UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-graduação em Farmácia

Área de Análises Clínicas

**Modulação da ativação de macrófagos por neutrófilos e pelo
hormônio melatonina e seu produto de oxidação *N*¹-acetil-*N*²-
formil-5-metoxiquinuramina**

MARIA RITA RODRIGUES

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dra. Ana Campa

São Paulo

2004

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-graduação em Farmácia

Área de Análises Clínicas

**Modulação da ativação de macrófagos por neutrófilos e pelo
hormônio melatonina e seu produto de oxidação *N*¹-acetil-*N*²-
formil-5-metoxiquinuramina**

MARIA RITA RODRIGUES

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dra. Ana Campa

São Paulo

2004

DEDALUS - Acervo - CQ

30100010537

Ficha Catalográfica

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

Rodrigues, Maria Rita

R696m Modulação da ativação de macrófagos por neutrófilos e pelo
hormônio melatonina e seu produto de oxidação *N*¹-acetil-*N*²-
formil-5-metoxiquinuramina Maria Rita Rodrigues. -- São
Paulo, 2004.

lv.(Paginação irregular)

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

Orientador: Campa, Ana

1. Bioquímica celular 2. Imunologia celular 3. Inflamação :
Medicina I. T. II. Ana. Campa. orientador.

574.876042 CDD

Maria Rita Rodrigues

Modulação da ativação de macrófagos por neutrófilos e pelo
hormônio melatonina e seu produto de oxidação N^1 -acetil- N^2 -formil-5-
metoxiquinuramina

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Ana Campa
orientador/presidente

Dra. Karina Ramalho Bortoluci Bastos
1°. examinador

Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti
2°. examinador

Dra. Regina Pekelmann Markus
3°. examinador

Dra. Lúgia Ferreira Gomes
4°. examinador

São Paulo, 11 de março de 2005.

*“Não se contente em trilhar um caminho estabelecido. Ao contrário, vá para onde
não há caminho algum e deixe seu rastro.”*

(Muriel Strode)

*Agradeço a **Deus**, que sempre ao meu lado,
ilumina os caminhos certos a percorrer.*

Profª Ana Campa,

minha orientadora, minha amiga e minha “irmã mais velha”, você foi responsável pelo meu crescimento científico, me incentivou, me apoiou, “puxou minha orelha” e me consolou quando foi preciso. Agradeço a oportunidade de ter trabalhado e convivido com você todos estes anos (mas não pense que vai se livrar facilmente de mim). Por tudo isto.... “Muito obrigada”!!!!

Tomaz,
*companheiro de todas as horas,
obrigada pelo amor e dedicação. Seu apoio e seus
“empurrões” foram essenciais para que eu chegasse até aqui.*

Agradecimentos

A toda minha família agradeço pelo amor e apoio de sempre.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao Profº Momtchilo Russo pelas sugestões e discussões que muito contribuíram para este trabalho. Agradeço também pela amizade e confiança.

A Dunia Rodriguez e Karina Bastos pela valiosa colaboração, parceria e principalmente pela amizade.

A Sabrina Okada pela amizade e valiosa ajuda neste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Aos amigos do laboratório: Cristiani Bürger, Sueli de Oliveira, Elaine Hatanaka, Silvana Sandri, Alziana Pedrosa, Valdecir Ximenes, Flávia Mamy, Flávia Garcia, Daniela Grosso e Silene Migliorini, pela amizade e alegre convívio.

A Idelma e Alex pelo amor, cuidado e apoio todos estes anos. Obrigada também pela “casa, comida e roupa lavada”. Agradeço também aos amigos: Mariano, Dedéia, Fátima, Nadir, Maria Alice, Simone e Célia pela amizade e pelos bons momentos.

Às “meninas” da secretaria Sueli, Márcia, Dora e Ana pela inestimável ajuda e amizade.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação pelo auxílio e agradável convívio.

Àqueles que não foram citados nominalmente que, conhecendo ou não sua participação, contribuíram para este trabalho.

Finalmente, a todos os professores, técnicos e funcionários que de alguma maneira estiveram envolvidos neste projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO	3
1.1 FAGÓCITOS MONONUCLEARES	5
1.2 FAGÓCITOS MONONUCLEARES NA INFLAMAÇÃO	6
1.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) E DE NITROGÊNIO (ERN)	8
1.4 HEMEPROTEÍNAS IMPORTANTES NA ATIVIDADE MICROBICIDA DE FAGÓCITOS MONONUCLEARES	12
1.4.1 MIELOPEROXIDASE	12
1.4.2 INDOLEAMINA 2,3- DIOXIGENASE (IDO)	13
1.5 PRODUÇÃO DE CITOCINAS	14
1.5.1 IL-8	15
1.5.2 TNF- α	16
1.5.3 IL-12	17
1.5.4 IFN- γ	18
1.6 MODULAÇÃO DAS FUNÇÕES DE MACRÓFAGOS: EFEITOS DA MELATONINA	20
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
4. CAPÍTULO 1	39
EFEITO DA DEPLEÇÃO DE NEUTRÓFILOS SOBRE A ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS	39
4.1 RESULTADOS	40
4.2 DISCUSSÃO	48
5. CAPÍTULO 2	53
MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE CÉLULAS MONONUCLEARES POR MELATONINA E SEUS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO	53
5.1 RESULTADOS	54

	2
5.2 DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÕES	77
7. BIBLIOGRAFIA	79
ANEXO I	95
APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA FCF-USP	95
ANEXO II	97
TRABALHOS PUBLICADOS NO PERÍODO	97
<ul style="list-style-type: none">- Neutrophils as a Specific Target for Melatonin and Kynuramines: Effects on Cytokine Release. J. Neuroimmunology; 156 (1-2): 146-52 (2004).- Oxidation of melatonin and its catabolites, <i>N</i>¹-acetyl-<i>N</i>²-formyl-5-methoxykynuramine and <i>N</i>¹-acetyl-5-methoxykynuramine, by activated leukocytes. J Pineal Res; 37 (3): 171-5 (2004).- Interferon-gamma independent oxidation of melatonin by macrophages. J Pineal Res; 34 (1): 69-74 (2003).- Macrophage activation include high intracellular myeloperoxidase activity. Biochem Biophys Res Commun; 292, 869-873 (2002).	

