

Eclética Química

Print version ISSN 0100-4670 *On-line version* ISSN 1678-4618

Eclet. Quím. vol.27 no.special São Paulo 2002

<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-46702002000200023>

Avaliação bioquímica e ultraestrutural da interação de imunocomplexos de IgG com leucócitos polimorfonucleares: efeito de antioxidantes naturais

Biochemical and ultrastructural evaluation of the interaction between IgG immunocomplexes and polymorphonuclear leukocytes: effect of natural antioxidants

Carlos Alberto de Oliveira^I; Ana Elisa Caleiro Seixas Azzolini^{II}; Silvana Chedraoui Silva ^{III}; Alexandre Kanashiro^{II}; Luciana Mariko Kabeya^{II}; Ana Paula Gomes Braga de Azevedo^{IV}; Cristiane Fernandes de Freitas Gonçalves^{IV}; Daniel Sivieri Coreiro^{IV}; Denise Pimenta da Silva Leitão^{IV}; Lorena Rigo Gaspar^{IV}; Pablo Leonardo Viana de Souza^{IV}; Yara Maria Lucisano Valim^{II}; Bernardo Mantovani^{III}

^IDepartamento de Química - UFU - 38400-089 - Uberlândia - MG - Brasil

^{II}Departamento de Física e Química - FCFRP - USP - 14040-903 - Ribeirão Preto - SP - Brasil

^{III}Departamento de Bioquímica e Imunologia - FMRP - USP - 14049-900 - Ribeirão Preto - SP - Brasil

^{IV}Alunos da disciplina "Métodos bioquímicos e ultraestruturais para avaliação da interação de neutrófilos com complexos antígenoanticorpo", ministrada no curso de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - FCFRP-USP - 14040-903 - Ribeirão Preto - SP - Brasil

RESUMO

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por leucócitos polimorfonucleares (LPMNs) durante a fagocitose é essencial para a defesa do organismo contra microrganismos invasores. Entretanto, em algumas doenças ocorre a deposição de imunocomplexos, o que leva à produção e liberação excessiva dessas EROs, e conseqüente lesão nos tecidos hospedeiro. Neste trabalho avaliamos o efeito de substâncias naturais (quercetina e 7-aliloxicumarina) sobre a produção de EROs por LPMNs de coelho, estimulados com imunocomplexos de imunoglobulina G (ICIgG),

empregando o ensaio de quimioluminescência (QL) dependente de luminol (QL_{lum}) e de QL dependente de lucigenina (QL_{luc}). A interação entre ICIgG e LPMNs, mediada pelo receptor de membrana Fcg, foi observada por microscopia eletrônica de transmissão, pela intensa marcação dos ICIgG com partículas de ouro coloidal. Os resultados obtidos indicaram que as substâncias analisadas inibiram a QL_{lum} e a QL_{luc} e que tais efeitos não parecem estar relacionados com a inibição da fagocitose, conforme observado no ensaio por microscopia eletrônica.

Palavras-chave: Leucócitos polimorfonucleares; flavonóides; cumarinas; quimioluminescência; microscopia eletrônica; complexos antígeno-anticorpo

ABSTRACT

The generation of reactive oxygen species (EROs) by polymorphonuclear leukocytes (LPMNs) during phagocytosis plays a key role in the organism defense against invading microorganisms. However, in some diseases the immune complexes deposition occurs, that causes an increase in the production and release of EROs. Consequently, the host tissue is damaged. In this work we studied the effect of natural compounds (quercetin and 7-allyloxy coumarin) on EROs generation by rabbit (LPMNs) stimulated with immune complexes (IC) of chicken egg albumin (antigen) and class G immunoglobulins (IgG) - ICIgG. The EROs production was measured by chemiluminescence assay (QL) enhanced by luminol (QL_{lum}) or by lucigenin (QL_{luc}). The interaction between ICIgG (conjugated with colloidal gold) e LPMNs, mediated by Fcg membrane receptor, was observed by transmission electron microscopy. The results indicated that the studied compounds inhibited QL_{lum} and QL_{luc}. They also suggest that such effects are not related to phagocytosis inhibition, as observed by the electron microscopy assay.

