSON, S.D., ZAMFIRESCU, P.L., DREW, E.I., WIBUR, S. J. Immunol. Methods, Amsterdam, v. 18, p. 225-34, 1977.
- NETER, J., WASSERMAN, W., NACHSHEIM, C.J., KUTNER, M.H. Applied linear statistical models 4.ed., Homewood: Richard D. Irwing, 1990. p. 1408.
- PERTOFT, H., JOHNSON, A., WÄRMEGARD, B., SELJELID, R. Separation of human monocytes on density gradients of percoll. J. Immunol. Methods, Amsterdam, v. 33, p. 221-9, 1980.
- RADI, R., COSGROVE, T.P., BECKMAN, J.S., FREEMAN, B.A. Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence. Biochem. J., London, v. 290, p. 51-7, 1993.
- ROSEN, G.M., POU, S., RAMOS, C.L., COHEN, M.S., BRITIGAN, B.E. Free radicals and phagocytic cells. FASEB J., Bethesda, v. 9, p. 200-9, 1995.
- ROSEN, H., KLEBANOFF, S.J. Chemiluminescence and superoxide production by myeloperoxidase deficient leukocytes. J. Clin. Invest., New York, v. 58, p. 50-60.
- ROSEN, H., KLEBANOFF, S.J. Formation of singlet oxygen by the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 252, p. 4803-10, 1977.
- ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancreáticos e estudo de diversos fatores. Mem. Inst. Butantan, São Paulo, v. 20, p. 315-28, 1947.
- SBARRA, A.J., KARNOVSKY, M. The biochemical basis of phagocytosis. J. Biol. Chem. v. 234, p. 1355-62, 1959.
- SHAU, H.; GOLUB, S.H. Inhibition of lymphokine-activated killer- and natural killer- mediated cytotoxicities by neutrophils. J. Immunol., Baltimore, v. 143, p. 1066-72, 1989.

- SHETERLINE, P., RICKARD, J.E. The cortical actin filament network of neutrophil leucocytes during phagocytosis and chemotaxis. In: HALLET, M.B., ed., The Neutrophil: cellular biochemistry and physiology. 2. ed., Boca Raton: CRC Press, 1989. p.142-157.
- SIEGEL, S. Estadística no paramétrica. México: Trillas, 1975. p. 346.
- SMOLEN, J.E., BOXER, L.A. Functions of neutrophil. In: WILLIAMS, W., BEUTLER, E., MARSHALL, A.L., BARRYS, S.C., THOMAS, J.K. Hematology 5.ed., New York: Mc Graw-Hill, 1995.
- SMOLEN, J.E. Characteristics and mechanisms of secretion by neutrophil. In: HALLET, M.B., ed., The Neutrophil: cellular biochemistry and physiology. 2. ed., Boca Raton: CRC Press, 1989. p.142-157.
- SOLBERG, C.O., HELLMUM, K.B. Neutrophil granulocyte function in bacteria infections. Lancet, London, v.11, p.727-9, 1972.
- STOCKER, R., FREI, B. Endogenous antioxidant defences in human blood plasma. In: SIES, H., ed., Oxidative stress: oxidants and antioxidants. London: Academic Press, 1991. p. 213-43.
- STOSSEL, T.P., POLLARD, T.D., MASON, R.J., VAUGHAN, M. Isolation and properties of phagocytic vesicles from polymorphonuclear leukocytes. J. Clin. Invest., New York, v.50, p. 1745-57, 1971.
- STOSSEL, T.P. Phagocytosis (first of three parts) N. Engl. J. Med., Boston, v. 290, p. 717-23, 1974a.
- STOSSEL, T.P. Phagocytosis (second of three parts) N. Engl. J. Med., Boston, v. 290, p. 774-80, 1974b.
- TAUBER, A.I. Protein kinase C and the activation of the human neutrophil NADPH- oxidase. Blood, New York, v. 69, p. 711-20, 1987.
- TAYLOR, A.A., SHAPELL, S.B. Reactive oxygen species, neutrophil and endothelial adherence molecules, and lipid derived inflammatory mediators in myocardial ischemia-reflow injury. In: MOSLEN, M.T., SMITH, C.V., eds., Free radical mechanisms of tissue injury. Texas: CRC Press, 1994. p.65-142.
- THORPE, G.H.G., KRICKA, L.J. Enhanced chemiluminescence reactions catalyzed by horseradish peroxidase. Methods Enzymol., New York, v. 133, p. 331-53, 1986.
- THORPE, G.H.G., KRICKA, L.J., GILLESPE, E., MOSELEY, S., AMESS, R., BAGGETT, N., WHITEHEAD, T.P. Enhancement of the

horseradish peroxidase-catalyzed chemiluminescent oxidation of cyclic diacyl hidrazides by 6-hydroxybenzothiazoles. Anal. Biochem., Baltimore, v. 145, p. 96-100, 1985.

- THORPE, G.H.G., KRICKA, L.J., MOSELEY, S., WHITEHEAD, T.P. Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in luminescence-monitored enzyme immunoassays. Clin Chem., Winston-Salem, v. 31, p. 1335-41, 1985.
- UHLINGER, D.J., BURNHAM, D.N., MULLINS, R.E., KALMAR, J.R., CUTLER, C.W., ARNOLD, R.R., LAMBETH, J.D., MERRILL JR., A.H. Functional differences in human neutrophils isolated pre- and post-prandially. FEBS Lett., Amsterdam, v. 268, p. 28-32, 1991.
- WAKEFIELD, J.S.J., GALE, J.S., BERRIDGE, M.V., JORDAN, T.J., FORD, H.C. Is percoll innocuous to cells? Biochem. J., London, v. 202, p. 795-7, 1982.
- WANG, J-F., KOMAROV, P., SIES, H., GROOT, H. Contribution of nitric oxide synthase to luminol-dependent chemiluminescence generated by phorbol-ester-activated Kupffer cells. Biochem. J., London, v. 279, p. 311-4, 1991.
- WESTMAN, J.A. Influence of pH and temperature on the luminol-dependent chemiluminescence of human polymorphonuclear leukocytes. Scand. J. Clin. Lab. Invest., Oslo, v. 46, p.427-34, 1986.
- WEVER, R., KAST, W.M., KASINOEDIN, J.H., BOELEN, R. The peroxidation of thiocyanate catalyzed by myeloperoxidase and lactoperoxidase. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v. 709, p. 212, 1982.
- WHITEHEAD, T.P., THORPE, G.H.G., CARTER, T.J.N., GROUCUTT, C., KRICKA, L.J. Enhanced luminescence procedure for sensitive determination of peroxidase-labelled conjugates in immunoassay. Nature, London, v. 305, p. 158-9, 1983.
- WINTERBOURN, C.C., VAN DEN BERG, J.J.M., ROLTMAN, E, KUIPERS, F.A. Chlorination formation from insaturated fatty acids reacted with hipochlorous acid. Arch. Biochem. Biophys., New York, v. 296, p. 547-55, 1992.
- WRIGHT, D. Human neutrophil degranulation. Methods Enzymol., New York, v. 162, p. 538-51, 1988.
-