Lista de Abreviaturas

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

AMK - *N*¹-acetil-5-metoxiquinuramina

CAT - Catalase

CD - Grupos de Diferenciação (moléculas de superfície celular que servem como marcadores) (*Cluster of differentiation*)

CR - Receptor de Complemento (*Complement receptor*)

DMSO - Dimetil sulfóxido

ELISA - Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme-linked immunoabsorbent assay*)

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio

GPx - Glutathione Peroxidase

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance (*High Performance Liquid Chromatography*)

i.p. - Intraperitoneal

i.v. - Intravenosa

IDO - Indolamina-2,3-dioxigenase

IFN - Interferon

IL - Interleucina

LPS - Lipopolissacarídeo

mAb - Anticorpo monoclonal (*Monoclonal antibody*)

MARCO – (*Macrophage receptor with collagenous structure*)

MHC - Complexo de histocompatibilidade principal (*Major Histocompatibility Complex*)

MLT - Melatonina

MPO - Mieloperoxidase

MSR - Receptor “scavenger” de macrófagos (*Macrophage Scavenger Receptor*)

NF-κB - Fator nuclear-κB

NK - Citotóxica natural (*Natural killer*)

NO - Óxido nítrico (*Nitric oxide*)

O₂^{•-} - Ânion superóxido

PBMC - Células mononucleares de sangue periférico (*peripheral blood mononuclear cells*)

PBS - Tampão fosfato salino (*phosphate buffer saline*)

PMA - Acetato de forbol miristato (*phorbol myristate acetate*)

PMN - Polimorfonuclear

SOD - Superóxido dismutase

TGF- Fator indutor de crescimento (*Transforming growth factor*)

Th - T auxiliar (*T helper*)

TLR- Receptor toll-símile (*Toll-like receptor*)

TNF - Fator de necrose tumoral (*Tumor necrosis factor*)

Resumo

Neste estudo avaliamos a ativação de macrófagos por: (i) neutrófilos e (ii) melatonina e seus produtos de oxidação *N*¹-acetil-*N*²-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) e *N*¹-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK). Para estudarmos o papel dos neutrófilos na ativação de macrófagos utilizamos um modelo experimental onde camundongos C57BL/6 receberam anticorpo anti-granulócitos (i.v.) e após 36 horas receberam o mitógeno Con A. Verificamos que a depleção dos neutrófilos diminuiu a atividade do sistema NADPH oxidase e a capacidade fagocítica e microbica dos macrófagos, entretanto não comprometeu a atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e óxido nítrico sintase (iNOS). Para estudarmos o efeito de melatonina, AFMK e AMK sobre a ativação de macrófagos, avaliamos a produção de citocinas e a atividade microbica destas células. Primeiramente, acompanhamos a liberação de citocinas em cultura de células mononucleares humanas. Melatonina, AFMK e AMK inibiram a liberação de TNF- α , IL-12 e IFN- γ , mas não afetaram a liberação de IL-10. Num estudo posterior, macrófagos murino ativados com IFN- γ e infectados com *T. cruzi* foram incubados com melatonina, AFMK e AMK. Esta incubação resultou na diminuição de NO e aumento da replicação intracelular do parasita *T. cruzi*. Em conclusão, mostramos duas maneiras nas quais a ativação de macrófagos pode ser modulada. A primeira mostra que a interação de neutrófilos com macrófagos, no foco inflamatório parece ser um fator determinante para a atividade microbica de macrófagos. E a segunda mostra que a interação da melatonina e seus produtos de oxidação com macrófagos contribui para a desativação do processo inflamatório, ampliando o conhecimento sobre o papel imunomodulador descrito para melatonina.

Abstract

This study we evaluate macrophage activation by (i) neutrophils and (ii) melatonin and its oxidation products *N*¹-acetyl-*N*²-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and *N*¹-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK). Neutrophils role in macrophage activation was studied by an experimental model when mice C57BL/6 was injected with antigranulocyte antibody and 36 hours later they received the mitogenic ConA. We verified that neutrophil depletion decreased NADPH oxidase system activity, macrophage phagocytic and microbicide capacity. However, mieloperoxidase (MPO) and nitric oxide sintase (iNOS) activity was not compromised. Melatonin, AFMK and AMK effect in macrophage activation was evaluated by the cytokines production and microbicide activity of theses cells. We verified cytokines release in human mononuclear cells culture. Melatonin, AFMK and AMK inhibited TNF- α , IL-12 and IFN- γ release, but IL-10 was not affected. After that, IFN- γ -activated murine macrophage was infected with *T.cruzi* and incubated with melatonin, AFMK and AMK. We verify NO decrease and that intracellular replication of the parasite *T.cruzi* increased. In conclusion, we showed that there is two modulation ways for macrophage activation. First, neutrophil - macrophage interaction in inflammatory site seems to be a determinant factor to macrophage microbicide activity. And second, macrophage interaction with melatonin hormone and its oxidation products leads to deactivation of the inflammatory process, raising knowledge of immunomodulatory role described to melatonin.

Introdução

No trabalho desenvolvido durante o mestrado mostramos a participação da mieloperoxidase (MPO) na oxidação de melatonina por macrófagos. Este resultado pode ser avaliado por dois prismas. O primeiro deles é a demonstração que MPO tem atividade sobre substratos endógenos e, portanto sua função biológica vai além da produção de ácido hipocloroso (um potente microbicida). O outro aspecto é a descrição de uma rota alternativa de metabolização do hormônio melatonina e seu possível impacto na inflamação. Ambos os aspectos serviram como proposta para este trabalho.

Baseado em dados da literatura que sugeriam a transferência de MPO de neutrófilos para macrófagos, no foco inflamatório, avaliamos o impacto da depleção de neutrófilos sobre a atividade de MPO e de outras enzimas em macrófagos, assim como sua capacidade microbicida.

De outro lado vimos na interação de melatonina com macrófagos uma possibilidade de estudar uma rota alternativa na inflamação e estabelecer um eixo entre o sistema endócrino e imune.

1. Introdução

A proteção contra microrganismos patogênicos e células tumorais é basicamente conferida pelo sistema imune. Células do sistema imune, tais como leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos, células NK (*natural killer*), células dendríticas, são ativadas quando patógenos conseguem romper as barreiras naturais de proteção. Elas, portanto, participam dos eventos iniciais da resposta de defesa contra patógenos, entretanto ainda não está completamente elucidado como esses tipos celulares se comunicam e se influenciam mutuamente.

Estima-se que na maior parte das vezes a ativação de neutrófilos e monócitos seja suficiente para conter a invasão de microrganismos. Neutrófilos e monócitos se distinguem pela capacidade de migrar para o foco inflamatório em resposta a estímulos quimiotáticos, reconhecer, fagocitar e matar microrganismos, células tumorais e células apoptóticas (Rutherford, Witsell et al. 1993; Remick and Villarete 1996; Abbas, Lichtman et al. 2000).