Keywords: Polymorphonuclear leukocytes; flavonoids; coumarins; chemiluminescence; electronic microscopy; antigen-antibody complexes

Introdução

Os leucócitos polimorfonucleares (LPMNs), em especial os neutrófilos, constituem a primeira linha de defesa do organismo contra agentes invasores. Tais células têm a função altamente especializada de englobar e destruir diferentes tipos de patógenos, sendo, por essa razão, também chamadas de fagócitos profissionais⁶.

A fagocitose se inicia com a interação de receptores de membrana dos fagócitos com estruturas da superfície do agente invasor, ou com opsoninas que o revestem, fornecidas pelo organismo do hospedeiro¹. As principais classes de opsoninas são as imunoglobulinas classe G (IgG), os componentes C3b e C3bi do Sistema Complemento, e alguns carboidratos, ligados ou não a

proteínas^{8, 14}.

A opsonização do antígeno por imunoglobulinas leva à formação de imunocomplexos, que podem ou não ser fagocitados e destruídos pelos LPMNs. Em algumas doenças autoimunes, como a artrite reumatóide, há intensa formação de imunocomplexos, que se depositam em diversos órgãos, como rins e articulações¹⁵. Nesses casos as células fagocíticas não conseguem englobar a grande massa de imunocomplexos formada. Este processo leva à liberação extracelular de diversas enzimas proteolíticas e de espécies reativas de oxigênio (EROs) derivadas do metabolismo oxidativo do fagócito, o que culmina no estabelecimento da lesão tecidual crônica, também conhecida como "doença por imunocomplexo"^{13, 15}.

Com o intuito de modular esse processo, atualmente tem-se estudado a atividade de compostos de origem natural, como flavonóides^{7, 10} e cumarinas^{4, 5} sobre a produção e liberação de EROs por células fagocíticas estimuladas com componentes solúveis, como PMA (acetato de miristoil-forbol) e *n*-fMLP (*n*-formil-metionil-leucil-fenilalanina).

No presente estudo avaliamos o efeito do flavonóide quercetina e da 7-aliloxicumarina sobre o metabolismo oxidativo de LPMNs de coelho após interação com imunocomplexos da classe G (ICIgG), que são agentes estimuladores particulados. A produção de EROs foi medida por quimioluminescência dependente de luminol (QL_{lum}) ou de lucigenina (QL_{luc}). Avaliamos ainda, por microscopia eletrônica de transmissão, a interação dos LPMNs com o ICIgG marcado com ouro coloidal.

Os resultados obtidos indicaram que as substâncias analisadas inibiram a quimioluminescência e que o fenômeno não parece estar relacionado com a inibição da fagocitose, como sugere o ensaio de microscopia eletrônica.

Materiais e Métodos

Materiais

- Luminol (5-amino-2,3-diidro-1,4-fitalazinodiona)-Sigma Chemical Co., St Louis, MO., USA. (PM: 177,2 g/mol) – sonda para detecção de diversas espécies reativas de oxigênio.
- Lucigenina (10,10-dinitrato de dimetil-biacrinidina)-Sigma Chemical Co., St Louis, MO., USA. (PM: 510,5 g/mol) – sonda específica para detecção de radicais superóxido.
- Quercetina (3,3,4,5,7-pentahidroxi-flavona)-Sigma Chemical Co., St Louis, MO., USA. (PM: 338,3 g/mol)
- A 7-aliloxicumarina foi obtida através de modificação estrutural da 7-hidroxycumarina (umbeliferona, Aldrich H2 400-3) - PM: 203,0 g/mol.

