UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-graduação em Farmácia

Área de Análises Clínicas

Oxidação de Melatonina Catalisada por Mieloperoxidase em Neutrófilos Ativados

Sueli de Oliveira Silva

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre

Orientadora:

Profa. Dra. Ana Campa

São Paulo

2001

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-graduação em Farmácia

Área de Análises Clínicas

Oxidação de Melatonina Catalisada por Mieloperoxidase em Neutrófilos Ativados

Sueli de Oliveira Silva

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre

Orientadora:

Profa. Dra. Ana Campa

São Paulo

2001

Sueli de Oliveira Silva

Oxidação de Melatonina Catalisada por Mieloperoxidase em Neutrófilos Ativados

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre

Profa. Dra. Ana Campa

Orientador/Presidente

Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti

1º Examinador

Profa. Dra. Regina P. Markus

2º Examinador

São Paulo, 20 de abril de 2001

Ao meu esposo Sandro, pelo
apoio, compreensão e ajuda e
aos meus pais por terem
acreditado em mim.

À minha orientadora e amiga,
Prof^ª Ana Campa, por ter confiado a
mim este trabalho e pela ajuda
nas horas difíceis.

Agradecimentos

A Deus, por esta grande oportunidade.

À Fapesp e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Ao prof Luiz Henrique Catalani, pela orientação técnico-científica.

Ao Valdecir F. Ximenes pela grande ajuda técnica e pela amizade.

Aos amigos de laboratório: Boni, Cristiane, Elaine, Fernanda e Maria Rita.

Aos colegas do curso de pós-graduação, pelo convívio, auxílio e amizade;

Aos funcionários Mariano, Rose e Carmem, pela ajuda na realização deste trabalho;

Aos amigos que se dispuseram a doar amostras de sangue para o desenvolvimento deste trabalho;

Índice

1. Lista de Abreviaturas	3
2. Resumo	4
3. Abstract.....	5
4. Introdução	6
4.1. Oxidações de Indóis.....	7
4.1.1. Melatonina	8
4.2. Inflamação, Fagocitose, Sistema NADPH Oxidase e <i>Burst</i> Oxidativo	10
4.3. Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio Produzidas por Neutrófilos ...	13
4.3.1. Ânion Superóxido e Peróxido de Hidrogênio	13
4.3.2. Radical Hidroxila e Oxigênio Singlete	14
4.3.3. Ácido Hipocloroso	15
4.3.4. Peroxinitrito.....	15
4.4. Mieloperoxidase	16
4.5. HRP.....	18
4.6. Quimiluminescência	21
5. Objetivos.....	23
6. Material e Métodos	24
6.1. Material.....	24
6.1.1. Reagentes	24
6.1.2. Equipamentos.....	24
6.2. Métodos.....	26
6.2.1. Preparo de Reagentes	26
6.2.2. Isolamento de Neutrófilo	26
6.2.3. Consumo de Oxigênio	27
6.2.4. Medidas de Emissão de Luz	27
6.2.5. Isolamento e Identificação de Produto.....	28
7. Resultados.....	30
7.1. Quimiluminescência das Reações de Derivados Indólicos/HRP/H ₂ O ₂ em pH Fisiológico	30

7.2. Oxidação do 2-metilindol por HRP/H ₂ O ₂ (em pH fisiológico) e por Neutrófilos Ativados.	33
7.3. Oxidação da Melatonina por HRP/H ₂ O ₂ , (em pH fisiológico), por MPO/H ₂ O ₂ , e por Neutrófilos Ativados	38
8. Discussão	50
9. Conclusões	57
10. Referências Bibliográficas.....	58

1. Lista de Abreviaturas

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

DMSO: dimetil sulfóxido

ERO: espécies reativas de oxigênio

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

HRP: peroxidase de rábano (*horseradish peroxidase*)

IAA: ácido 2 (indol-3-il) acético

IL-1: interleucina-1

IL-6: interleucina-6

IL-10: interleucina-10

MPO: mieloperoxidase

PBS: tampão fosfato salino (*phosphate buffer saline*)

PMA: acetato de forbol miristato (*phorbol myristate acetate*)

SOD: superóxido dismutase

THF: tetrahidrofurano

ZO: zimosan opsonizado

2. Resumo

Este trabalho apresenta dados relativos a oxidação de melatonina catalisada por peroxidase de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*) e mieloperoxidase (MPO). Em presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), HRP catalisa a oxidação de melatonina com formação de um produto de clivagem do anel indólico, a N^1 -acetil- N^2 -formil-5-metoxiquinuramina. Esta reação consome oxigênio e apresenta quimiluminescência na região de 440-540 nm. Quimiluminescência e a formação da quinuramina também foram observados quando HRP/ H_2O_2 foram substituídos por neutrófilos ativados por acetato de forbol miristato ou zimosan opsonizado. Em neutrófilos, tanto a emissão de luz quanto a formação do produto foram inibidos pela adição de azida, um inibidor de MPO. Superóxido dismutase tem um forte efeito inibidor sobre a emissão de luz enquanto que catalase e ácido úrico não apresentam qualquer efeito. A oxidação de melatonina por neutrófilos ativados pode ser relevante *in vivo* e estar associada com algumas das funções descritas para mieloperoxidase e melatonina. A possível implicação biológica da oxidação de melatonina por neutrófilos, especialmente em condições inflamatórias, é discutida.

3. Abstract

In the presence of hydrogen peroxide, horseradish peroxidase (HRP) catalyzes the production of *N*¹-acetyl-*N*²-formyl-5-methoxykynuramine from melatonin. This reaction consumes oxygen and exhibits chemiluminescence in the 440-540 nm region. The excited cleavage product derived from the thermolysis of an intermediate dioxetane is suggested to be the emitting species. Chemiluminescence and the indole ring cleavage product were also observed when HRP/H₂O₂ was replaced by phorbol myristate acetate or opsonized zymosan-activated neutrophils. Azide, a myeloperoxidase inhibitor, strongly suppressed melatonin oxidation. Superoxide dismutase has a strong inhibitory effect on light emission but catalase and uric acid are without effect on the emission. The oxidation of melatonin by activated neutrophils may be relevant to the in vivo functions of myeloperoxidase and melatonin. The possible biological implication of melatonin oxidation by neutrophils, especially in inflammatory conditions, is discussed.

4. Introdução

Em um trabalho recente realizado pelo nosso grupo foi observado que HRP/H₂O₂, em meio alcalino, era capaz de oxidar vários compostos indólicos e que algumas destas reações eram bastante quimiluminescentes (1). Neste trabalho concentramos primeiramente nossa atenção para a oxidação de melatonina por HRP/H₂O₂ em pH fisiológico. Este estudo serviu como modelo para a oxidação de melatonina por neutrófilos ativados.

A introdução que se segue apresenta os principais tópicos que subsidiam a compreensão do nosso trabalho e que receberam os seguintes subtítulos:

- oxidações de indóis, descrevendo sua importância em vias metabólicas e mecanismo de reação;
- melatonina, relatando os efeitos biológicos descritos, especialmente aqueles associados a condições inflamatórias;
- Inflamação, Fagocitose, Sistema NADPH Oxidase e Burst Oxidativo, enfocando brevemente os principais eventos;
- Espécies reativas de Oxigênio e nitrogênio produzidas por neutrófilos, descrevendo suas atividade microbidas;
- mieloperoxidase e HRP, descrevendo os possíveis mecanismos pelos quais estas enzimas atuam como catalizadores e;
- quimiluminescência, relatando suas aplicações no acompanhamento do *burst* oxidativo de fagócitos.

4.1. Oxidações de Indóis

A química de compostos indólicos tem merecido bastante atenção devido à ampla distribuição de indóis *in vivo* e sua participação em vias metabólicas essenciais. Compostos indólicos com importante função biológica podem ser exemplificados pelo hormônio envolvido no crescimento de plantas, ácido 2 (indol-3-il) acético (IAA); hormônio da glândula pineal, melatonina; e outros compostos como serotonina e triptofano. Na reação de oxidação de compostos indólicos ocorre a clivagem oxidativa do núcleo indólico, através de um esperado intermediário dioxetânico (2). A exemplo do que ocorre com alguns sistemas bioluminescentes, onde as luciferinas são compostos indólicos (3, 4), é conhecido que durante a oxidação química de alguns indóis ocorre quimiluminescência, em muitos dos casos, originada do decaimento radiativo do produto de abertura do anel eletronicamente excitado (5).

Em condições fisiológicas, algumas oxigenases catalisam a oxidação de compostos indólicos biológicos com a formação dos mesmos tipos de produtos de abertura de anel (6). Além das enzimas triptofano dioxigenase e indolamina 2,3-dioxigenase, já existiam evidências experimentais que HRP também poderia clivar oxidativamente o núcleo indólico de alguns substratos. A oxidação do IAA e seu etil éster por HRP parece formar, ainda que minoritariamente, um produto de abertura de anel (7). Mais recentemente, observamos produtos de abertura de anel como rota principal na oxidação, catalisada por HRP, de vários indóis (1). O Esquema 1, baseado em mecanismos propostos para clivagem de produtos de anel indólico (8, 9), mostra através da formação de um radical do indol, seguida da adição de oxigênio, a formação de um intermediário do tipo dioxetano e a sua posterior clivagem.

Esquema 1-Rota proposta para a formação de produtos da clivagem do anel indólico

Da mesma forma como observado na oxidação química de indóis, também na oxidação catalisada por HRP/ H_2O_2 há a produção de quimiluminescência. A intensidade de quimiluminescência encontrada depende basicamente dos substituintes no núcleo indólico, sendo especialmente importantes as posições 2 e 3; onde 2-metilindol e 2,5-dimetilindol foram os que apresentaram maior emissão de luz (1). Para a oxidação aeróbia do IAA, catalisada por HRP, acredita-se que parte da quimiluminescência possa se originar do produto de abertura de anel (7).

4.1.1. Melatonina

Dentre os compostos indólicos biologicamente relevantes destacamos o hormônio produzido pela glândula pineal, a melatonina. A glândula pineal exerce influências regulatórias importantes em vertebrados devido à secreção deste hormônio. A concentração de melatonina no plasma é baixa durante o dia (1-6pg/mL) e alta à noite (200-300pg/mL), o que define um ritmo diário para melatonina (10).

Melatonina é um hormônio altamente lipofílico, sítios de ligação de melatonina tem sido reportados em vários tecidos periféricos de diferentes espécies. O efeito da melatonina parece não depender somente da sua concentração, mas também do tempo de exposição deste hormônio aos tecidos e da sensibilidade dos receptores de melatonina, a qual parece variar em função da hora do dia (10).