A comunicação direta entre neutrófilos e macrófagos é esperada (Savill, Henson et al. 1989), uma vez que macrófagos migram para o tecido após os neutrófilos e podem, dependendo da infecção, conviver no foco inflamatório por dias. A comunicação indireta entre estas células é também esperada, mediada por citocinas e outros fatores liberados localmente por neutrófilos antes da migração de macrófagos.

Apesar dos macrófagos possuírem funções específicas, como a apresentação de antígenos, há entre neutrófilos e macrófagos um repertório bioquímico comum para a atividade microbicida. Esta atividade está relacionada com vias metabólicas que envolvem as enzimas NADPH-oxidase, MPO, NO-sintase induzida (iNOS) e indolamina 2,3-dioxigenase (IDO). Estas vias interagem entre si, gerando moléculas altamente tóxicas como espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (Ding, Nathan et al. 1988; Remick and Villarete 1996; Hampton, Kettle et al. 1998).

É possível que o contato entre neutrófilos e macrófagos influencie a formação destas moléculas e conseqüentemente algumas funções destas células (Marcinkiewicz, Grabowska et al. 1995). Em trabalho anterior, mostramos que macrófagos murino recém migrados para o foco inflamatório conservam MPO com atividade catalítica. A contribuição dos neutrófilos para o conteúdo de MPO de macrófagos foi excluída pelo tratamento dos camundongos com anticorpo antigranulócitos (Rodrigues, Rodriguez et al. 2002).

Tanto macrófagos quanto neutrófilos também expressam e produzem uma dezena de mediadores como citocinas, quimiocinas e fatores inflamatórios (Borish and Steinke 2003). As enzimas MPO, iNOS, IDO e o sistema NADPH-oxidase catalisam a formação de produtos decorrentes da ativação celular e cuja ação combinada levaria à alta eficiência microbicida e regulatória de neutrófilos e macrófagos.

A liberação dos produtos microbicidas pelas células ativadas, embora necessário para a destruição dos patógenos, pode causar danos aos tecidos (Beutler 2004). Portanto, a resolução do processo inflamatório depende do equilíbrio entre processos de ativação e desativação destas células.

A inflamação desencadeia a síntese de um grande número de compostos imunomodulatórios. Assim, estímulos devem desencadear, ao mesmo tempo, processos de ativação e de desativação celular. Uma série de evidências

apontam para esta auto-regulação, por exemplo, a indução de apoptose de neutrófilos por produtos gerados na sua ativação (Colotta, Re et al. 1992). É possível também que muitas das proteínas expressas ou reguladas, quando neutrófilos e monócitos se encontram com bactérias, façam parte do grupo de proteínas regulatórias ou antiinflamatórias.

É conhecido que a melatonina (*N*¹-acetil-5-metoxitriptamina), hormônio da glândula pineal, é um composto indólico que exerce influências regulatórias importantes nos vertebrados (Kvetnoy, Sandvik et al. 1997). Nos últimos anos, vários trabalhos têm mostrado que melatonina possui propriedades imunomodulatórias (Caroleo, Frasca et al. 1992; Calvo, Rafii-el-Idrissi et al. 1995), embora muito pouco seja conhecido sobre sua ação em leucócitos. Nós mostramos em trabalho anterior que macrófagos oxidam melatonina a AFMK numa reação catalisada por mieloperoxidase e dependente de ânion superóxido (Rodrigues, Rodriguez et al. 2003).

AFMK e AMK (produto de deformilação de AFMK) são compostos do tipo quinurenina originados da oxidação da melatonina. Trabalhos recentes apontam para a possibilidade de que estas quinureninas tenham, por si mesmas, efeitos biológicos e que a ação desses compostos possa ser mais intensa do que a própria melatonina (Kelly, Amato et al. 1984; Kennaway, Hugel et al. 1988; Tan, Manchester et al. 2001; Ressmeyer, Mayo et al. 2003).

Sabe-se que células mononucleares ativadas sintetizam melatonina (Finocchiaro, Nahmod et al. 1991; Carrillo-Vico, Calvo et al. 2004; Martins, Ferreira et al. 2004) e que o processo inflamatório proporciona as condições necessárias para que a oxidação de melatonina ocorra *in vivo*.

Diante deste cenário, este trabalho foi proposto para verificar a contribuição dos neutrófilos e do efeito da melatonina e seus produtos de oxidação, sobre algumas funções de células mononucleares. A introdução que se segue apresenta os principais tópicos que auxiliam a compreensão do nosso trabalho.

1.1 Fagócitos mononucleares

Os fagócitos mononucleares são células fundamentais no sistema imunológico, participam das interações bidirecionais entre a imunidade inata e a

específica (Fearon and Locksley 1996). Estas células originam-se na medula óssea a partir de uma célula primordial pluripotente, a “stem cell”, que se diferencia em células progenitoras de linhagens específicas e representa a segunda maior população celular do sistema imune específico. A proliferação e diferenciação destas células dependem da estimulação exercida pelos fatores de crescimento ou pelos hormônios hematopoiéticos. A célula pluripotente é capaz de se duplicar ou se diferenciar em precursores específicos que darão origem às diferentes células do sangue. Uma das vias de diferenciação origina as células fagocíticas mononucleares.

Na medula óssea o precursor desta linhagem se diferencia em monoblasto, que passará depois a ser pró-monócito, célula esta que se divide ativamente para dar origem ao monócito. Depois de um período de maturação na medula, os monócitos são liberados para a circulação sanguínea passando a constituir de 3 a 10% de todos os leucócitos circulantes. O monócito tem uma vida média, na circulação, de aproximadamente 1 a 3 dias, passando depois aos tecidos onde amadurece e se transforma em macrófagos (van Furth, van Schadewijk-Nieuwstad et al. 1985). Os macrófagos estão presentes em diversos tecidos como baço, linfonodos e podem assumir diferentes morfologias, incluindo microglia do sistema nervoso central, células de Kupffer do fígado, macrófagos alveolares do pulmão e osteoclastos do osso.

1.2 Fagócitos mononucleares na inflamação

Durante o processo inflamatório, monócitos migram através do endotélio até o local da inflamação. Esta migração se dá mais tardiamente que a dos neutrófilos. Todo este processo de migração celular é mediado por moléculas de adesão da família das selectinas, integrinas e imunoglobulinas que são expressas na superfície dos leucócitos e no endotélio. Estas moléculas são liberadas em resposta aos mediadores liberados na inflamação, como a histamina, leucotrieno B₄ (LTB₄), fator ativador de plaquetas (PAF) e as citocinas TNF- α , IL-1 e IL-8 (Kuna, Reddigari et al. 1993).