Métodos

a) Purificação de LPMNs de sangue de coelho

Os LPMNs foram isolados de sangue periférico de coelhas (linhagem Nova Zelândia, adultas, pesando cerca de 3 Kg) segundo o método de Lucisano & Mantovani ⁹. As células foram diluídas em solução de Hanks pH 7,2 para uma concentração de 2×10^6 células/mL. O método permite obter uma preparação com cerca de 80 a 90% de neutrófilos e viabilidade maior que 95%, determinada pelo ensaio de exclusão ao corante Azul de Tripán.

b) Preparação do Imunocomplexo (ICIgG)

O imunocomplexo foi preparado adicionando o antígeno (ovalbumina 1×10^{-3} g/mL) sobre o anticorpo da classe G (IgG), na zona de equivalência, a qual foi determinada por método de imunodifusão e curva de precipitação segundo Ouchterlony ¹². Incubou-se por 1 hora a 37°C e a seguir centrifugou-se a $12.100 \times g$ por 15 minutos. Ressuspendeu-se para 1 mL com solução salina. Retirou-se uma alíquota de 0,1 mL, que foi centrifugada a $12.100 \times g$ por 15 minutos. O sedimento foi ressuspensão em 50 mL de NaOH 0,1 mol/L e completou-se o volume para 1 mL com solução salina. Fez-se a leitura da absorvância a 280 nm. O valor lido no aparelho foi multiplicado pela constante de valor igual a $7,15 \times 10^{-4}$ obtendo-se assim a quantidade de imunocomplexo em g/mL.

c) Ensaio de quimioluminescência

c.1) Padronização da concentração de ICIG

Alíquotas de LPMNs (1×10^6 / mL) contendo 10 mL de luminol ($2,8 \times 10^{-4}$ mol/L) ou 15 mL de lucigenina ($1,5 \times 10^{-4}$ mol/L), dissolvidos em DMSO, foram incubadas por 3 minutos a 37°C. Adicionou-se o ICIG em diversas concentrações (0, 4, 6, 9 e 15×10^{-5} g/mL), obtendo-se volume final de 1 mL. As concentrações finais de cada componente estão indicadas entre parênteses.

A QL foi lida em intervalos regulares, ao longo de 10 minutos a 37°C, em Luminômetro Autolumat LB 953 EG & G Berthold. Dessa forma, para cada tubo de reação obteve-se uma curva de QL x tempo (em minutos), conforme representado na [figura 1](#). A QL foi expressa em Cpm, que é a quantidade de fótons produzidos por minuto. Para cada curva de QL x tempo determinou-se o valor da área integrada (área sob a curva) de 0 a 10 minutos, que foi utilizado para a construção de curvas dose-resposta ([figura 2](#)).

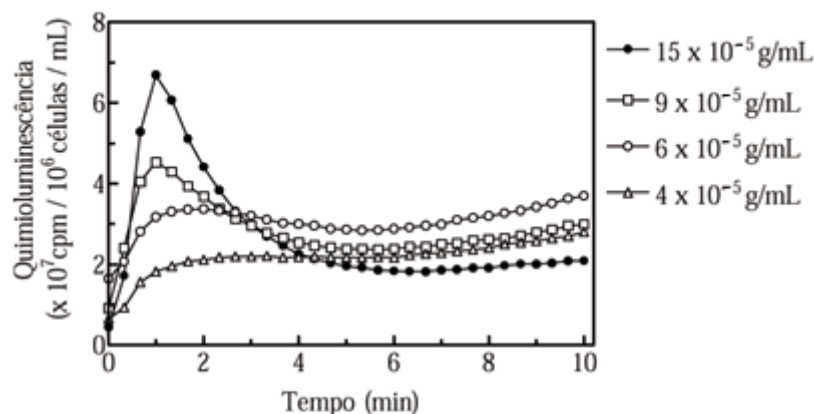


FIGURA 1 – Perfil de QL representativo da produção de EROs por 1×10^6 LPMNs de coelho, estimulados com diferentes concentrações de ICIgG, medida através do ensaio de QL_{lum} .