Estudos dos possíveis papéis fisiológicos da melatonina ainda relatam o seu efeito sobre a pigmentação (fenômeno que não ocorre em mamíferos), sobre a maturação das gônadas (pode ter um papel no controle da reprodução no homem), além de parecer atuar sobre o sono nos seres humanos (11). Este hormônio é importante em várias funções fisiológicas essenciais associado com ritmo circadiano e sazonal (12). Além destas funções, este hormônio pode desempenhar algumas outras funções estratégicas. Estudos apontam para a presença de receptores para melatonina em membranas de neutrófilos e monócitos (13, 14). Assim melatonina poderia ter um papel em processos inflamatórios. Na verdade vários efeitos sobre a ativação de leucócitos, e produção de óxido nítrico foram observados (15 - 17). Melatonina também parece influenciar o sistema imune de outras formas (18 - 21). Em monócitos, a melatonina induz a secreção de interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), ativa a formação de intermediários reativos de oxigênio e a citotoxicidade contra células tumorais (17, 14). Apesar dos inúmeros efeitos relatados, o mecanismo de ação da melatonina sobre o sistema imune não está ainda esclarecido. Como a melatonina é um bom doador de elétrons e reage eficientemente com radicais hidroxila (22) e peroxinitrito (23, 24), uma das propostas para alguns de seus efeitos poderia estar associado a sua forte capacidade em sequestrar radicais livres (25, 26).

O aminoácido L-triptofano é o precursor da melatonina. Este aminoácido é convertido a serotonina através de duas reações catalisadas respectivamente pelas enzimas triptofano hidroxilase e 5-hidroxitriptofano descarboxilase presentes na glândula pineal. A seguir, *N*-acetilação, catalisada pela enzima *N*-acetiltransferase e a posterior metilação pela

hidroxindol-o-metiltransferase, produzem melatonina. Não existem evidências de que a melatonina seja estocada na glândula pineal, ou seja, é liberada diretamente na corrente sanguínea. Aproximadamente 50-70% da melatonina circula na corrente sanguínea ligada a albumina e o significado biológico desta ligação é desconhecido. A inativação da melatonina ocorre no fígado, onde é convertida a 6-hidroximelatonina pelo sistema do citocromo P-450. A maior parte da 6-hidroximelatonina é excretada na urina e nas fezes. Uma parte da melatonina também pode ser convertida a *N*-acetil-5-metoxiquinurenina no sistema nervoso central (10).

Estudos têm demonstrado que fetos e recém nascidos não produzem melatonina, porém recebem este hormônio via placenta e via leite materno. A produção de melatonina aumenta rapidamente durante o primeiro ano de vida e alcança o maior nível de concentração sérica por volta do terceiro ano, ocorrendo uma diminuição na idade adulta. Vários fatores podem explicar o declínio da concentração sérica de melatonina, dentre eles o aumento da massa corpórea e a calcificação da glândula pineal. Podem, também, ocorrer variações nos níveis séricos de melatonina resultantes da predisposição genética (10).

4.2. Inflamação, Fagocitose, Sistema NADPH Oxidase e *Burst* Oxidativo

O dano tecidual desencadeia uma sequência de eventos complexos conhecidos como resposta inflamatória. Estes eventos são iniciados pela liberação de uma variedade de substâncias vasoativas e fatores quimiotáticos do local da lesão em direção à corrente sanguínea, os quais induzem o aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade capilar, levando a transmigração de células sanguíneas para a área da lesão.

Os neutrófilos são os leucócitos polimorfonucleares mais abundantes na circulação sanguínea e são as primeiras células a migrar para o sítio inflamatório (27). A atuação bactericida ou fungicida de neutrófilos, dependerá da ação de enzimas proteolíticas liberadas de

grânulos citoplasmáticos e de espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas durante o *burst* oxidativo. Os neutrófilos são células do sistema imune que apresentam um papel central na defesa do hospedeiro durante o processo inflamatório porém, podem também contribuir para o dano celular sendo responsáveis por exemplo, pela destruição de tecidos (28). Isto ocorre devido ao extravasamento de produtos tóxicos para o meio extracelular.

Os neutrófilos quando recrutados para o local da lesão apresentam a capacidade de englobar microorganismos e/ou fragmentos do tecido danificado por um processo denominado fagocitose (29).

A fagocitose é um processo constituído por uma série de eventos, tais como liberação de ERO, que tem por objetivo a morte do microorganismo. Para a eliminação de patógenos extracelulares que não podem ser fagocitados, existe a necessidade da liberação de enzimas lisossomais (30).

A ação de neutrófilos contra patógenos é precedida pela ligação do patógeno a receptores presentes na membrana desta célula. Receptores de opsonina reconhecem estímulos opsonizados (zimosan), que ativam a via da fosfolipase produzindo os diglicerídeos que ativarão a proteína C quinase (31, 32). A ativação direta da proteína C quinase pode ser obtida pela utilização de ésteres de forbol, por exemplo acetato de forbol miristato (PMA, *phorbol myristate acetate*) (33). Assim, ambas as atividades, dependentes e independentes de receptores de opsonina, podem ser avaliadas através da utilização, respectivamente de estímulos opsonizados e ésteres de forbol (Esquema 2).

Esquema 2-Vias de estimulação para a produção de ânion superóxido por fagócitos.

Após o reconhecimento do agente invasor, ocorre a organização, na membrana plasmática, de um sistema complexo denominado NADPH oxidase, que contém uma série de proteínas funcionais e estruturais previamente dispersas no citosol. A organização deste sistema, ocorre através da fosforilação do componente citosólico $p47^{\text{phox}}$, pela proteína C quinase, resultando na migração do complexo citosólico para a membrana plasmática. O acoplamento de todos os componentes à membrana forma o complexo cataliticamente ativo (34, 35) (Esquema 3)

Esquema 3-Organização do sistema NADPH oxidase quando fagócitos são estimulados (34).

O sistema NADPH oxidase catalisa a produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$) através da redução unieletrônica do oxigênio molecular, utilizando NADPH como doador de elétrons (34) (reação 1).

A metabolização do oxigênio molecular a $O_2^{\cdot -}$ pelo sistema NADPH oxidase é denominado de *burst* oxidativo. O *burst* oxidativo é uma característica de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos que recebem genericamente a denominação de fagócitos devido a sua habilidade em englobar material particulado. O *burst* foi descrito nos anos 30 como um aumento do consumo de oxigênio, sendo que este aumento era considerado como uma fonte de energia para fagocitose. O papel do *burst* como fonte de ERO foi reconhecido mais tarde e este processo é que confere a capacidade de *killing* a neutrófilos (36).

O acompanhamento do *burst* pode oferecer dados importantes relativos à produção das espécies microbicidas. O comprometimento de alguns dos passos que levam à produção do $O_2^{\cdot -}$ ou à degranulação, pode levar à diminuição da eficiência microbicida de células fagocíticas.

4.3. Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio Produzidas por Neutrófilos

4.3.1. Ânion Superóxido e Peróxido de Hidrogênio

Uma variedade de estímulos solúveis ou particulados induzem a produção de $O_2^{\cdot -}$ por neutrófilos. A maior parte do $O_2^{\cdot -}$ produzido é convertido a H_2O_2 , por dismutação espontânea, ou catalisada pela superóxido dismutase (SOD) (37) (reação 2).

O H_2O_2 tem atividade bactericida somente em altas concentrações (38) e o $\text{O}_2^{\cdot-}$, gerado exogenamente, não tem uma atividade bactericida direta (39, 40). Desta forma, a ação microbicida dos neutrófilos é provavelmente devida a ação de oxidantes secundários, produzidos a partir do $\text{O}_2^{\cdot-}$ e do H_2O_2 (41).

O H_2O_2 pode ser neutralizado por peroxidases ou catalase intracelulares, resultando na produção de H_2O e O_2 (42) (reações 3 e 4).

4.3.2. Radical Hidroxila e Oxigênio Singlete

Existem dois mecanismos possíveis para produção de radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) por neutrófilos: reação de Fenton, onde H_2O_2 reage com um metal de transição apropriado (íons metálicos, como íons férricos), (reações 5, 6, e 7).

Ou através da reação do ácido hipocloroso (HOCl) com $\text{O}_2^{\cdot-}$ (43) (reação 8).

Por ser altamente reativo $\cdot\text{HO}$ possui uma ação microbicida limitada; mesmo dentro do fagossomo este radical provavelmente reage com outros alvos antes de atingir o microorganismo (44).

O oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) pode ser produzido nos neutrófilos pela reação de H_2O_2 com o HOCl. Steinbeck e colaboradores (45) mostraram que a produção de oxigênio singlete por estas células é superior a 19%. Contudo, a importância deste composto como agente bactericida em neutrófilos, não está ainda bem estabelecida.

4.3.3. Ácido Hipocloroso

A maior parte do H_2O_2 produzido pelos neutrófilo é convertido a HOCl pela ação da enzima mieloperoxidase (46). O HOCl é o principal e o mais potente oxidante microbicida produzido pelos neutrófilos (47). Cloraminas podem ser geradas indiretamente pela reação do HOCl com aminas (48), as quais também possuem uma ação microbicida (49).

4.3.4. Peroxinitrito

A enzima óxido nítrico sintase oxida L-arginina formando L-citrulina e óxido nítrico. Existem duas isoformas da óxido nítrico sintase: a constitutiva e a induzida, Esta última, é encontrada nos fagócitos e pode ser induzida por uma variedade de endoxinas ou citocinas (50). Tem sido demonstrado que ânion superóxido reage com óxido nítrico formando peroxinitrito (ONOO^-) (51). Este pode se decompor dando origem a $\cdot\text{OH}$ e radical dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2\cdot$) (52) (reações 9, 10, e 11).

O Esquema 4 mostra a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por neutrófilos.

Esquema 4-Geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por neutrófilos.

4.4. Mieloperoxidase

A atividade *Killing* de neutrófilos se dá devido a produção de ERO e a degranulação enzimática que juntos completam a bateria microbicida desta célula. Dentre as enzimas liberadas está a MPO.

MPO representa 5% do peso seco de neutrófilos (53) e é o maior constituinte dos grânulos azurófilos citoplasmáticos (54). Esta enzima é uma heme peroxidase clássica e além da reação de formação de $HOCl$ tem sido sugerido que MPO pode catalisar a oxidação de uma variedade de compostos (41, 55).

O mecanismo de reação da MPO envolve a reação da forma férrica (MP^{3+}) com H_2O_2 para formar um intermediário redox - composto I, o qual oxida cloreto para produzir ácido hipocloroso. A oxidação de substratos orgânicos se dá através de duas transferências sucessivas de um elétron envolvendo o intermediário - composto I e composto II. Substratos pobres

sequestrariam o composto II e inibiriam a produção de ácido hipocloroso a não ser que O_2^- ou outra molécula do substrato esteja presente para reciclar a enzima (41). A oxidação de substratos orgânicos pode se dar também pelo envolvimento de MPO composto III ($MP^{2+}O_2$) (Esquema 5).

Esquema 5-Ciclos conhecidos para a mieloperoxidase. (41)

A MPO possui um heme prostético que não é extraído por técnicas convencionais (56). Como consequência, a identificação estrutural do grupo prostético heme de MPO foi motivo de controvérsias e só foi recentemente definido e denominado heme do tipo m (57, 58) (Esquema 6).

Esquema 6- Grupo prostético heme m da mieloperoxidase

Esta estrutura seria responsável pelas características atípicas do espectro de absorção de banda *Soret* da MPO.

Apesar da MPO catalisar a formação de um importante microbicida (HOCl), indivíduos deficientes em MPO não apresentam maiores comprometimentos, a não ser uma aparente maior susceptibilidade à infecções fúngicas. Tem sido aventado que o aumento do *burst* oxidativo, aumento da degranulação de grânulos de β -glucuronidase, lisozima e vitamina B₁₂ ligada a proteína e aumento da fagocitose contrabalançariam a deficiência de MPO (56). MPO ainda parece ter um papel na nitração de proteínas, peroxidação lipídica (59) e em imunomodulação (60).