No foco inflamatório, os macrófagos fagocitam microrganismos e produzem substâncias microbidas, dentre as quais espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) (Ding, Nathan et al. 1988).

Os macrófagos respondem aos microrganismos quase tão rapidamente quanto os neutrófilos, porém persistem por muito mais tempo nos sítios da inflamação. Por este motivo, os macrófagos são as células efectoras dominantes nos estágios mais tardios das respostas imunes inatas, cerca de 1 a 2 dias após a infecção (Abbas, Lichtman et al. 2000).

A fagocitose se dá após o reconhecimento de patógenos, células tumorais, células apoptóticas e restos celulares através de receptores específicos presentes na membrana dos fagócitos. Macrófagos expressam um amplo espectro de receptores que participam do reconhecimento e internalização da partícula, entre eles os receptores para complemento (CD35, CD11b/CD18, CD11c/CD18), receptores para a porção Fc de imunoglobulinas (CD64, CD32, CD16, CD23, CD89), receptores "scavengers" (SRA, MARCO), receptores para LPS (CD14) e receptores manose (CD206). Alguns destes receptores encontram-se associados a moléculas da família dos TLR (*toll-like receptor*), que estão envolvidas no reconhecimento de patógenos em organismos tão distintos como artrópodes e mamíferos (Underhill and Ozinsky 2002). O contato da célula com o patógeno desencadeia a produção de sinais próinflamatórios e ativação de mecanismos microbidas (Figura 1).

Figura 1. Receptores e sinalização intracelular durante a fagocitose de patógenos (Underhill and Ozinsky 2002).

Além de reconhecer e fagocitar patógenos, macrófagos produzem diversas substâncias microbicidas e possuem um potencial secretor importante. Estas células são responsáveis pela secreção de citocinas, mediadores inflamatórios e fatores do complemento. Estes produtos, além de potencializarem a ação microbicida dos macrófagos, desencadeiam respostas linfocitárias específicas (Beutler 2004).

1.3 Espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN)

A produção de ERO e ERN é um importante componente da ativação dos macrófagos e da sua atividade microbicida e tumoricida (Bogdan, Rollinghoff et al. 2000).

Espécies reativas de oxigênio são geradas através de um processo denominado "burst" oxidativo, decorrente da ativação do sistema NADPH oxidase através da redução de oxigênio molecular por elétrons provenientes do NADPH

acarretando a produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). A ativação do complexo enzimático NADPH oxidase é induzida *in vivo* por bactéria e imunocomplexos e *in vitro* por estímulos opsonizados e pelo mitógeno acetato de forbol miristato (PMA) (Pick and Keisari 1980). O consumo de oxigênio pode ser de duas a vinte vezes maior que o consumo basal, dependendo da célula e da natureza do estímulo (Drath and Karnovsky 1975).

O complexo enzimático NADPH oxidase é formado por componentes que se encontram dissociados na célula em repouso. Estes componentes são a $p40^{phox}$, a $p47^{phox}$ e a $p67^{phox}$, agrupadas num complexo proteico citoplasmático de 240kDa. Também há o citocromo b_{558} , composto pelas proteínas $p22^{phox}$ e $gp91^{phox}$, localizadas nas membranas das vesículas secretórias e dos grânulos específicos citoplasmáticos. Há, ainda, outras proteínas de baixo peso molecular, ligantes de nucleotídeo guanina: a Rac 1 e 2 e Rap1a, que também participam do processo (Bokoch and Knaus 2003; Roos, van Bruggen et al. 2003).

A ativação do complexo NADPH oxidase se inicia pela fosforilação do componente citosólico $p47^{phox}$, resultando na migração de todas as proteínas citosólicas para a membrana plasmática. Uma vez na membrana, estas proteínas se associam ao citocromo b_{558} que migrou para a mesma através da fusão das vesículas secretórias e dos grânulos específicos. A Rac1/2 liga-se simultaneamente ao trifosfato de guanina (GTP) e migra para a membrana juntamente com o complexo citosólico (Figura 2).

Figura 2: Organização do sistema NADPH oxidase após ativação celular (Roos, van Bruggen et al. 2003).

Uma vez ativo, o sistema multienzimático NADPH oxidase é responsável pela transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio molecular, formando o $O_2^{\bullet -}$ (Babior 1999). Além da transferência de elétrons, o sistema NADPH oxidase é responsável pela passagem de H^+ e outros cátions, especialmente K^+ , para o interior do fagolisossoma (Reeves, Lu et al. 2002). O $O_2^{\bullet -}$ tem pouca atividade microbicida (Winterbourn, Vissers et al. 2000), entretanto origina ERO mais potentes (Figura 3). Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é formado a partir da dismutação do ânion superóxido, espontânea e/ou catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). HOCl (ácido hipocloroso) é formado pela reação dependente de H_2O_2 , íons cloreto (Cl^-) e da enzima MPO. Cloraminas ($R-NHCl$) podem ser geradas pela reação de HOCl com compostos contendo nitrogênio. Existem dois mecanismos possíveis para a produção de radical hidroxila ($\bullet OH$) por fagócitos mononucleares: reação de Fenton, onde H_2O_2 reage com íons metálicos, como íons ferro ou através de reação de HOCl com ânion superóxido. O oxigênio singlete (1O_2) pode ser produzido pela reação de H_2O_2 com o HOCl (Figura 3).

Além de ERO, os fagócitos mononucleares também produzem ERN. O óxido nítrico (NO) é formado pela reação de oxidação da L-arginina catalisada pela iNOS. Ânion superóxido reage com NO formando peroxinitrito ($ONOO^-$) e

esta espécie pode se decompor dando origem a $\cdot\text{OH}$ e radical dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2\cdot$) (Mariotto, Menegazzi et al. 2004; Tarpey, Wink et al. 2004) (Figura 3).

Figura 3: Possíveis espécies oxidantes produzidas por fagócitos mononucleares após ativação do sistema NADPH oxidase (Reeves, Lu et al. 2002; Tarpey, Wink et al. 2004).

O NO tem sido descrito como um fator importante na função microbicida dos macrófagos (Taylor, Megson et al. 2003). Esta molécula foi descrita primeiramente como um potente vasodilatador endógeno, liberado por células endoteliais para regular o tônus vascular, entretanto sabe-se hoje que ela é uma importante mediadora de vários processos fisiológicos e fisiopatológicos (Quinn, Petros et al. 1995).