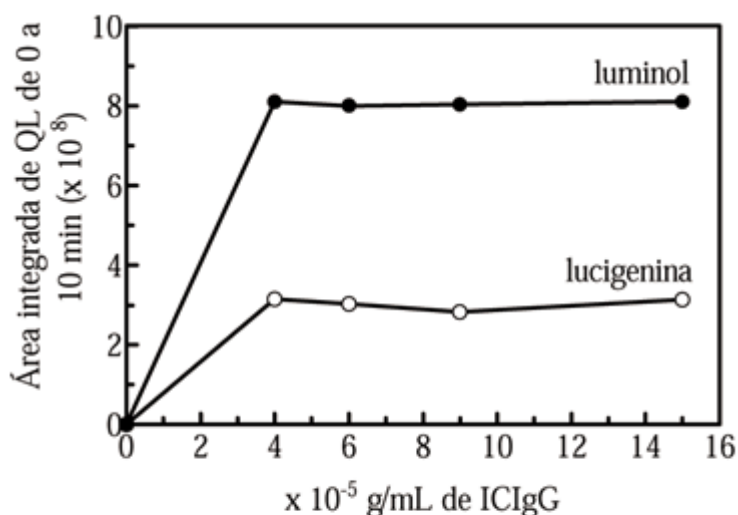


FIGURA 2 – Avaliação da produção de EROs por 1×10^6 LPMNs de coelho estimulados com diferentes concentrações de ICIgG, representado como área integrada de QL_{lum} e de QL_{luc} .

c.2) Avaliação do efeito dos compostos naturais sobre a produção de EROs por LPMNs estimulados com ICIgG

Alíquotas de LPMNs (1×10^6 /mL) foram pré-incubadas por 3 minutos a 37°C com 10 mL de luminol ($2,8 \times 10^{-4}$ mol/L) ou 15 mL de lucigenina ($1,5 \times 10^{-4}$ mol/L), 5 mL dos compostos teste quercetina ($2,0 \times 10^{-4}$ mol/L) ou 7-aliloxicumarina ($5,0 \times 10^{-5}$ mol/L), dissolvidas em DMSO (ou volume equivalente do solvente para o controle). Adicionou-se o ICIgG (6×10^{-5} g/mL) e a QL foi lida segundo descrito no item c.1. O volume final da reação foi de 1mL e as concentrações finais de

cada componente estão indicadas entre parênteses. A porcentagem de inibição da QL de cada composto, em relação ao controle, foi determinada utilizando-se valores de área integrada de QL, como se segue: $[1 - (\text{Área}_{\text{teste}} / \text{Área}_{\text{controle}})] \times 100$.

d) Ensaio de microscopia eletrônica de transmissão

d.1) Complexação das partículas de ouro coloidal com IgG de carneiro.

O ouro coloidal foi preparado segundo método descrito por Horisberger & Roset³ e modificado por Oliveira¹¹. Baseia-se na redução de uma solução aquosa de ácido tetracloroaurico (HAuCl_4) com uma solução de citrato trissódico 1%. Foi avaliado o espectro de absorção do ouro coloidal recém produzido comparando-o com o espectro de absorção de uma alíquota de ouro coloidal diluída 1:1 com NaCl 10% em água.

Para a conjugação da IgG de carneiro anti-soro de coelho, ajustou-se sua concentração para $2,5 \times 10^{-4}$ g/mL com tampão borato 2×10^{-3} mol/L, pH 9,0. A seguir, cerca de 70 mL da solução de ouro coloidal, cujo pH foi acertado para 9,0 com K_2CO_3 0,2 mol/L, foi centrifugada a $600 \times g$ a 4°C por 15 min. Coletou-se o sobrenadante. Em um bequer plástico foi misturado 1mL da imunoglobulina com 10 mL do sobrenadante da solução de ouro coloidal, agitou-se várias vezes e esperou-se 5 min a temperatura ambiente. Acrescentou-se 1mL da solução de polietilenoglicol 20.000 a 1% em água destilada e deixou-se em repouso a temperatura ambiente por 30 min. Em seguida centrifugou-se a $16.000 \times g$ por 1 hora a 4°C . O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspensão com 1mL de PBS contendo azida sódica a 0,03% e polietilenoglicol 20.000 a 0,04%. Conservou-se em alíquotas a 4°C .

d.2) Avaliação da interação de ICIgG com LPMNs

A avaliação morfológica da interação de ICIgG com LPMNs de coelho foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão. A amostra foi preparada segundo Oliveira¹¹. Inicialmente, procedeu-se a interação do ICIgG com as células a uma temperatura de 4°C . Posteriormente, adicionou-se IgG de carneiro conjugada ao ouro coloidal, também a 4°C . Após remoção do material não ligado, permitiu-se a interiorização do imunocomplexo pela incubação a 37°C . Para a obtenção de cortes ultrafinos destinados à análise por microscopia eletrônica de transmissão, tornou-se necessário uma pré-inclusão do sedimento celular em ágar e subsequente inclusão em resina XL112.