4.5. HRP

As peroxidases estão presentes em diversas espécies de animais, de plantas, fungos e leveduras. Em geral peroxidases, diferentemente de MPO, podem ter seu grupo heme facilmente extraído (61). Peroxidases podem participar de vários processos fisiológicos e apresentam um largo

espectro de atividade, logo não apresentam especificidade e tem uma variedade de isoenzimas (61).

O mecanismo das reações catalisadas por peroxidase tem sido estudado principalmente com a HRP. A HRP é uma glicoproteína (62, 63) contendo como grupo prostético a ferriprotoporfirina IX ligada não covalentemente à parte protéica da molécula (64). O íon férrico (Fe III) central da referida protoporfirina está coordenado a um resíduo de histidina proximal, na 5ª posição (64, 65). Tem sido postulada a ocupação da 6ª posição de coordenação do Fe III por uma molécula de água juntamente com outro resíduo de histidina distal, através de uma ponte de hidrogênio, sendo atribuído a eles um papel importante durante o processo de catálise (66-68), (Esquema 7).

Esquema 7-Ferriprotoporfirina IX
(heme b)

Peroxidases catalisam a oxidação de uma variedade de substratos orgânicos na presença de H_2O_2 . A HRP atua sobre seus substratos através do ciclo peroxidásico clássico. O primeiro passo envolve a oxidação de dois elétrons do grupo prostético ferriheme da enzima (HRP nativa) por H_2O_2 ou um hidroperóxido orgânico, resultando na formação de um intermediário instável, dois equivalentes de oxidação acima da forma nativa, consistindo de um grupo ferril e um radical π cátion da porfirina, conhecido como

composto I (HRP-I) (reação 12). Este reage com um doador de elétrons (HDH), perdendo um equivalente de oxidação e formando o composto II (HRP-II) (reação 13). O composto II abstrai um elétron adicional e restitui a enzima na forma nativa (reação 14). O ciclo envolvendo Fe^{3+} , composto I e II é comum a muitas das reações de peroxidase, sendo o doador de elétrons oxidado a um radical que, dependendo de sua característica química e reatividade, determina os produtos específicos formados em cada caso (61).

Várias reações de oxidação catalisada por peroxidase na ausência de H_2O_2 tem sido descritas. Composto I e II não participam desta oxidação, e O_2 é reduzido a radical superóxido. Surgem então duas formas adicionais de peroxidase: ferropoxidase (Fe^{2+}) e composto III (HRP-III) ($\text{Fe}^{3+}\text{O}_2^-$) que estão envolvidas no ciclo oxidásico. A ligação entre ciclo peroxidásico e oxidásico está na reação do composto II com H_2O_2 para formar composto III (61).

Composto III ou HRP-III pode ser formado das seguintes maneiras: reação entre HRP nativa e excesso de H_2O_2 ou O_2^- , reação entre HRP-II e H_2O_2 , reação entre HRP ferrosa (forma reduzida de peroxidase, Fe^{2+}) e oxigênio. A HRP-III que formalmente está em um estado de oxidação seis é representada como um híbrido de ressonância entre um complexo de forma ferrosa com oxigênio e da forma férrica com ânions superóxido ($\text{Fe}^{+2}\text{-O}_2 \leftrightarrow \text{Fe}^{+3}\text{-O}_2^-$) (69).

Cálcio é um constituinte endógeno da molécula de peroxidase e é importante para a estabilidade da estrutura da enzima. Embora o cálcio não participe do mecanismo de reação catalisada por HRP, a sua remoção causa uma perturbação na enzima a qual perde sua atividade enzimática afetando especialmente a redução do composto II (61).

Uma característica particular de algumas peroxidases é que estas são capazes de catalisar reações que geram produtos oxigenados do tipo esperado pela clivagem de um intermediário dioxetano ou dioxetanona, formando produtos no estado eletronicamente excitado, que podem retornar ao estado fundamental emitindo luz e serem detectados por quimiluminescência direta ou indireta (61). (Esquema 8).

Esquema 8-Oxidação de substratos apropriados catalisada por HRP.

4.6. Quimiluminescência

Os átomos e moléculas absorvem diferentes radiações fazendo transições entre seus níveis energéticos. O resultado desta absorção depende do comprimento de onda da radiação. Comprimentos de onda na região do visível ou ultravioleta geram estados eletronicamente excitados, os quais são termodinamicamente instáveis e devem desativar-se voltando ao estado fundamental (70).

Quimiluminescência é o fenômeno onde ocorre a formação de estados eletronicamente excitados através de uma reação química e pode ser observada quando o estado excitado decai para o estado fundamental emitindo luz. Se a reação ocorrer em um organismo vivo ou for derivada de um receptorá o nome de bioluminescência (71).

Todas as reações bioluminescentes conhecidas e a maioria das reações quimiluminescentes são direta ou indiretamente oxidações envolvendo oxigênio ou alguns dos seus derivados como H_2O_2 , O_2^- , $\cdot\text{OH}$ entre outros. Para estas reações foi proposto o envolvimento de intermediários peroxídicos lineares ou principalmente cíclicos (anéis 1,2-

dioxetânicos), os quais são conhecidos pela sua capacidade de gerar estados excitados após clivagem térmica (72, 73).

As condições essenciais para a ocorrência de uma reação quimiluminescente são:

a) a reação deve ser exotérmica e deve gerar energia suficiente para permitir a formação de um estado eletronicamente excitado;

b) deve existir um caminho de reação pelo qual essa energia possa ser canalizada para a formação de um estado eletronicamente excitado;

c) este deve ser capaz de perder energia na forma de um fóton ou então ser capaz de transferir energia para uma molécula capaz de emitir luz;

Quimiluminescência de ultra-baixa-intensidade foi demonstrada pela primeira vez em 1961 por Tarusov para fígado de rato, desde então uma variedade de órgãos intactos, tecidos, células isoladas de vertebrados, invertebrados ou plantas tem mostrado esta propriedade (71). Uma atenção especial tem sido dada a quimiluminescência nativa que acompanha a ativação de fagócitos (neutrófilos, eosinófilos e macrófagos). Esta quimiluminescência é decorrente da ativação do sistema NADPH oxidase que possibilita a formação ERO por diferentes meios.

Os produtos da redução de oxigênio podem levar à oxigenação de substratos biológicos, levando a formação de estados eletronicamente excitados e consequentemente originar a baixa emissão de luz observada nestes processos (74). Esta quimiluminescência nativa tem sido aplicada como uma técnica para o estudo das funções fagocíticas e diagnóstico de algumas doenças.

A introdução de um substrato quimiluminescente a um sistema teste de fagócitos aumenta em várias ordens de grandeza o rendimento de luminescência facilitando a monitoração da atividade de oxigenação destas células. As características de reação do substrato quimiluminescente também definem a natureza do agente oxidante a ser avaliado. Luminol, isoluminol e lucigenina são utilizados como substratos destas reações.

5. Objetivos

O objetivo inicial deste estudo foi acompanhar a quimiluminescência originada a partir da oxidação de vários compostos indólicos, em pH fisiológico, catalisadas por HRP/H₂O₂. A partir destes resultados foram avaliados a oxidação de 2-metilindol e melatonina por HRP/H₂O₂ e por neutrófilos ativados.

As reações de oxidação utilizando HRP/H₂O₂ foram utilizadas como modelo para o estudo das reações que ocorreram na presença de neutrófilos ativados.

Nosso interesse centrou-se na melatonina pelo fato da mesma ser um composto biologicamente ativo. Desse modo nossos objetivos principais foram:

- estudar a possibilidade de MPO catalisar a oxidação de melatonina e,
- avaliar se a oxidação de melatonina ocorre durante a ativação de neutrófilos.

6. Material e Métodos

6.1. Material

6.1.1. Reagentes

Todos os reagentes a seguir são de grau analítico:

-catalase (EC 1.11.1.6, de fígado bovino), SOD (EC 1.15.1.1, de eritrócitos bovino), HRP (EC 1.11.1.7, tipo IV), MPO (EC 1.11.1.7, de leucócitos humanos), ácido úrico, Histopaque^R (densidade = 1077), dextran, dimetil sulfóxido (DMSO), PMA, zimosan, glicose, indol, 2-metilindol, 3-metilindol, 5-metilindol, 5-metóxindol, 6-metóxindol, 7-metóxindol, triptofano, melatonina, serotonina, 5-metoxitriptamina, ácido 2-(indol-3-il)acético, ácido 3-(indol-3-il)propiónico, ácido 4-(indol-3-il)butírico e 5-metóxindol ácido 2-(indol-3-il)acético foram obtidos da Sigma Chemical Co.;

-azida, fosfato de sódio, fosfato diácido de potássio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, cloreto de sódio, etanol, acetonitrila, tetrahidrofurano (THF) e bicarbonato de sódio foram obtidos da Merck S.A.;

-peróxido de hidrogênio 60% foi obtido da INTEROX;

-heparina foi obtida da Roche;

-luminol foi obtido da Aldrich Chem. Co.;

-a água utilizada foi deionizada em equipamento MilliQ (Millipore).

6.1.2. Equipamentos

-Para o preparo das soluções estoques foram utilizados uma balança analítica AG204 Mettler Toledo, um pH-metro micronal B374 e um espectrofotômetro Hitachi U-2000;

-Para isolamento de neutrófilos usou-se centrífuga de bancada, Incibrás, Modelo PIN IV, rotor swing;

-Para o preparo de zimosan foram utilizados um Ultrasom Cole-Parmer 8853 e uma Centrifuga Refrigerada himac CR 20B2 Hitachi, rotor RPR20-2;

-Medidas de quimiluminescência foram acompanhadas em um luminômetro adaptado para leitura em microplaca (EG&G Berthold LB96V microplate Luminometer) ou em um sistema contador de fótons composto de amplificador-discriminador (EG&G PAR 1121A) e fotomultiplicadora (Thorn EMI 9658AM) refrigerada a -12°C por um termorefrigerador elétrico (Thorn EMI FACT-50 MKIII thermoelectric cooler). Este aparelho também foi utilizado para obtenção do espectro de quimiluminescência da oxidação da melatonina (através de filtros de corte colocados em frente da fotomultiplicadora);

-Medidas de consumo de oxigênio foram acompanhadas em um Yellow Spring Instruments, modelo 5300, constituído basicamente de uma unidade eletrônica que fornece a voltagem polarizadora, um eletrodo do tipo Clark, e uma câmara de reação ajustável a um recipiente de termostatização e agitação magnética;

-A formação de produtos de oxidação da reação e o espectro de fluorescência foram monitorados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC, *high performance liquid chromatography*) SHIMADZU LC-10A com detectores UV-VIS SPD-10A e Fluorescência RF535, utilizando coluna de fase reversa SUPERCOSIL LC-18 (25cm x 4,6mm, 5 μm) e coluna de fase reversa Sílica ZORBAZ (25cm x 4,6mm, 5 μm P.N.880952.701), operando em modo isocrático;

-Os espectros de massa foram obtidos a 70 mV em um aparelho de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS, *Cromatography gaseous mass spectrometry*) Hewlett Packard;

-As amostras foram concentradas em Sped Vac Plus, modelo SC210A, marca Savant.