Vários estudos têm demonstrado que NO possui uma potente atividade antiinflamatória. Esta atividade, dentre outras coisas, seria via interação com hemeproteínas, dentre estas, se destaca a reação de NO e guanilato ciclase, a qual estimula a formação de cGMP a partir de GTP. A síntese de cGMP tem vários efeitos regulatórios e antiinflamatórios como a regulação do tônus vascular, inibição da agregação plaquetária e a adesão de leucócitos ao endotélio (Ward, Wong et al. 2000). Foi descrito também que NO estimula a produção de prostaglandinas (Granger and Kubes 1996). Experimentos *in vitro* mostram ainda que NO inibe a ativação do NF- κ B (fator nuclear κ B) em linhagens macrocíticas, macrófagos, monócitos e neutrófilos humanos (Raychaudhuri, Dweik et al. 1999).

NF- κ B é um importante fator na secreção de várias citocinas pró-inflamatórias (Welters, Menzebach et al. 2000). Estudos têm revelado que NO possui propriedades pró e anti-apoptóticas, dependendo da concentração e do fluxo de NO e do tipo celular, sendo que, em macrófagos murino ele induz apoptose (Nicotera, Brune et al. 1997; Kim, Bombeck et al. 1999). Esta atividade antiinflamatória é muitas vezes atribuída a um efeito direto do NO.

Em contraste, um número bastante expressivo de trabalhos demonstra que indiretamente o NO é capaz de promover a injúria celular e tecidual durante a inflamação. Estes efeitos pró-inflamatórios descritos para o NO são mediados pelas ERN originados da sua reação com oxigênio molecular ou com ânion superóxido, como ONOO^- e NO_2^- (Moilanen, Vuorinen et al. 1993; Bogdan 2001). O NO, também produzido pelos macrófagos ativados, tem sido descrito como mais um fator importante na função microbicida destas células (Bogdan 2001).

A produção de NO é estimulada por LPS e também pelas citocinas IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e é inibida por TGF- β , IL-4, IL-10 e IL-13 (Stadler, Stefanovic-Racic et al. 1991; Palmer, Hickery et al. 1993; Bogdan 2001; Borderie, Hilliquin et al. 2002).

1.4 Hemeproteínas importantes na atividade microbicida de fagócitos mononucleares

As funções microbicida e citotóxica do macrófago estão diretamente relacionadas com as vias metabólicas que envolvem, além da NADPH-oxidase e iNOS, as enzimas MPO e IDO. As vias metabólicas destas enzimas interagem entre si, gerando moléculas tóxicas à microrganismos e às células (Reeves, Lu et al. 2002; Roos, van Bruggen et al. 2003; Tarpey, Wink et al. 2004).

1.4.1 Mieloperoxidase

MPO é uma hemeproteína presente em neutrófilos, monócitos circulantes (Winterbourn, Vissers et al. 2000) e monócitos recém migrados para o foco inflamatório e diferenciados em macrófagos (Rodrigues, Rodriguez et al. 2002).

Embora a principal função descrita para MPO tenha sido durante muito tempo a produção de HOCl, atualmente se reconhece que MPO pode ter uma

participação mais ampla na bioquímica dos neutrófilos e monócitos. Isto inclui funções mais abrangentes, além de sua atividade microbida, como o seu papel na imunomodulação (Lefkowitz, Mills et al. 1992). Sabe-se, por exemplo, que HOCl está envolvido na sinalização da apoptose de células do sistema imune (Grisham, Jefferson et al. 1984). Além disto, produtos gerados a partir de HOCl (por exemplo, cloraminas [R-NHCl]) são capazes de ativar a produção de citocinas. Uma outra possibilidade é a reação de HOCl com H₂O₂ e formação de oxigênio singlete (¹O₂) (Grisham, Jefferson et al. 1984). Embora já tenha sido evidenciada a formação intracelular de ¹O₂ durante o processo de fagocitose, comprovações diretas dessa formação são ainda tênues. A importância de ¹O₂ deve-se a sua atividade como molécula sinalizadora da expressão gênica em eucariotos. Especialmente importantes são as propostas de que ¹O₂ participe da ativação do fator de transcrição NF-κB, assim como ativação de quinases e outras enzimas (Schreck, Albermann et al. 1992).

Dentre as atuações de MPO no processo inflamatório inclui-se também sua reação com NO. Esta molécula tem papel ativo na inflamação, sendo que sua biodisponibilidade seria em parte controlada pela reação com MPO (Hazen, Zhang et al. 1999). Diante destes fatos pode-se esperar que MPO tenha um efeito sinalizador que vai além de seus efeitos microbida ou regulatórios.

MPO tem sido correlacionada ainda com alguns dos efeitos deletérios ocorridos durante o processo inflamatório. Neste sentido, MPO poderia catalisar a cloração de proteínas e oxidação de lipídeos e proteínas (Daugherty, Dunn et al. 1994; Nagra, Becher et al. 1997). Entretanto, trabalhos mais recentes mostraram, inesperadamente, que em camundongos deficientes para o gene da MPO, não há diminuição do dano celular (Brennan, Anderson et al. 2001).

1.4.2 Indoleamina 2,3- dioxigenase (IDO)

IDO é uma hemeproteína localizada no citosol de monócitos/macrófagos e na maior parte dos órgãos dos mamíferos, particularmente em órgãos linfóides e na placenta (Watanabe, Yoshida et al. 1981; Yoshida and Hayaishi 1987; Takikawa, Kuroiwa et al. 1988; Littlejohn, Takikawa et al. 2000). Esta enzima catalisa a clivagem oxidativa do anel pirrólico do triptofano e de vários derivados indólicos como o 5-hidroxitriptofano, a triptamina, a serotonina e a melatonina

(Heyes and Morrison 1997) pela inserção de dois átomos de oxigênio (Ohnishi, Hirata et al. 1977). Estudos sugerem o seu envolvimento na regulação dos níveis de serotonina no cérebro e intestino delgado (Kobayashi, Hayashi et al. 1989) e na degradação da melatonina (Hirata, Hayaishi et al. 1974). A contribuição da IDO para a atividade antioxidante celular parece não ser significativa, uma vez que a constante de velocidade de IDO com $O_2^{\cdot -}$ é muito menor do que a observada para SOD (Groseclose and Frank 1982).