Resultados e discussão

a) Ensaio de quimioluminescência

Na [figura 1](#) estão representados os perfis de produção de QL ao longo do tempo, por 1×10^6 LPMNs estimulados com diferentes concentrações de ICIgG. A quantidade de células foi padronizada no trabalho de Cheung et al.²

Observou-se que, apesar dos perfis de QL e dos valores dos picos de produção de QL serem diferentes, dentre as concentrações de ICIgG empregadas, os valores de área integrada de QL são

semelhantes, como se pode observar na [figura 2](#). Como o valor de área integrada de QL (área sob a curva) reflete a quantidade total de EROs produzidas, observou-se que a partir da concentração de 4×10^{-5} g/mL de ICIgG obtém-se resposta máxima e constante de QL_{lum} e de QL_{luc} ([Figura 2](#)). Para obtermos uma margem de segurança na execução dos ensaios propostos, optou-se por utilizar 6×10^{-5} g/mL de ICIgG.

Empregando-se as condições estabelecidas para os ensaios de QL, avaliou-se o efeito de dois compostos de origem natural sobre a produção de EROs por LPMNs estimulados com ICIgG. Conforme se observa na [figura 3](#), os dois antioxidantes estudados, quercetina e 7-aliloxicumarina, inibiram a produção de EROs. A quercetina inibiu em 85% a produção total de EROs (QL_{lum}) e em 50% a produção de radicais superóxido (QL_{luc}). Em relação a 7-aliloxicumarina, esta inibiu a produção total de EROs em 77% e a produção de radicais superóxido em 47%.

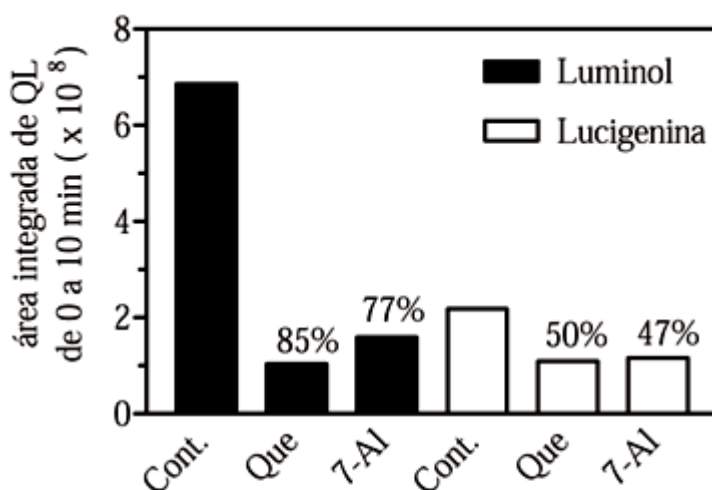


FIGURA 3 - Efeito inibitório da quercetina (5×10^{-5} mol/L) e da 7 aliloxicumarina (2×10^{-4} mol/L) sobre a produção de EROs por 1×10^6 LPMNs de coelho estimulados com 6×10^{-5} g/mL de ICIgG, avaliado através dos ensaios de QL_{lum} e de QL_{luc} . Os valores sobre as barras representam a porcentagem de inibição em relação ao controle contendo o solvente das drogas (DMSO). Cont: controle; Que: quercetina; 7-Al: 7-aliloxicumarina.