6.2. Métodos

6.2.1. Preparo de Reagentes

Quando não especificado, os ensaios foram realizados com os reagentes nas concentrações abaixo, em tampão fosfato pH 7,4 a 37°C. A concentração final dos reagentes será indicada nos resultados.

-Soro foi obtido a partir de doadores voluntários, do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo;

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

-Solução estoque de PMA foi solubilizada em DMSO (100µm/mL) e estocada a -20°C. Zimosan foi preparado por dissolução de 10mg/mL em PBS, seguido de sonicação, centrifugação e após estocado a -20°C. Alíquotas da solução estoque de zimosan foram opsonizadas por incubação com soro fresco sob agitação por 60 minutos a 37°C;

-Foram preparadas soluções estoque, em solução aquosa, de mieloperoxidase pela diluição de 5 unidades em 300µL de PBS, SOD e catalase 1mg/mL de salina, CaCl₂ 100mM, MgCl₂ 50mM, glicose 100µM, NaCl 0,9 e 2,7 %, azida 1mM, ácido úrico 1mM, HRP 10µM, e H₂O₂ 50mM. Os derivados indólicos 10mM foram preparados em solução etanólica 30%. Solução estoque de luminol 1mM foi obtida pela dissolução deste em água; a adição de NaOH foi necessária para solubilização.

6.2.2. Isolamento de Neutrófilo

Neutrófilos de sangue periférico foram obtidos a partir de doadores voluntários aparentemente saudáveis, recrutados entre os professores, funcionários e alunos do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. O sangue foi colhido em tubos plásticos heparinizados (10U/mL), e

posteriormente diluído na proporção 1:1 com PBS 10mM, pH 7,4, filtrado em millipore de poro 0,22 μ m. A diluição foi colocada sobre 10mL de Histopaque^R (densidade = 1077) (75). O material foi centrifugado a 500 g à temperatura ambiente por 20 minutos em centrífuga de bancada, ao infranadante foram adicionados 15mL de Dextran 5%, diluído em solução salina 0,9% estéril para sedimentação de eritrócitos. O material foi mantido em banho de gelo (com inclinação de 45°) por 45 minutos, sendo o sobrenadante recolhido (volume completado para 30mL com PBS 10mM) e centrifugado a 500 g à temperatura ambiente por 5 minutos em centrífuga de bancada. O sobrenadante foi descartado e o infranadante submetido a hemólise em 10mL de água gelada (0°C – destilada e filtrada em filtro millipore de poro 0,22 μ m) com agitação constante por um minuto. A isotonicidade foi restabelecida com 5mL de NaCl 2,7% (filtrado em millipore de poro 0,22 μ m) (76) e 15mL de PBS 10mM estéril. O material foi centrifugado em 500 g à temperatura ambiente por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o infranadante ressuspenso em 1mL de PBS 10mM. A contagem de células totais foi realizada em câmara de Neubauer.

6.2.3. Consumo de Oxigênio

Os ensaios envolvendo detecção e acompanhamento da cinética do consumo de oxigênio foram obtidos com o auxílio de um oxígrafo, através de reações num volume final de 3,0mL, sob agitação constante (controle do equipamento). A não ser quando especificado a reação foi iniciada pela adição de HRP.

6.2.4. Medidas de Emissão de Luz

Os valores de intensidade de quimiluminescência em função do tempo para reações enzimáticas foram obtidas com o auxílio de um luminômetro, através de reações num volume final de 300 μ L. Os parâmetros temperatura, tempo de reação e adição de reagentes são pré-estabelecidos. A não ser

quando especificado a reação foi iniciada pela adição de HRP. Foram usadas microplacas brancas ao invés de pretas, pois as pretas inibem a reflexão da luz. As figuras apresentadas nos resultados são exemplos representativos das cinéticas encontrados na oxidação destes dois compostos. Ensaio utilizando neutrófilos podem apresentar variações na intensidade máxima de luz e na cinética das reações, devido aos mesmos serem obtidos de vários doadores e ao tempo decorrido entre os ensaios.

6.2.5. Isolamento e Identificação de Produto

A formação de produtos de oxidação da reação foi monitorada por HPLC. As amostras foram obtidas após aproximadamente 2 horas de reação (a sequência de reações e seus controles serão detalhadas nos resultados). Para reações de oxidação do 2-metilindol, alíquotas de 30 μ L foram injetadas em coluna LC-18. As amostras foram eluídas com fluxo de 0,8mL por minuto em fase móvel de acetonitrila e água na proporção 2:1, a absorbância foi medida a 254nm e excitação e emissão foram fixadas em 320 e 500nm respectivamente. Para reações de oxidação da melatonina, as amostras foram liofilizadas e ressuspendidas em 100 μ L de acetonitrila e então alíquotas de 30 μ L foram injetadas em coluna sílica. As amostras foram eluídas com fluxo de 0,4mL por minuto em fase móvel de acetonitrila e THF na proporção 1:1, a absorbância foi medida a 254nm e excitação e emissão foram fixadas em 340 e 440nm respectivamente. Padrões de substratos (2-metilindol e melatonina) foram corridos para localizar o tempo de retenção dos produtos formados. O pequeno deslocamento de sinais entre absorbância e fluorescência, é devido a distância entre os detectores.

O espectro de excitação e emissão do produto coletado por HPLC da reação de oxidação da melatonina por HRP/H₂O₂, foi realizado através de HPLC, com detectores de Fluorescência RF535, sendo a excitação e emissão fixas em 340 e 440nm, respectivamente.

A identificação e purificação de cada pico foi confirmada por espectroscopia de massa. Para este ensaio, foi preparada uma reação de

oxidação em grande escala, volume final 100mL, envolvendo: melatonina, H_2O_2 e HRP (preservando-se as mesmas concentrações dos reagentes). Após 3 horas de reação foram adicionados mais 5,0mL de H_2O_2 e 5,0mL de HRP, esta mistura foi mantida *over night* e então liofilizada para concentrar a amostra. A partir desta amostra foi feito o isolamento do produto e sua identidade foi confirmada por CG-MS.

7. Resultados

7.1. Quimiluminescência das Reações de Derivados Indólicos/HRP/H₂O₂ em pH Fisiológico

Em trabalho anterior realizado pelo nosso grupo foi observado que HRP/H₂O₂ era capaz de oxidar vários compostos indólicos, biologicamente ativos ou não, e que esta reação era em alguns casos bastante quimiluminescente (1). Esse estudo foi realizado em meio alcalino e nessas condições também foram feitos ensaios nos quais HRP/H₂O₂ foi substituída por HRP/O₂⁻.

Neste trabalho primeiramente acompanhamos a oxidação de 15 compostos indólicos catalisada por HRP/H₂O₂ em pH fisiológico. No Esquema 9 estão representados as estruturas químicas dos compostos indólicos utilizados. A Figura 1 mostra que apesar da emissão de luz em alguns casos ter sido significativamente reduzida com a diminuição do pH (por exemplo, para o 2-metilindol houve uma redução de aproximadamente 20 vezes), a oxidação do 2-metilindol, a exemplo do que havia sido observado a pH alcalino, se sobressaiu das demais. A oxidação de melatonina não foi grandemente afetada pela variação de pH, mostrando uma emissão de luz equivalente em ambos os pH (dados não apresentados).

Esquema 9-Estrutura química dos compostos indólicos.

Figura 1-Cinética de emissão de luz, da reação de oxidação de vários compostos indólicos (1mM), pelo sistema HRP (1 μ M) / H₂O₂ (5mM) e controles das reações (ausência de HRP ou ausência de H₂O₂, respectivamente C₁ e C₂ em cada gráfico). As condições de reação foram PBS 7mM, pH 7,4, temperatura 37°C e volume final de 300 μ L.

7.2. Oxidação do 2-metilindol por HRP/H₂O₂ (em pH fisiológico) e por Neutrófilos Ativados.

Em relação a oxidação do 2-metilindol, foram feitas tentativas de otimizar as condições de reação, variando-se a concentração de H₂O₂, HRP e de tampão. Foram observadas mudanças na cinética da reação, porém em nenhuma condição foi observada intensidade de luz equivalente àquela obtida em pH alcalino (dados não apresentados).

A emissão de luz do sistema 2-metilindol/HRP/H₂O₂ depende da adição de todos os reagentes. Nenhum dos controles, isto é, 2-metilindol/H₂O₂, 2-metilindol/HRP, e HRP/H₂O₂ emitem luz (Figura 1).

A Figura 2 mostra o cromatograma, em HPLC, da reação. Na reação completa houve a formação de dois produtos, (*N*-(2-formilfenil)acetamida (P1) e 2,2'-dimetil-2,2'-diindoxil (P2), identificados por CG-MS (1)), detectados por UV-VIS e fluorescência e o desaparecimento do 2-metilindol. Nas reações com ausência de um dos componentes, o 2-metilindol não sofreu oxidação, logo não houve formação de produto, sendo o 2-metilindol somente detectado por UV-VIS.

Figura 2-Cromatogramas (HPLC) da reação 2-metilindol (1mM) / HRP (1 μ M) / H₂O₂ (5mM) e seus controles, após aproximadamente 2 horas de reação, utilizando detector UV-VIS e fluorescente. As condições de reação foram PBS 1,75 mM, pH 7,4, temperatura 37°C e volume final de 300 μ L.

Na sequência foi estudado se neutrófilos ativados poderiam substituir HRP/H₂O₂ na oxidação do 2-metilindol. Que os neutrófilos estavam realmente ativados, ou seja, eram capazes de produzir ERO, foi confirmado num experimento em paralelo onde luminol foi utilizado como *probe* quimiluminescente (dados não apresentados).

Para avaliar a capacidade de neutrófilos ativados oxidarem 2-metilindol em substituição ao sistema HRP/H₂O₂, foi preciso diminuir ao máximo a quantidade de etanol presente na solução estoque tanto de 2-metilindol quanto de melatonina (resultados a seguir), pois o mesmo afeta a viabilidade das células. Foram utilizados nos ensaios solução estoque 30% etanólica, que apesar de comprometer parcialmente as células, foi o mínimo volume necessário para a solubilização do 2-metilindol e melatonina.

Foi verificado o efeito da variação do número de neutrófilos sobre a oxidação do 2-metilindol, sendo utilizado PMA como estímulo. Neutrófilos estimulados, na presença de 2-metilindol, originam baixa quimiluminescência, sendo esta dependente do número de células presentes. Para uma variação de 3 vezes no número de neutrófilos (0,25-1,0x10⁶ células/reação), ocorreu um aumento proporcional da intensidade máxima de luz sem alteração da cinética (dados não apresentados). Não há emissão de luz nos controles, neutrófilo/PMA e 2-metilindol/PMA. Neutrófilos não ativados, isto é neutrófilo/2-metilindol, também não originam quimiluminescência (dados não apresentados). O sistema completo possui emissão de luz relativamente longa. A Figura 3 mostra que a emissão de luz é marcadamente diminuída pela adição de catalase e completamente abolida por SOD.

Figura 3-Efeito de catalase e SOD (0,01 mg/reação) sobre a quimiluminescência do sistema 2-metilindol (1mM) / neutrófilo ($1,0 \times 10^6$ células/reação) / PMA (16ng/reação). As condições de reação foram PBS 1,75 mM, pH 7,4, temperatura 37°C e volume final de 300 μ L.