Embora o papel fisiológico da IDO seja ainda pouco conhecido, sabe-se que a síntese da enzima é fortemente induzida por lipopolissacarídeos (LPS) e interferon- γ (IFN- γ). A associação entre infecção, síntese de IFN- γ , aumento da expressão de IDO e aumento dos níveis de quinureninas, parece operar em processos infecciosos e durante a ativação imune (Ozaki, Edelstein et al. 1988; Christen, Peterhans et al. 1990; Taylor and Feng 1991; Heyes and Morrison 1997). A indução de IDO tem um importante papel na modulação da resposta imune. Munn e cols. (1998) demonstraram que a expressão da IDO na placenta é responsável pela tolerância imunológica materno-fetal (Munn, Zhou et al. 1998). Ou seja, após o implante, células do embrião passariam a produzir IDO que atuaria como uma barreira, impedindo a migração das células T maternas, da circulação, ao tecido fetal. Isto foi demonstrado experimentalmente em camundongos, pois quando se utilizou um inibidor da IDO, 1-metil-triptofano (1-MT), os fetos eram sistematicamente rejeitados (Munn, Zhou et al. 1998). Além deste efeito imunomodulatório, o IFN- γ também exerce efeito antiproliferativo nas células tumorais e nos linfócitos, o qual é parcialmente atribuído à depleção do aminoácido L-triptofano através da indução da síntese da IDO (Daubener, Remscheid et al. 1996; Mehta, Miller et al. 1998; Takikawa, Tagawa et al. 1999).

1.5 Produção de citocinas

Dentre os produtos gerados por macrófagos, encontram-se as citocinas, importantes mediadores das fases efetoras das imunidades inata e específica. Uma mesma citocina pode ser produzida por células diferentes, podendo atuar sobre diversos tipos de células. Estão envolvidas em virtualmente todas as facetas da imunidade e da inflamação, incluindo a imunidade inata, a

apresentação de antígenos, a expressão de moléculas de adesão, a diferenciação, o recrutamento e a ativação celular (Baggiolini, Dewald et al. 1997; Belardelli and Ferrantini 2002; Borish and Steinke 2003). Na imunidade inata os produtos microbianos como LPS estimulam diretamente os fagócitos mononucleares a secretarem suas citocinas. Enquanto que as citocinas derivadas das células T são produzidas primariamente em resposta ao reconhecimento específico dos antígenos (Murtaugh and Foss 2002).

A expressão e o mecanismo de ação das citocinas, em diversos tipos celulares, é dependente de vias de sinalização, que são ativadas pela agregação de receptores específicos aos seus ligantes. As vias de sinalização JAK/STAT (Janus-quinase/ transdutor de sinais e ativador de transcrição) e dos fatores de transcrição como NF- κ B (fator nuclear κ B) e AP-1 (proteína-1 de ativação) são algumas dessas vias (McDonald, Bald et al. 1997; Leonard and O'Shea 1998; Hensley, Robinson et al. 2000; Michiels, Minet et al. 2002) .

A instalação de um processo inflamatório de fase aguda caracteriza-se pela liberação inicial de algumas citocinas como, por exemplo, IL-1, IL-6 e TNF- α , que são conhecidas como citocinas de “alarme”. A partir disto uma série de eventos envolvendo a interação destas citocinas com receptores específicos na superfície das células, amplifica a liberação destas substâncias, como IL-8, que é responsável pela transmigração de neutrófilos da circulação sanguínea para o local da lesão. As citocinas estudadas neste trabalho foram IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-12.

1.5.1 IL-8

A IL-8 é uma citocina pró-inflamatória e faz parte da sub-família α das quimiocinas. Esta quimiocina pode ser produzida por vários tipos celulares, incluindo fagócitos mononucleares, neutrófilos, linfócitos T, eosinófilos, fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos e hepatócitos.

A síntese de IL-8 pode ser induzida por LPS, IL-1, TNF e vírus (Baggiolini and Clark-Lewis 1992) e é dependente da ativação do fator de transcrição NF- κ B. Ela encontra-se associada a processos agudos e crônicos e atua principalmente como quimioatraente para neutrófilos, células T, basófilos e linfócitos. A IL-8 age também como fator de ativação e fator angiogênico, sendo produzida rapidamente

após um estímulo inflamatório. Estimula a degranulação, o *burst* respiratório e a atividade microbicida em leucócitos (Ferrante, Nandoskar et al. 1988).

Receptores para IL-8 têm sido identificados em neutrófilos, basófilos e linfócitos, além de sítios de ligação saturados em monócitos, eosinófilos, células endoteliais e em eritrócitos (Borish and Steinke 2003) .

Embora inicialmente considerada um produto de macrófagos, sabe-se hoje que neutrófilos são uma importante fonte de IL-8. Pela liberação de IL-8 os neutrófilos têm a capacidade de amplificar o recrutamento de novos neutrófilos para o sítio inflamatório. A produção de IL-8 pode ser esperada em infecções, isquemia, trauma e em outros distúrbios de homeostase tecidual, desde que as concentrações de IL-1 e TNF- α estejam elevadas. Nestas condições é provável que IL-8 seja a principal causa do acúmulo de neutrófilos no sítio inflamatório (Baggiolini and Clark-Lewis 1992; Sabroe, Read et al. 2003).

1.5.2 TNF- α

São descritas duas diferentes formas de TNF: TNF- α , uma proteína solúvel não-glicosilada de 17 kDa e TNF- β , uma glicoproteína secretada de 25 kDa. São produtos de diferentes genes e são produzidas por diferentes tipos celulares. TNF- α é secretada principalmente por fagócitos mononucleares ativados e também por neutrófilos, linfócitos ativados, células NK, células endoteliais e mastócitos (Matthews, Neale et al. 1987; Kobayashi, Fitz et al. 1989; Baggiolini, Dewald et al. 1997; Borish and Steinke 2003). Sua secreção é dependente da ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 (Matthews, Neale et al. 1987; Kobayashi, Fitz et al. 1989)

TNF- α é o principal mediador da resposta às bactérias gram negativas e é também um dos principais responsáveis por muitas das complicações sistêmicas que ocorrem em infecções severas (Klebanoff, Vadas et al. 1986). O LPS é o mais potente indutor de TNF- α em monócitos, atuando através de receptores do tipo *toll* 2 e 4 (TLR2 e TLR4) (Kobayashi, Fitz et al. 1989; Gubler, Chua et al. 1991; Baggiolini, Dewald et al. 1997; Sabroe, Read et al. 2003).

O TNF- α é um potente mediador parácrino e endócrino de funções inflamatórias e imunes que regulam o crescimento e a diferenciação de uma

variedade de tipos celulares. É seletivamente citotóxico para muitas células transformadas, especialmente em combinação com IFN- γ .

É conhecido que TNF- α induz o stress oxidativo em alguns tipos celulares e que a adição de antioxidantes, redução da pressão de oxigênio (pO₂) ou a super-expressão de superóxido dismutase (SOD) aumentam a sobrevivência dessas células, sugerindo que os radicais de oxigênio estão envolvidos nos efeitos citotóxicos do TNF- α (Wong, Elwell et al. 1989).