Embora ambos os antioxidantes tenham produzido efeitos inibitórios semelhantes, deve-se considerar que foi utilizada uma concentração de 7-aliloxicumarina ($2,0 \times 10^{-4}$ mol/L) quatro vezes maior que a concentração da quercetina ($5,0 \times 10^{-5}$ mol/L). Portanto, a quercetina tem um efeito inibitório maior sobre a produção de EROs nos dois sistemas.

b) Ensaio de microscopia eletrônica de transmissão

No ensaio de microscopia eletrônica, foram fotografados LPMNs estimulados com ICIgG (controle positivo para fagocitose) e LPMNs pré-tratados com os agentes antioxidantes. A interação entre ICIgG e LPMNs desencadeia o processo de fagocitose, que culmina com o englobamento das partículas de ICIgG complexadas com ouro coloidal, e que podem ser identificadas como pontos

eletron-densos no interior dos vacúolos fagocíticos destas células, conforme observado na [Figura 4A](#).

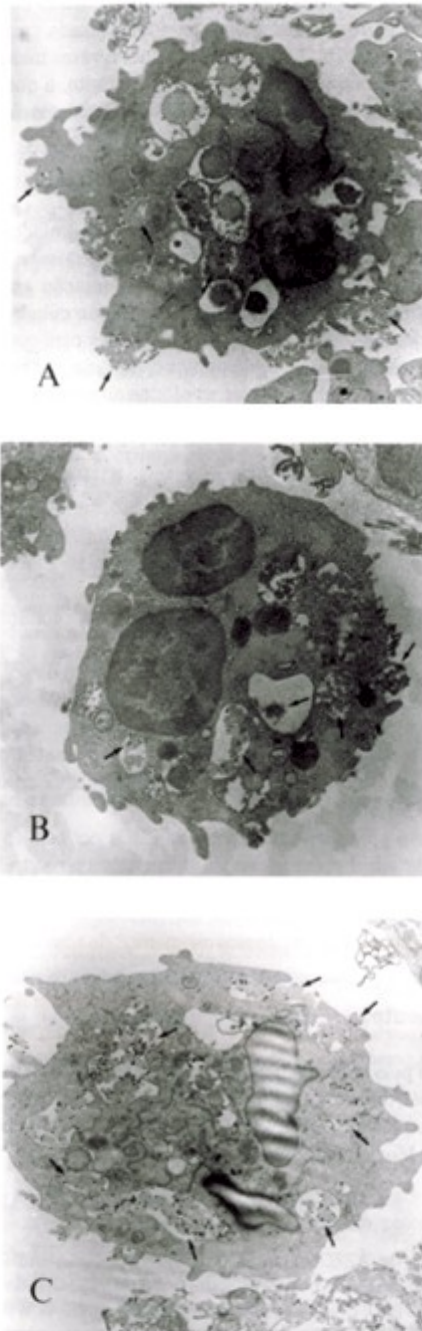


FIGURA 4 - Avaliação do efeito de antioxidantes naturais sobre a fagocitose de complexos imunes de IgG (IClgG) por leucócitos polimorfonucleares de coelho (LPMNs). O IClgG, composto de IgG de coelho e ovalbumina misturados na zona de equivalência, está ligado a IgG de carneiro anti-soro de coelho complexada com partículas de ouro coloidal de 15 a 18 nm de diâmetro, e podem ser visualizados como pontos negros no interior e na superfície das células (indicados pelas setas). A: LPMN tratado com DMSO, usado como solvente das drogas (x 13.000). B: LPMN tratado com quercetina 5×10^{-5} mol/L (x 13.000). C: LPMN tratado com 7-aliloxicumarina 2×10^{-4} mol/L (x 13.000).

Nos ensaios onde foi feito um tratamento prévio das células com a quercetina ([figura 4B](#)) e a 7-aliloxicumarina ([Figura 4C](#)) também foi observado o fenômeno de fagocitose das partículas de ICIgG ligadas a IgG de carneiro complexada com ouro coloidal, sugerindo que tais substâncias, embora inibam a formação de EROs, parecem não interferir no processo de fagocitose pelos LPMNs.

Conclusões

Dentro das condições experimentais dos ensaios de QL descritas neste trabalho, para alíquotas de 1×10^6 LPMNs/mL obtêm-se uma produção de EROs máxima e constante empregando-se concentrações de ICIgG maiores que 4×10^{-5} g/mL.