A formação de produto da reação 2-metilindol/neutrófilo/PMA também foi acompanhada por HPLC e mostra claramente que dentre os produtos formados por neutrófilos ativados estão aqueles observados para o sistema HRP/ H_2O_2 apresentados na Figura 2. Na Figura 4 são apresentados os cromatogramas da reação completa (2-metilindol/neutrófilo/PMA), onde houve a formação dos dois produtos anteriormente mostrados (P1 e P2), detectados por UV-VIS e fluorescência e 2-metilindol detectado somente por UV-VIS, (neste sistema não houve oxidação de todo o 2-metilindol). Os tempos de retenção foram iguais ao do sistema HRP/ H_2O_2 . Nas reações com adição de SOD e catalase observa-se a diminuição da quantidade do produto formado (P2), sendo este efeito melhor visualizado com o detector de fluorescência. Os cromatogramas também apontam para a formação de um produto adicional não identificado de tempo de retenção de aproximadamente 6 minutos e que não apresenta fluorescência.

Figura 4-Cromatogramas (HPLC) da reação 2-metilindol / neutrófilo / PMA após aproximadamente 2 horas de reação, com SOD e catalase, utilizando detector UV-VIS e fluorescente. As condições de reação foram as mesmas descritas na Figura 3.

7.3. Oxidação da Melatonina por HRP/H₂O₂, (em pH fisiológico), por MPO/H₂O₂, e por Neutrófilos Ativados

Melatonina é oxidada por HRP/H₂O₂ numa reação que consome oxigênio e emite luz. O consumo de oxigênio, mostrado na Tabela 1, foi estimado pela diferença entre o oxigênio produzido pelo sistema HRP/H₂O₂ e o oxigênio consumido pelo sistema melatonina/HRP/H₂O₂, considerando que em solução aquosa o O₂ está presente na concentração de $2,0 \times 10^{-4}$ M. A produção de oxigênio na reação entre HRP e altas concentrações de H₂O₂ já era esperada e foi anteriormente descrito (77). O controle melatonina/H₂O₂ não consome nem produz oxigênio. A emissão de luz em tampão fisiológico, mostrada na Figura 5, tem longa duração e depende da adição de todos os reagentes. Nenhum dos controles, isto é, melatonina/H₂O₂, melatonina/HRP e HRP/H₂O₂, produzem emissão de luz. A adição de SOD (5µg/reação) inibe parcialmente a emissão de luz (aproximadamente $36 \pm 9\%$). Aumento em 10 vezes na concentração de SOD não resultou em maior inibição, tanto na emissão de luz quanto no produto formado (dados não apresentados).

Tabela 1 - Consumo de oxigênio da reação melatonina (1 mmol/L) / HRP (1µmol/L) / H₂O₂ (0,5 mmol/L)

Tempo de reação (minutes)	Consumo de Oxigênio (mmol/L)
0	0
5	0,06
10	0,09
20	0,13
30	0,16

Figura 5-Cinética de emissão de luz da reação melatonina (1mM) / HRP (1 μ M) / H₂O₂ (0,5mM). O efeito da adição de SOD (5 μ g/reação) e controle da reação são mostrados. As condições de reação foram PBS 1,75 mM, pH 7,4, temperatura 37°C e volume final de 300 μ L.

A Tabela 2 mostra o efeito de filtros de corte sobre a emissão de luz. Apesar de grosseira a utilização destes filtros permite estimar a distribuição espectral da luz emitida. A região espectral da quimiluminescência do sistema acima se concentra na região entre 440-540 nm.

Tabela 2. Porcentagem de corte observada pelo uso de filtros de corte durante a reação melatonina (1mM) / HRP (1 μ M) / H₂O₂ (5mM).

Filtro de Corte (região em nanômetros onde há 50% de corte)	Emissão (%)
370	100
400	100
440	84
480	57
540	3
600	1

A Figura 6 mostra o cromatograma (HPLC) obtido a partir da reação melatonina/HRP/H₂O₂. Observou-se que a melatonina (M) é detectada por UV-VIS mas não por fluorescência, enquanto na reação com presença de HRP/H₂O₂, melatonina é completamente consumida e aparece um novo pico (K) com tempo de retenção maior e fluorescente.

Figura 6-Cromatograma (HPLC) da melatonina e da mistura de reação melatonina (1mM) / HRP (1 μ M) / H₂O₂ (5mM), após aproximadamente 2 horas de reação, utilizando detector UV-VIS e fluorescente. As condições de reação foram PBS 1,75 mM, pH 7,4, temperatura 37°C e volume final 300 μ L.

Os espectros de excitação e emissão do produto da reação melatonina/HRP/H₂O₂ identificado e coletado por HPLC são apresentados na Figura 7. Estes espectros possuem excitação e emissão próximas à descrita por Fuhrberg & Hardland (78) para a *N*¹-acetil-*N*²-formil-5-metoxiquinuramina.

Figura 7-Espectros de excitação e emissão do produto isolado por HPLC da reação melatonina (1mM) / HRP (1uM) / H₂O₂ (5mM).

A partir do isolamento deste produto, (Figura 7) sua identidade foi confirmada por CG-MS. A Figura 8 mostra o espectro de massa do produto formado, *N*¹-acetil-*N*²-formil-5-metoxiquinuramina, (MS (m/z): 264(7), 176(69), 160(100)B, 150(24), 117(13), 232(20), 192(19), 173(94),145(25)), o qual é o esperado a partir da decomposição de um intermediário do tipo dioxetano. O Esquema 10 mostra a estrutura dos compostos citados.

Figura 8-Espectro de massa do produto resultante da abertura de anel da melatonina (*N*¹-acetil-*N*²-formil-5-metoxiquinuramina).

Esquema 10-Estrutura da melatonina e do produto formado após sua oxidação.

A Figura 9 mostra que a intensidade de emissão de luz e a cinética da reação melatonina/HRP/H₂O₂ são grandemente dependentes da concentração de H₂O₂ em um intervalo de variação de 0,016 a 5,0mM. Em baixas concentrações de H₂O₂ a reação melatonina/HRP/H₂O₂ apresenta uma cinética curta porém com emissão de luz intensa, enquanto em altas concentrações a cinética é mais longa e a intensidade de luz é menor. Em todos os casos a cinética quimiluminescente é marcada por uma queda abrupta. Reações com baixas concentrações de H₂O₂ (0,016-0,1mM), a emissão de luz pode ser parcialmente restabelecida pela readição de H₂O₂ (e não de HRP ou melatonina, dados não apresentados), enquanto reações com concentrações de H₂O₂ maior que 1mM a emissão de luz pode ser

parcialmente restabelecida pela readição de HRP (e não de H_2O_2 ou melatonina, dados não apresentados).

Figura 9-Efeito da concentração de H_2O_2 sobre a emissão de luz do sistema melatonina (1mM) / HRP (1 μM) / H_2O_2 . As condições de reação foram PBS 1,75 mM, pH 7,4, temperatura 37°C e volume final de 300 μL . Nas concentrações mais baixas de H_2O_2 a cinética foi rápida e portanto para efeito de melhor visualização estas cinéticas foram colocadas como figura inserida.

Um efeito dependente de H_2O_2 sobre a quimiluminescência também foi observado em uma série de experimentos feitos com MPO comercial purificada. A Figura 10 apresenta o efeito da concentração de H_2O_2 sobre o sistema melatonina/MPO. Concentrações mais altas de H_2O_2 parecem inibir MPO.

Figura 10-Efeito da concentração de H_2O_2 sobre a quimiluminescência do sistema melatonina (1mM) / H_2O_2 / MPO (0,3 unidades/reação). As condições de reação foram PBS 1,75 mM, pH 7,4, temperatura 37°C e volume final de 300 μ L. Nas concentrações mais baixas de H_2O_2 a cinética foi rápida e portanto para efeito de melhor visualização estas cinéticas foram colocadas como figura inserida.

Na sequência foi verificada a capacidade de MPO presente em neutrófilos ativados oxidar melatonina. Neutrófilos ativados com PMA ou zimosan opsonizado (ZO), geram uma grande quantidade de ERO, que podem ser usadas na oxidação de melatonina catalisada por MPO. Neutrófilos ativados na presença de melatonina originam quimiluminescência significativa, enquanto os não ativados não originam quimiluminescência. Para ambos os estímulos testados a quimiluminescência depende do número de neutrófilos presentes ($0,25 - 1,0 \times 10^6$ células/reação), onde o aumento de células acarreta aumento tanto da intensidade máxima de luz, quanto da área (dados não apresentados). A Figura 11 mostra que

dependendo do estímulo, PMA ou ZO, observa-se como esperado, variações na cinética. Este perfil parece manter uma similaridade com aquele usualmente observado quando o *burst* oxidativo é acompanhado na presença de luminol. A Figura 12 e a Tabela 3 mostram que a quimiluminescência observada é marcadamente diminuída pela adição de SOD e azida (inibidor específico de MPO) e não é afetada por catalase e ácido úrico.

Figura 11- Cinética de emissão de luz durante a reação de melatonina (1mM) / neutrófilos ativados ($1,0 \times 10^6$ células/reação). Os neutrófilos foram estimulados com PMA (16ng/reação) ou ZO ($1,0 \times 10^7$ partículas/reação). As condições de reação foram PBS 1,75 mM, pH 7,4, temperatura 37°C e volume final de 300 μ L.

Figura 12-Cinéticas de emissão de luz da reação melatonina (1mM) / neutrófilo (1,0x10⁶ células/reação) / ZO (1,0x10⁷ partículas/reação) na presença de SOD e catalase (0,01mg/reação), azida e ácido úrico (1mM). As condições de reação foram PBS 1,75 mM, pH 7,4, temperatura 37°C e volume final de 300 µL.

Tabela 3 Efeito de sequestradores de ERO sobre a quimiluminescência de neutrófilos ativados com zimosan opsonizado em presença de melatonina. Os dados referem-se a médias $\pm$ desvio padrão para n experimentos. *P[0,001.

Reações	Controle de Quimiluminescência (%)	n
Sistema completo (melatonina/PMN/ZO)	100	15
Ausência de neutrófilos	11 $\pm$ 3	3
Ausência de zimosan opsonizado	3 $\pm$ 1	7
Ausência de melatonina (1mM)	10 $\pm$ 2	3
Adição de catalase (10 μ g/reação)	94 $\pm$ 1	11
Adição de SOD (10 μ g/reção)	15 $\pm$ 5*	11
Adição de azida (1mM)	7 $\pm$ 2*	11
Adição de ácido úrico (1mM)	99 $\pm$ 18	9

O efeito da adição de catalase, SOD, azida e HRP sobre a formação de produto da reação melatonina/neutrófilos/ZO também foi acompanhada. A Figura 13 mostra que o produto formado (K), por melatonina/neutrófilos ativados tem o mesmo tempo de retenção e características espectrais daquele observado para o sistema melatonina/HRP/H₂O₂ (Figura 6). Esta evidência de que o produto formado por neutrófilos ativados é o mesmo do sistema HRP/H₂O₂, foi checada em experimentos paralelos, onde HRP foi adicionadas ao sistema melatonina/neutrófilos ativados. Melatonina é somente parcialmente consumida (aproximadamente 20%). Observa-se que SOD inibiu parcialmente a formação de produto enquanto azida aboliu quase totalmente a formação de produto (K).