Embora o mecanismo exato de ação do TNF- α , na mediação da atividade citolítica *in vitro* e *in vivo*, não esteja bem caracterizado, sua atividade anti-tumoricida parece ser decorrente da ativação e aderência dos neutrófilos, mediando a necrose hemorrágica de tumores sólidos e a inflamação associada (Matthews, Neale et al. 1987; Ferrante, Nandoskar et al. 1988). TNF- α aumenta a atividade fagocítica de fagócitos, a indução da liberação de enzimas lisossomais e a estimulação da produção de superóxido (Klebanoff, Vadas et al. 1986). O TNF- α ainda atua sobre fagócitos mononucleares para estimular a secreção de IL-1 e IL-6 na circulação (Baggiolini, Dewald et al. 1997).

1.5.3 IL-12

A interleucina-12 (IL-12) é uma citocina heterodimérica, formada por duas cadeias, p35 e p40, codificadas por cromossomos distintos (Gubler, Chua et al. 1991; Germann and Rude 1995). Para que a molécula IL-12p70 bioativa seja gerada é necessário que ambos os genes sejam expressos na mesma célula (Gubler, Chua et al. 1991). A IL-12 é secretada principalmente pelas células apresentadoras de antígenos (monócitos/ macrófagos, dendríticas e linfócitos B), além de leucócitos polimorfonucleares (Cassatella, Meda et al. 1995; Germann and Rude 1995; Macatonia, Hosken et al. 1995; Lamont and Adorini 1996). Sua produção é induzida por vários estímulos, entre eles: bactérias, produtos bacterianos (ex. LPS) e parasitas intracelulares (Germann and Rude 1995).

O receptor para a IL-12 (IL-12R, *IL-12 receptor*) é formado de duas cadeias, β 1 e β 2, e está altamente expresso em células NK e linfócitos T (Desai, Quinn et al. 1992), tendo sido recentemente descrito em macrófagos (Fukao, Frucht et al. 2001). A ligação da IL-12 ao seu receptor induz uma série de

reações intracelulares que envolvem a cascata de sinalização JAK – STAT (Leonard and O'Shea 1998; Bastos, Marinho et al. 2004).

IL-12 estimula a produção de IFN- γ por linfócitos T e células NK, aumenta a citotoxicidade e induz a proliferação dessas células (Trinchieri 1993; Xing, Zganiacz et al. 2000; Trinchieri 2003). A IL-12 ainda induz a diferenciação dos linfócitos T para o fenótipo Th1 (*T helper 1*) (Trinchieri 1993), sendo capaz de gerar e manter linfócitos Th1 efetores e de memória (Stobie, Gurunathan et al. 2000). Por essas habilidades, a IL-12 é conhecida como uma citocina ponte entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa (Lamont and Adorini 1996; Trinchieri 2003).

A IL-12 também possui um papel central no desenvolvimento da resposta imune a muitos tipos de microrganismos, principalmente por sua capacidade em estimular a produção de IFN- γ , que por sua vez, age em monócitos e macrófagos aumentando a capacidade microbiciada dessas células (Seder, Gazzinelli et al. 1993). Ainda, na presença de micobactéria, a IL-12 induz a produção de IFN- γ , TNF- α e NO pelos macrófagos, estimulando dessa maneira sua atividade microbiciada (Xing, Zganiacz et al. 2000; Grohmann, Belladonna et al. 2001). Por outro lado, citocinas fenótipo Th2 (*T helper 2*) como a IL-10, IFN- α , IL-4 e TGF- β parecem exercer uma regulação negativa nesse processo (Baggiolini, Dewald et al. 1997; Toossi, Mincek et al. 1997).

1.5.4 IFN- γ

Os interferons constituem uma família de glicoproteínas sintetizadas por diferentes células em resposta à infecção viral, estimulação imunológica ou indutores químicos (Baggiolini, Dewald et al. 1997). O IFN- γ é produzido principalmente pelas células T CD4⁺ ativadas, e também por células T CD8⁺, células NK e mais recentemente, foi descrito sua síntese por células apresentadoras de antígenos (Nathan, Murray et al. 1983; D'Andrea, Rengaraju et al. 1992; Frucht, Fukao et al. 2001; Fukao, Frucht et al. 2001). A produção de IFN- γ por macrófagos vem sendo descrita desde 1985 (Robinson, McLemore et al. 1985), porém sempre houve a crítica de que a produção de IFN- γ nas culturas seria artefato da contaminação por linfócitos T e células NK. Com o desenvolvimento das pesquisas na área, essa possibilidade foi excluída

(Schindler, Lutz et al. 2001), contribuindo para ampliar ainda mais a importância dessas células no sistema imunológico como um todo.

As células NK secretam IFN- γ em resposta ao reconhecimento de componentes antigênicos dos microrganismos ou em resposta a IL-12, funcionando como um mediador da imunidade inata. Na imunidade adquirida, as células T produzem IFN- γ em resposta ao reconhecimento do antígeno, e isto é acentuado pela IL-12 (Seder, Gazzinelli et al. 1993; Grohmann, Belladonna et al. 2001). O IFN- γ é a mais importante citocina da imunidade celular, aumenta a capacidade de apresentação de antígenos dos macrófagos, aumentando a expressão de moléculas de classe I e II do MHC (Complexo de Histocompatibilidade Principal) e das moléculas co-estimuladoras, especialmente as moléculas da família B7 (Nathan, Murray et al. 1983; Baggiolini, Dewald et al. 1997; Borish and Steinke 2003).

A ação do IFN- γ é dependente da via de sinalização JAK/STAT. A ligação da citocina ao receptor ativa o STAT1, que então estimula a transcrição dos genes responsivos ao IFN- γ , esta reação é mediada pelas enzimas JAK1 e JAK 2. Este processo é regulado positivamente pela IL-12 e IL-18 (Schindler, Lutz et al. 2001) e negativamente pela IL-10 e IL-4 (Seder, Gazzinelli et al. 1993; Schindler, Lutz et al. 2001).

Em monócitos, o IFN- γ estimula a produção de citocinas e sua função efetora, incluindo fagocitose, produção de ERO, ERN, resultando no aumento da sua atividade microbicida e tumoricida (Nathan, Murray et al. 1983). IFN- γ estimula também os macrófagos a secretar citocinas, incluindo a IL-12, que funciona como retroalimentação positiva sobre as células T para aumentar a produção do próprio IFN- γ .