A quercetina e a 7-aliloxicumarina inibiram a produção de EROs pelos LPMNs, como observado pelos ensaios de QL_{lum} e de QL_{luc} , sendo que a quercetina produziu um efeito inibitório maior. Além disso, esses compostos não inibiram a fagocitose dos ICIgG pelos LPMNs, como observado pelo ensaio de microscopia eletrônica de transmissão, sugerindo que estas substâncias devam atuar como seqüestrantes de EROs ou ainda atuar como inibidores de enzimas relacionadas ao processo de produção das mesmas.

Visto que a produção exacerbada de EROs por células fagocíticas está envolvida em diversas doenças inflamatórias e auto-imunes, incluindo-se aquelas mediadas por imunocomplexos, é de especial interesse a busca de novos compostos de origem natural capazes de modular esse processo, visando o desenvolvimentos de novos fármacos.

Agradecimentos

À Fapesp pelo apoio financeiro e aos funcionários Maria Dolores S. Ferreira e José Augusto Maulin, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Referências bibliográficas

- 1 BROWN, E.J. Phagocytosis. *Bioassays*, v,17, p.109-177, 1995. [[Links](#)]
- 2 CHEUNG K.; ARCHIBALD, A.C.; ROBINSON, M.F. The origin of chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by opsonized zymosan. *J.Immunol.*, v.130, p.2324-2329,1983. [[Links](#)]
- 3 HORISBERGER, M.; ROSSET, J. Colloidal gold, a useful marker for transmission electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, v.25, p.295-305, 1977. [[Links](#)]
- 4 HOULT, J.R.S.; MORONEY, M.A.; PAYÁ, M. Actions of flavonoids and coumarins on lipoxygenase and cyclooxygenase. *Method. Enzimol.*, v.234, p.443- 454, 1994. [[Links](#)]

- 5 HOULT, J.R.S.; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutical potential. *Gen. Pharmacol.*, v.27, p.713-722, 1996. [[Links](#)]
- 6 JOHNSON, K.J.; VARANI, J.; SMOLEN, J.E. Neutrophil activation and function in health and disease. *Immunol. Ser.*, v.57, p.1-46, 1992. [[Links](#)]
- 7 LIMASSET, B.; LE DOUCEN, C.; DORE, J. C.; OJASOO, T.; DAMON, M.; CRASTES, D. P. Effects of Flavonoids on the Release of Reactive Oxygen Species by Stimulated Human Neutrophils. Multivariate Analysis of Structure-Activity Relationship (SAR). *Biochem. Pharmacol.*, v.46, p.1257-1271, 1993. [[Links](#)]
- 8 LÖFGREN, R.; SERRANDER, L.; FORSBERG, M.; WILSSON, A.; WASTESON, A.; STENDAHL, O. CR3, FcγRIIA and FcγRIIB induce activation of the respiratory burst in human neutrophils: the role of intracellular Ca²⁺, phospholipase D and tyrosine phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.1452, p.46-59, 1999. [[Links](#)]
- 9 LUCISANO Y. M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG. *J. Immunol.*, v.132, p.2015-2020, 1984. [[Links](#)]
- 10 MIDDLETON JR., E.; KANDASWAMI, C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochem. Pharmacol.*, v.43, p.1167-1179, 1992. [[Links](#)]
- 11 OLIVEIRA, C. A. Estudo do receptor de IgM em leucócitos polimorfonucleares de coelho e humanos: correlação com doenças desencadeadas por imunocomplexos. Ribeirão Preto, 1996. Trabalho de pós-doutoramento - Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. [[Links](#)]
- 12 OUCHTERLONY, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy*, v.15, p.1-78, 1958. [[Links](#)]
- 13 SCHIFFERLI, J.A.; TAYLOR, R.P. Physiological and pathological aspects of circulating immune complexes. *Kidney Int.*, v.35, p.993-1003, 1989. [[Links](#)]
- 14 TJELLE, T.E.; LOVDAL, T.; BERG, T. Phagosome dynamics and function. *BioEssay*, v.22, p.255-263, 2000. [[Links](#)]
- 15 WEISS, S.J. Tissue destruction by neutrophils. *New Engl.J.Med.*, v.320, p.365-376, 1989. [[Links](#)]

Recebido em 06.02.2002

Aceito em 19.03.2002