Figura 13-Cromatograma (HPLC) da mistura de reação melatonina (1mM) / neutrófilo ($1,0 \times 10^6$ células/reação) / ZO ($1,0 \times 10^7$ partículas/reação) com catalase e SOD (0,01mg/reação), azida (1mM) e HRP (1 μ M), após aproximadamente 2 horas de reação, utilizando detector UV-VIS e fluorescente. As condições de reação foram PBS 1,75 mM, pH 7,4, temperatura 37°C e volume final de 300 μ L.

8. Discussão

Observou-se uma grande variação na intensidade e cinética da emissão de luz em função dos substituintes no núcleo indólico, (compostos com a posição 2 ocupada com radical metila e posição 3 livre apresentaram maior emissão de luz). Este comportamento foi semelhante àquele ocorrido em meio alcalino (1). Dos 15 derivados indólicos estudados, destacou-se a emissão obtida da oxidação do 2-metilindol (Figura 1).

Para a oxidação do 2-metilindol por HRP/H₂O₂ a pH alcalino foi proposta a formação de dois produtos principais *N*-(2-formilfenil)acetamida (P1) e 2,2'-dimetil-2,2'-diindoxil (P2), identificados por CG-MS (1). A alta eficiência de quimiluminescência neste caso estaria associada a formação do 2,2'-dimetil-2,2'-diindoxil. Este produto poderia ser um sensibilizador endógeno do sistema, uma vez que o espectro de quimiluminescência coincide com o espectro de fluorescência de P2 (1). Em pH fisiológico observa-se também a formação de dois produtos com tempos de retenção iguais aos formados em pH alcalino, porém ocorre uma diminuição na relação P2/P1, ou seja, a pH fisiológico ocorre maior formação relativa de P1 (Figura 2). Isto explicaria a menor emissão de luz obtida na oxidação do 2-metilindol a pH fisiológico. Portanto o pH exerce grande influência sobre a oxidação do 2-metilindol, modificando a intensidade de quimiluminescência e tempo de reação. Os demais derivados indólicos testados apresentaram baixa emissão de luz. O papel da HRP como catalisador da oxidação destes indóis pode ser assegurado pela ausência de emissão de luz na ausência da enzima e pela capacidade da mesma em clivar o anel indólico do 2-metilindol formando *N*-(2-formilfenil)acetamida (P1).

Uma reação com as mesmas características da catalisada por HRP/H₂O₂ pôde ser observada para a oxidação de 2-metilindol por mieloperoxidase presente em neutrófilos (Figura 3). Neutrófilos além de possuírem mieloperoxidase, são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio quando ativadas por estímulos clássicos como PMA e zimosan

opsonizado. Ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e peroxinitrito são algumas destas espécies (41).

Alguns aspectos da oxidação de melatonina catalisada pelas enzimas HRP ou MPO mais H_2O_2 em pH fisiológico foram estudados no sentido de fornecer um paralelo para o estudo da oxidação de melatonina em neutrófilos. Durante a oxidação de melatonina foi mostrado que o principal produto formado é a N^1 -acetil- N^2 -formil-5-metoxiquinuramina (Figura 8) e que o espectro de emissão da reação pode coincidir com o espectro de emissão desta quinuramina excitada (Tabela 2 e Figura 7).

Durante esta reação ocorre consumo de oxigênio (Tabela 1) e pode se observar quimiluminescência. A rota de formação de N^1 -acetil- N^2 -formil-5-metoxiquinuramina pode incluir radical melatonil, que pode ser formado pelo ciclo envolvendo enzima nativa/ composto I/ composto II, contudo a eventual participação de composto III não pode ser excluída. É possível que diversas vias estejam presentes para formar composto III (69), tais como reação de composto II com excesso de H_2O_2 (reação 18), reação direta da enzima na forma nativa com ânion superóxido (reação 19) ou através de um caminho especial envolvendo a formação de HRP ferrosa e sua posterior reação com oxigênio (reação 20).

Composto III de MPO pode ser formado por caminhos similares (79, 80), além de se esperar que a oxidação de melatonina catalizada por MPO tenha as mesmas características daquelas encontradas para HRP

Embora a intensidade de emissão de luz observada durante a oxidação de melatonina por HRP/ H_2O_2 (Figura 5) seja insuficiente para permitir o correto assinalamento da espécie emissiva, o produto excitado N^1 -acetil- N^2 -formil-5-metoxiquinuramina é um forte candidato. Uma outra rota quimiluminescente que pode ser considerada é a reação da melatonina

radical com ânion superóxido (ou peroxidase composto III) em um caminho similar àquele proposto para a quimiluminescência originada durante a oxidação de tirosina por peroxidase (81). O potencial redox da maioria dos radicais indóis/compostos indólicos é suficientemente alto (1.09-1.48) (82) para permitir a abstração de um elétron do O_2^- com a formação de melatonina excitada (reações 21 e 22).

A intensidade de quimiluminescência da reação melatonina/HRP/ H_2O_2 é grandemente dependente de H_2O_2 ou MPO (Figuras 9 e 10). Em altas concentrações de H_2O_2 ocorre inibição da enzima HRP e a emissão de luz é menor. Em baixas concentrações a quimiluminescência é marcada por uma queda abrupta devido a falta de H_2O_2 . Oxidação de melatonina com formação de *N*¹-acetil-*N*²-formil-5-metoxiquinuramina e quimiluminescência também foi observada quando melatonina foi incubada com neutrófilos estimulados com PMA ou ZO.

Melatonina é uma molécula sincronizadora dos ritmos circadianos em mamíferos e atua sobre uma série de tipos celulares modificando funções celulares específicas (83). Melatonina também parece influenciar o sistema imune de diversas formas (18-21). Em monócitos, a melatonina induz a secreção de IL-1, IL-6 e IL-10, ativa a formação de intermediários reativos de oxigênio e a citotoxicidade contra células tumorais (17).

A maior inibição da formação do produto e quimiluminescência da oxidação de melatonina por neutrófilos ativados foi observada em presença de azida, esta é uma forte evidência da participação de MPO no processo. MPO, neste caso, pode estar atuando como a enzima ativa que catalisa a oxidação de melatonina ou como fonte geradora de espécies oxidantes necessárias para a reação.

Pode-se analisar o efeito de SOD, catalase e ácido úrico sobre a oxidação de melatonina por neutrófilos ativados como uma alta evidência para excluir a participação de H_2O_2 e ONOO^- , porém não a participação de O_2^- no processo quimiluminescente (Figura 12 e Tabela 3). Embora sabe-se que ONOO^- é formado em neutrófilos durante o *burst* oxidativo (84) e seja capaz de oxidar melatonina (20, 21), o envolvimento desta espécie nas reações descritas parece improvável devido a não inibição da emissão de luz no sistema com adição de ácido úrico (Figura 12 e Tabela 3). Outras possíveis espécies oxidantes candidatas para a oxidação de melatonina são $\cdot\text{OH}$ e HOCl . Oxigênio singlete produzido pelas reações entre OCI^- com H_2O_2 (85) também foi considerado. Embora melatonina reaja eficientemente com $\cdot\text{OH}$ (19), este não é produzido em quantidades suficientes por neutrófilos (86). Além disso $\cdot\text{OH}$ é originado a partir de reações envolvendo H_2O_2 ou passos dependentes de H_2O_2 , logo inibição por catalase deveria ter sido observada. O mesmo raciocínio pode ser aplicado para eliminar a participação de HOCl e $^1\text{O}_2$ na oxidação de melatonina. Uma vez que a única ERO que parece estar participando da oxidação de melatonina é O_2^- , o papel de MPO no processo deve ser a de catalisador. A idéia de que, em neutrófilos, MPO possa estar catalisando reações até então desconhecidas para estas células foi considerada por Kettle & Winterbourn, 1994 (55).

Embora este trabalho não tivesse pretensão de estudar o ciclo de peroxidase na oxidação de melatonina, algumas considerações devem ser feitas. A forma ativa de composto I de MPO pode ser formada pela reação de MPO férrica com H_2O_2 ou mais eficientemente com ONOO^- (87) (reações 23 e 24). Contudo a participação destas espécies podem ser rejeitadas uma vez que catalase e ácido úrico não afetam a reação.

A possível formação de composto I oriunda da reação de composto III mais O_2^- (86) (reação 25), pode estar possibilitando um ciclo catalítico envolvendo composto I/composto II sem a participação de H_2O_2 ou $ONOO^-$.

Como proposta durante a oxidação química de indóis com diferentes espécies oxidantes (88-90), poderia ser formado o radical melatonil. Este radical poderia reagir com oxigênio molecular ou ânion superóxido para originar o produto de clivagem de anel indólico. Uma explicação para o forte efeito da inibição de SOD sobre a quimiluminescência observada durante a reação de melatonina com neutrófilos ativados (Figura 12) mas não por HRP/ H_2O_2 (Figura 5), é que ambas as rotas poderiam ser usadas (Esquema 11), contudo neutrófilos consomem alta quantidade de oxigênio durante a ativação, logo somente a rota usando O_2^- seria possível.

Por outro lado uma consideração interessante a ser feita é que MPO composto III pode, em princípio, ser a forma catalítica ativa que atua na oxidação de melatonina. Esta sugestão é suportada pela similaridade existente entre Composto III com a forma cataliticamente ativa da indolamina 2,3 dioxigenase (55), que é uma das enzimas responsáveis pelo catabolismo de indóis via a formação de um produto de abertura de anel (91). Na verdade é conhecido que composto III é a forma predominante de MPO durante a fagocitose (79). Neste caso, não se esperaria a formação de um cátion radical do substrato mas sim a adição de oxigênio a partir da reação do composto III com melatonina.

Esquema 11-Possível mecanismo para oxidação de melatonina catalizada por HRP e MPO.

Nas condições ensaiadas com neutrófilos, melatonina é somente parcialmente consumida (20%). Considerando-se que neutrófilos tem abundância de MPO, é razoável supor que a reação é limitada pela quantidade de ERO formada durante o *burst* oxidativo, sendo que é conhecido que a quantidade de O_2^- pode chegar a 15 fmol/cell/min (92).

Embora a concentração de melatonina usada nos ensaios seja muito maior do que os níveis plasmáticos fisiológicos encontrados (12), a possibilidade de que a oxidação de melatonina ocorra *in vivo* deve ser considerada. Apesar de durante muito tempo ter sido considerado que o hormônio melatonina era exclusivamente sintetizado pela glândula pineal, estudos mais recentes apontam para a síntese extrapineal de melatonina (93). Assim, células da linhagem monocítica têm toda a bateria necessária para a síntese deste hormônio (93) e altas concentrações deste foram relatadas por exemplo em medula óssea (94). Uma vez que melatonina é um hormônio lipofílico pode se esperar sua rápida difusão pela membrana plasmática de células presentes no foco inflamatório. Assim melatonina poderia ter um papel em processos inflamatórios.

Um ponto importante a ser considerado é que durante o processo inflamatório, neutrófilos são *primed* por citocinas e outros fatores pro-

inflamatórios, resultando num aumento na produção de ERO por estas células (95). Assim, é razoável supor que a oxidação de melatonina possa ocorrer *in vivo*, especialmente em condições de ativação de neutrófilos.

Devido a possível alta concentração de melatonina em alguns tecidos pode-se imaginar que além de uma função hormonal clássica, isto é, ligação com receptores de membrana e desencadeamento de processos de sinalização celular que originam as respostas esperadas para o hormônio melatonina, uma função adicional poderia ser esperada para este composto. Vários trabalhos mostraram que melatonina reage com $\cdot\text{OH}$ (22), ONOO^- (23, 24) e possivelmente outras ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN). Esta alta reatividade frente as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio tem servido como suporte para a proposta de que melatonina atuaria como um sequestrador de radicais livres *in vivo* (25, 26). Não pode ser negligenciado ainda que a quinuramina formada pela oxidação de melatonina também tenha uma atividade biológica definida. Neste sentido como passos futuros pretendemos avaliar o possível papel biológico da oxidação da melatonina por neutrófilos ativados.

9. Conclusões

-Melatonina é oxidada por neutrófilos ativados;

-Esta oxidação foi confirmada através da identificação do produto formado *N*¹-acetil-*N*²-formil-5-metoxiquinuramina por CG-MS;

-A proposta de que MPO e O₂⁻ participam na oxidação de melatonina em neutrófilos ativados corrobora para a idéia que MPO tem uma ação biológica mais extensa do que se supõe hoje em dia;

-Embora o assinalamento correto da espécie eletronicamente excitada formada durante a oxidação de melatonina não pôde ser definida, não existe dúvida que um estado excitado é formado. Isto é relevante se pensarmos que esta espécie excitada pode estar tendo um papel nas ações descritas para melatonina. Este é o espírito da proposta feita por Cilento e colaboradores, que é a possibilidade de que estados excitados sejam formados *in vivo* podendo ser capazes de modular algumas respostas biológicas (96, 97);

-Adicionalmente, também é relevante a possibilidade de a quimiluminescência observada seja decorrente de uma reação onde há a participação de ânion superóxido. Este fato poderia ser explorado em relação ao desenvolvimento de um método que possa detectar especificamente a formação de ânion superóxido durante o *burst* oxidativo;

-Talvez melatonina exerça um papel relevante na função de neutrófilos, tal como no *killing*, produção de citocinas e no próprio *burst* oxidativo através de produtos do tipo quinuramina. Todos estes itens estão sendo considerados para estudos futuros.

10. Referências Bibliográficas

- 1 Ximenes, V. F., Campa, A. and Catalani L. H. Oxidation of indole compounds catalized by horseradish peroxidase. *Arch. Biochim. Biophys.* no prelo.
- 2 Spiro, T. G. (1980). Metal ion activation of dioxygen. pp 144-145.
- 3 Nakamura, H., and Goto, T. (1979). Studies on aminodioxetanes as a model of bioluminescence intermediates -1-(1-methyl-3-indolyl) 6-phenyl-2,3,7,8-tetraoxabicyclo[4,2,0] octane, an aminodioxetane resulting in efficient ultraviolet and exciplex chemiluminescence. *Photochem. Photobiol.* **30**, 27-33.
- 4 Nakamura, H., and Goto, T. (1981). Cypridina bioluminescence. *Heterocycles* **15**, 1119-1122.
- 5 Fuhrberg, B., and Hardland, R. (1994). The non-enzymatic cleavage of the pyrrole ring of indoles in Cell Biological Problems in Chronobiology (ed Hardland R) Univ. of Gottingen, pp 75-81.
- 6 Ingraham, L. L., and Meyer, D. L. (1985). Biochemistry of Dioxygen. *Plenum Press NY & London*. pp. 211-246.
- 7 Melo, M. P., Escobar, J. A., Metodiewa, D., Dunford, H. B., and Cilento, G. (1992). Horseradish peroxidase-catalyzed aerobic oxidation of indole-3-acetic acid. II Oxygen uptake and chemiexcitation. *Arch. Biochem. Biophys.* **296**, 34-39.
- 8 Chen, G. N., Lin, E. R., Zhao, Z. F., Duan, J. P., and Zhang, L. (1997). Electrogenerated chemiluminescence for determination of indole and tryptophan. *Anal. Chim. Acta* **341**, 251-256.
- 9 Leeds, J. M., Brown, P. J., McGeehan, G. M., Brown, F. K., and Wiseman, J. S. (1993). Isotope effects and alternative substrate reactivities for tryptophan 2,3-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* **268**, 17781-17786.
- 10 Conn, P. M., and Melmed, S. (1997). Endocrinology: Basic and Clinical Principles. The Pineal Hormone-Melatonin Irina V.

Zhdanova MD and Richard J Wurtman Cap 18 279-290 Humana Press Inc. Totowa, NJ.

- 11 Textbook of Medical Physiology sixth edition, Arthur C Guyton, MD, 1003, 1004.
- 12 Reiter, R. J. (1991). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and its physiological interactions. *Endocr. Rev.* **12**, 151-180.
- 13 Lopez-Gonzalez, M. A., Calvo, J. R., Segura, J. J., and Guerrero, J. M. (1993). Characterization of melatonin binding sites in human peripheral blood neutrophils. *Biotechnol Ther.* **4** :253-262
- 14 Barjavel, M. J., Mamdouh, Z., Raghbate, N., and Bakouche, O. (1998). Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. *J. Immunol.* **160**, 1191-1197.
- 15 Cutolo, M., Villaggio, B., Candido, F., Valenti, S., Ciusti, M., Felli, L., Sulli, A., and Acardo, S. (1999). Melatonin influences interleukin-12 and nitric oxide production by primary cultures of rheumatoid synovial macrophages on THP-1 cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **876**, 246-254.
- 16 Garcia-Maurino, S., Gonzalez-Haba, M. G., Calvo, J. R., Rafii-El-Idrissi, M., Sanchez-Margalet, V., Goberna, R., and Guerrero, J. M. (1997). Melatonin enhances IL-2, IL-6 and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J. Immunol.* **159**, 574-581.
- 17 Morrey, K. M., Mclachlan, J. A., Serkin, C. D., and Bakouche, O. (1994). Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. *J. Immunol.* **153**, 2671-2680.
- 18 Angeli, A., Gatti, G., Sartori, M. L., Del Ponte, D., and Cerignola, R. (1988). Effect of exogenous melatonin on human natural killer (NK) cell activity. An approach to the immunomodulatory role of the pineal gland. In *The pineal gland and cancer*, 145-156 (gupta A, Attanasio A, Reiter RJ, eds) Muller and Bass, Tubingen.

- 19 Caroleo, M. C., Frasca, D., Nistico, G., and Doria, G. (1992). Melatonin as immunomodulator in immunodeficient mouse. *Immunopharmacology* **23**, 81-89.
- 20 Csaba, C., and Barath, P. (1975). Morphological changes of thymus and the thyroid gland after postnatal extirpation of the pineal body. *Endocrinol. Exp.* **9**, 59-67.
- 21 Maestroni, G. J. M., Conti, A., and Pierpaoli, W. (1987). Role of the pineal gland in immunity. II. Melatonin enhances the antibody response via an opiate mechanism. *Clin. Exp. Immunol.* **68**, 384-391.
- 22 Matuszak, Z., Reszka, K. J., and Chignell, C. F. (1997). Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radicals: EPR and spin trapping investigations. *Free Radical Biol. & Med.* **23**, 367-372.
- 23 Zhang, H., Squadrito, G. L., and Pryor, W. A. (1998). The reaction of melatonin with peroxynitrite: formation of melatonin radical cation and absence of stable nitrated products. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**, 83-87.
- 24 Zhang, H., Squadrito, G. L., Uppu, R., and Pryor, W. (1999). Reaction of peroxynitrite with melatonin: a mechanistic study. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 526-534.
- 25 Hardeland, R., Reiter, R. J., Poeggeler, B., and Tan, D. -X. (1993c). The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **17**, 347-357.
- 26 Reiter, R. J., Poeggeler, B., Tan, D. -X., Chen, L. -D., Manchester, L. C., and Guerrero, J. M. (1993). Antioxidant capacity of melatonin: A novel action not requiring a receptor. *Neuroendocrinol. Lett.* **15**, 103-116.
- 27 Haslett, C. (1997). Granulocyte apoptosis and inflammatory disease. *Br. Med. Bull.* **53**, 669-683.
- 28 Weiss, S. J. (1989). Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. med.* **320**, 365-376.

- 29 Moore, P. L., Bank, H. L., Brissie, N. T., and Spicer, S. S. (1978). Phagocytosis of bacteria by polymorphonuclear leukocytes: a freeze-fracture, scanning electron microscope, and thin section investigation of membrane structure. *J. Cell. Biol.* **76**, 158.
- 30 Liu, H. L., and Djeu, J. Y. (1995). Role of cytokines in neutrophil functions. In: Aggarwal, B. B. and Puri, R. K. *Human Cytokines: Their Role in Disease and Therapy* cambridge-Blackwell Science, Inc. 71-86.
- 31 Inoue, K., Minami, Y., Taoka, Y., Ikata, T., and Fukuzawa, K. (1994). Phagocytosis and superoxide generation in human polymorphonuclear leukocytes from synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis, in *Frontiers of Reactive Oxygen in Biology and Medicine* (eds Asaka, K. and Yoshikawa, T.) CRC Press: New York, 459-461.
- 32 Henderson, L. M., Moule, S. K., and Chappell, J. B. (1993). The immediate activator of the NADPH oxidase is arachidonate not phosphorylation. *Fed. Eur. Biochem. Soc., Lett.* **211**, 157-162.
- 33 Babior, B. M. (1988). Protein phosphorylation and the respiratory burst. *Arch. Biochem. biophys.* **264**, 361-367.
- 34 Babior, B. M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood* **93**, 1464-1467.
- 35 Deleo, F. R., and Quinn, M. T. (1996). Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J. Leucoc. Biol.* **60**, 677-691.
- 36 Babior, B. M. (1978). Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N Engl J Med.* **298**, 659-68.
- 37 Babior, B. M., Kipnes, R. S. and Curnutte, J. T. (1973). Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potencial bactericidal agent. *J. Clin. Invest.* **52**, 741-744.
- 38 Hyslop, P. A., Hinshaw, D. B., Scranfstatte, I. U., Cochrane, C. G., Kunz, S. and Vosbeck, K. (1995). Hydrogen peroxide as a potent

- bacteriostatic antibiotic: implications for host defense. *Free Radic Biol Med.* **19**, 31-7.
- 39 Klebanoff, S. J. (1974). Role of the superoxide anion in the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system. *J. Biol. Chem.* **249**, 3724-3727.
 - 40 Rosen, H., and Klebanoff, S. J. (1979). Bactericidal activity of a superoxide anion-generating system. A model for the polymorphonuclear leukocyte. *J. Exp. Med.* **149**, 27-39.
 - 41 Hampton, M. B., Kettle, A. J., and Winterbourn, C. C. (1998). Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. *Blood.* **92**, 3007-3017.
 - 42 Rosen, G. M., Pou, S., Ramos, C. L., Cohen, M. S., and Britigan, B. E. (1995). Free radicals and phagocytic cells. *Faseb J.* **9**, 200-209.
 - 43 Ramos, C. L., Pou, S., Britigan, B. E., Cohen, M. S., and Rosen, G. M. (1992). Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes. *J. Biol. Chem.* **267**, 8307-8312.
 - 44 Wolcott, R. G., Franks, B. S., Hannum, D. M., and Hurst, J. K. (1994). Bactericidal potency of hydroxyl radical in physiological environments. *J. Biol. Chem.* **269**, 9721-9727.
 - 45 Steinberg, M. J., Khan, A U., and Karnovsky, M. J. (1992). Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *J. Biol. Chem.* **267**, 13425-13432.
 - 46 Kettle, A. J., and Winterbourn, C. C. (1997). Myeloperoxidase: a key regulator of neutrophil oxidant production. *Redox Rep.* **3**, 3-8.
 - 47 Klebanoff, S. J. (1968). Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. *J. Bacteriol.* **95**, 2131-2135.
 - 48 Thomas, E. L., and Learn, D. B. (1991). Myeloperoxidase-catalysed oxidation of chloride and other halides: the role of chloramines, in Enverse J., Everse K. E., Grisham M. B. eds. Peroxidases in chemistry and biology., Boca Raton, FL., CRC, 83.

- 49 Grisham, M. B., Jefferson, M. M., Melton, D. F., and Thomas, E. I. (1984). Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils. Ammonia-dependent bactericidal, cytotoxic and cytolytic activities of the chloramines. *J. Biol. Chem.* **259**, 10404-10410.
- 50 Moncada, S., and Higgs, A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* **329**, 2002-2012.
- 51 Hue, R. E., and Padmaja, S. (1993). The reaction of NO with superoxide. *Free Rad. Res. Commun.* **18**, 195-199.
- 52 Beckman, J. S., Beckman T. W., Chen, J., Marshall, P. A., and Freeman, B. A (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 1620-1624.
- 53 Pekoe, G. M., (1987). Measurement Using Luminol-Enhanced Chemiluminescence of an Antioxidant Radical Scavenging Anti-Inflammatory Mechanism for Nonsteroidal Anti-Inflammatory drugs Against Cytotoxic Neutrophil Myeloperoxidase, vol III, (eds. K Van Dyke, V Castranova) CRC Press Inc, Florida, pp168-182.
- 54 Bainton, D. F., Ulliyot, J. L., and Farquhar M. G. (1971). The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J. Exp. Med.* **134**, 907.
- 55 Kettle, A., and Winterbourn, C. C. (1994). Superoxide-dependent hydroxylation by myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* **269**, 17146-177151.
- 56 Klebanoff, S. J.(1991). Myeloperoxidase: Occurrence and Biological Function in Peroxidases in Chemistry and Biology vol. I, (eds. Everse, J., Everse, K. E., Grisham, M. B.), CRC Press, Inc., Florida, pp 1-35.
- 57 Fenna, R., Zeng, J., and Davey, C. (1995). Structure of the green heme in myeloperoxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **316**, 653-656.
- 58 Taylor, K. L., Strobel, F., Yue, K. T., Ram, P., Pohl, J., Woods, A. S., and Kinkade, J. M., Jr (1995). Isolation and identification of a

- protoheme IX derivative released during autolytic cleavage of human myeloperoxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **316**, 635-642.
- 59 Hazen, S. L., Zhang, R., Shen, Z., Wi, W., Podrez, E. A., MacPherson, J. C., Schimitt, D., Mitra, S. N., Mukhopadhyay, C., Chen, Y., Cohen, P. A., Hoff, H. F., and Abu-Sond, H. M. (1999). Formation of nitric oxide-derived oxidants by myeloperoxidase in monocytes. *Cir. Res.* **85**, 950-958.
- 60 Lefkowitz, D. L., Mills, K., Morgan, D., and Lefkowitz, S. S. (1992). Macrophage activation and immunomodulation by myeloperoxidase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **199**, 204-210.
- 61 Campa, A. (1991). Biological Roles of Plant Peroxidases: Known and Potencial Function in Peroxidases in Chemistry and Biology, vol. II, (eds. Everse, J., Everse, K. E., Grisham, M. B.) CRC Press Inc, Florida, pp 25-50.
- 62 Paul, K. G., and Stigbrand, T. (1970). Four isoperoxidase from horseradish roots. *Acta Chem. Scand.* **24**, 3607-3613.
- 63 Welinder, K. G. (1985). Plant peroxidases. Their primary, secondary and tertiary strutures, and relation to cytochrome C peroxidase. *Eur. J. Biochem.* **151**, 497-502.
- 64 Dunford, H. B. (1982). Peroxidases. *Adv. Inorg. Biochem.* **4**, 41-74.
- 65 La Mar, G. N. et al. (1980). Proton nuclear magnetic resonance study of the electronic and molecular structure of the heme crevice in horseradish peroxidase. *J. Biol. Chem.* **255**, 6646-6651.
- 66 Finzel, B. C., Poulos, T. L., and Kraut, J. (1984). Crystal structure of yeast cytochrome C peroxidase refined at 1.7 Å resolution. *J. Biol. Chem.* **259**, 13027-13033.
- 67 Hashimoto, S., Yoshikawa, T., and Kitagawa, T. (1986). Resonance ramam evidence for oxygen exchange between the $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ heme and bulk water during enzymic catalysis of horseradish peroxidase and its relation with the heme-linked ionization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 2417-2424.

- 68 Kuo, C. F., and Fridovich, (1988). I Stimulation of the activity of horseradish peroxidase by nitrogenous compounds. *J. Biol. Chem.* **263**, 3811-3816.
- 69 Dunford, H. B., (1991). Horseradish Peroxidase: Structure and Kinetic Properties in Peroxidases in Chemistry and Biology, vol. II (eds. Everse, J., Everse, KE & Grisham, M. B.), CRC Press Inc, Florida, pp.1-24.
- 70 Atkins, P. W., (1994). Physical Chemistry, 5^a ed., Oxford University Press, Oxford. 597.
- 71 Campbell, A. K. , (1988). Chemiluminescence: Principles and Applications in Biology and Medicine, Ellis Horwood, Chichester.
- 72 Hasting, J. W., and Wilson, T. (1976). Bioluminescence and Chemiluminescence. *Photochem. Photobiol.*, **23**, 461-473.
- 73 Hasting, J. W. Symposium on Energy transformation in Biological Systems, (1975). Elsevier, Amsterdam.
- 74 Allen, R. C. (1984). Analytical Applications of Bioluminescence and chemiluminescence, eds.: Kricka, LJ, Stanley, PE, Thorpe, GHG & Whitehead, TP, Academic Press, London.
- 75 Boyum, A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest*, Oslo, **21**, 77-89.
- 76 Stossel, T. P., Pollard, T. D., Mason, R. J., and Vaughan, M. (1971). Isolation and properties of phagocytic vesicles from polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest.* **50**, 1745-1747.
- 77 Barr, D. P., and Aust, S. D. (1993). On the mechanism of peroxidase-catalyzed oxygen production. *Arch. Biochem. Biophys.* **303** (2):377-82.
- 78 Fuhrberg, B., and Hardland, R. (1994). The non-enzymatic cleavage of the pyrrole ring of indoles in Cell Biological Problems in Chronobiology (R.Hardland, ed) Univ. of Gottingen, Gottingen, 82-88.
- 79 Winterbourn, C. C., Garcia, R. C., and Segal, A. W. (1985). Production of the superoxide adduct of myeloperoxidase compound III by

- stimulated human neutrophils and its reactivity with hydrogen peroxide and chloride. *Biochem. J.* **228**, 583-592.
- 80 Odajima, T., and Yamazaki, I. (1970). Myeloperoxidase of the leukocyte of normal blood. I. Reaction of myeloperoxidase with hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Acta* **206**, 71-77.
- 81 Ushijima, Y., Totsune, H., Nishida, A., and Nakano, M. (1997). Chemiluminescence from human polymorphonuclear leukocytes activated with opsonized zymosan. *Free Radical Biol. & Med.* **22**, 401-409.
- 82 Jovanovic, S. V., Steenken, S. (1992). Substituent effects on the spectral, acid-base, and redox properties of indolyl radicals: a pulse radiolysis study. *J. Phys. Chem.* **96**, 6674-6679.
- 83 Reiter, R. J. (1993). The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* **49**, 654-664.
- 84 Carreras, M. C., Pargament, G. A., Catz, S. D., Poderoso, J. J., and Boveris, A. (1994). Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. *Fed. Eur. Biochem. Soc., Lett.* **341**, 65-68.
- 85 Tatsuzawa, H., Maruyama, T., Hori, K., Sano, Y., and Nakano, M. (1999). Singlet oxygen ($^1\Delta gO_2$) as the principal oxidant in myeloperoxidase-mediated bacterial killing in neutrophil phagosome. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **262**, 647-650.
- 86 Segal, A. W. (1988). The molecular and cellular pathology of chronic granulomatous disease. *Eur. J. Clin. Invest* **18**, 433-443
- 87 Floris, R., Piersma, S. R., Yang, G., Jones, P., and Wever, R. (1993). Interaction of myeloperoxidase with peroxynitrite. A comparison with lactoperoxidase, horseradish peroxidase and catalase. *Eur. J. Biochem.* **215**, 767-775.
- 88 Jovanovic, S. V., and Siimic, M. G. (1985). Repair of tryptophan radicals by antioxidants. *Free Radical Biol. Med.* **1**, 125-129.

- 89 Candeias, L. P., Folkes, L. K., Dennis, M. F., Patel, K. B., Everett, S. A., Stratford, M. R. L., and Wardman, P. (1994). Free-Radical intermediates and stable products in the oxidation of indole-3-acetic acid. *J. Phys. Chem.* **98**, 10131-10137.
- 90 Candeias, L. P., Folkes, L. K., and Wardman, P. (1996). Enhancement of peroxidase induced lipid peroxidation by indole-3-acetic acid. Effect of autoxidants. *Redox Rep.* **2**, 141-147.
- 91 Kobayashi, K., Hayashi, K., and Sono, M. (1989). Effects of tryptophan and pH on the kinetics of superoxide radical binding to indoleamine 2,3 dioxigenase studied by pulse radiolysis. *J. Biol. Chem.* **264**, 15280-15283.
- 92 Jesaitis, A. J., Quinn, M. T., Mukherjee, G., Ward, P. A., and Dratz, E. A. (1991). Death by Oxygen: Radicals Views. The molecular basis of oxidative damage by leukocytes. *New Biol.* **3**, 651-655.
- 93 Finochiaro, L. M. E., Nahmod, V. E., and Launay, J. M. (1991). Melatonin biosynthesis and metabolism in peripheral-blood mononuclear leukocytes. *Biochem. J.* **280**, 727-731.
- 94 Tan, D., Manchester, L. C., Reiter, R. J., Qi, W., Zhang, M., Weintraub, S. T., Cabrera, J., Sainz, R. M., and Mayo, J. C. (1999). Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochim. Biophys Acta* **1472**, 206-214.
- 95 Aggarwal, B. B. and Puri, R. K. (1995). Human Cytokines: Their Role in Disease and Therapy Cap 22 Role of cytokines in oxidative damage-Eric D Whitman, Gerard M Doherty, Gary R Peplinski, Jeffrey Norton 333-351 Blackwell Science, Inc.
- 96 Cilento, G. (1980). Photobiochemistry in the dark. *Photochem. Photobiol Ver.* **5**, 199-228.
- 97 Cilento, G. (1984). Generation of electronically excited triplet species in biochemical system. *Pure Appl. Chem.* **56**, 1179-1190.