O IFN- γ exerce um importante efeito imunomodulatório e antiproliferativo em células tumorais e um efeito inibitório em patógenos intracelulares como *Leishmania spp.*, *T. gondii* e *T. cruzi*. (Daubener, Remscheid et al. 1996; Mehta, Miller et al. 1998; Ceravolo, Chaves et al. 1999). Este efeito é parcialmente atribuído à depleção do aminoácido essencial triptofano, através da indução daIDO. O aumento da expressão de IDO em células tumorais foi proposto como um dos mecanismos de ação do efeito antitumoral do IFN- γ , através da diminuição da síntese protéica e crescimento celular (Ozaki, Edelstein et al. 1988).

1.6 Modulação das funções de macrófagos: efeitos da melatonina

Os produtos liberados pelos macrófagos ativados, como ERO, ERN, collagenases, hidrolases, entre outros, além de destruir microrganismos, podem também causar danos aos tecidos saudáveis. Portanto, durante a atividade microbicida, os macrófagos necessitam que sua ativação seja regulada, de modo a prevenir estes danos. Assim, mecanismos antiinflamatórios potentes como, síntese de prostaglandinas, citocinas antiinflamatórias, são acionados levando à desativação deste processo.

Melatonina, principal hormônio da glândula pineal, possui várias atividades biológicas incluindo um papel chave na sinalização neuroendócrina e na sincronização de ritmos biológicos (Kvetnoy, Sandvik et al. 1997). Nos últimos anos, uma nova proposta de atuação para melatonina, tem sido apontada. Estudos amparam a proposta de que melatonina seja uma molécula imunoregulatória (Caroleo, Frasca et al. 1992; Calvo, Rafii-el-Idrissi et al. 1995).

A síntese de melatonina foi descrita recentemente em células do sistema imune (Finocchiaro, Nahmod et al. 1991; Carrillo-Vico, Calvo et al. 2004; Martins, Ferreira et al. 2004). Portanto, este composto indólico poderia ter uma participação no cenário de ativação e desativação de macrófagos.

Um dado adicional que suporta o papel de melatonina na imunoregulação é a presença de receptores para este hormônio em linfócitos T (Calvo, Rafii-el-Idrissi et al. 1995), neutrófilos (Lopez-Gonzalez, Calvo et al. 1993) e monócitos (Barjavel, Mamdouh et al. 1998). Foi descrito que, em alguns modelos de inflamação, ela diminui o edema, a migração de neutrófilos, o volume de exsudato e a atividade da iNOS (Antolin, Rodriguez et al. 1996; Cuzzocrea, Zingarelli et al. 1997; Costantino, Cuzzocrea et al. 1998; Gilad, Wong et al. 1998; Jaworek, Leja-Szpak et al. 2003). Em monócitos, a melatonina induz a secreção de IL-1, IL-2 e IL-6, ativa a formação de ERN e a citotoxicidade contra células tumorais (Garcia-Maurino, Gonzalez-Haba et al. 1997; Garcia-Maurino, Gonzalez-Haba et al. 1998; Neri, de Leonardis et al. 1998). Melatonina também aumenta a produção de citocinas do padrão Th2 em camundongos, como IL-4, TGF- β e IL-10 (Maestroni 1995; Shaji, Kulkarni et al. 1998; Raghavendra, Singh et al. 2001). Estas citocinas

estão envolvidas com a produção de algumas classes de anticorpos e induzem a produção e ativação de eosinófilos (Mosmann, Cherwinski et al. 1986; Baggiolini, Dewald et al. 1997; Borish and Steinke 2003).

Para citocinas como IL-2, TNF- α e IFN- γ os estudos são controversos, enquanto alguns trabalhos mostram que melatonina diminui a secreção destas citocinas, outros mostram que aumentam (Di Stefano and Paulesu 1994; Mohan, Sadeghi et al. 1995; Garcia-Maurino, Gonzalez-Haba et al. 1997). Foi descrito ainda, que o tratamento com melatonina aumentou a expressão de moléculas de classe II do MHC e a capacidade de apresentação de antígenos em macrófagos murino (Pioli, Caroleo et al. 1993). Finalmente, melatonina é um potente inibidor da apoptose de várias células do sistema imune (Sainz, Mayo et al. 1995; Mayo, Sainz et al. 1998).

Tem sido sugerido que a atividade imunoregulatória de melatonina poderia estar associada a sua atividade antioxidante (Antolin, Rodriguez et al. 1996; Tan, Manchester et al. 2000). Melatonina é um bom doador de elétrons e reage com radicais hidroxila, peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso, oxigênio singlete e peroxinitrito (Zhang, Squadrito et al. 1999; Tan, Manchester et al. 2000; Tan, Manchester et al. 2000; Reiter, Tan et al. 2001). A melatonina ainda estimula a expressão gênica das enzimas antioxidantes SOD, catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (Antolin, Rodriguez et al. 1996; Rodriguez, Mayo et al. 2004).

Alguns dos efeitos descritos para melatonina parecem estar relacionados com a inibição da ativação do fator de transcrição NF- κ B (Mohan, Sadeghi et al. 1995; Lezoualc'h, Sparapani et al. 1998). A ativação deste fator de transcrição está envolvida na expressão de diversos genes pró-inflamatórios, como por exemplo, os genes para iNOS e algumas citocinas (Liu, Ng et al. 2001). Gilad et cols. (1998) mostraram que a inibição da produção de prostaglandinas e da ativação da iNOS em macrófagos murino por melatonina ocorre por inibição da ativação do fator de transcrição NF- κ B (Gilad, Wong et al. 1998). Vale comentar que o estresse oxidativo é capaz de induzir a ativação de NF- κ B (Schreck, Albermann et al. 1992; Bowie and O'Neill 2000) e que enzimas antioxidantes diminuem a produção de óxido nítrico em macrófagos pela inibição da ativação do NF- κ B (Han, Kwon et al. 2001).

Melatonina é sintetizada a partir do L-triptofano e é metabolizada preferencialmente pelo fígado a 6OH-melatonina. No sistema nervoso central, melatonina pode ser metabolizada a AFMK, um análogo da N-formilquinurenina, um produto do triptofano. A formação do AFMK se dá possivelmente através da clivagem oxidativa do anel indólico, catalisada por enzimas como a IDO, seguida de deformilação formando AMK, por ação da enzima formamidase (Tan, Manchester et al. 1999). Outras vias metabólicas menos importantes levam ainda a formação de *N*-acetilserotonina e de 3-hidroximelatonina cíclica (Tan, Manchester et al. 1999) (Figura 4).

Figura 4. Representação esquemática de vias metabólicas de melatonina.

O produto AFMK é formado ainda pela foto-oxidação da melatonina (Hardeland, Balzer et al. 1995), pela reação da melatonina com peróxido de

hidrogênio (Tan, Manchester et al. 2000), com radical hidroxila (Tan, Manchester et al. 2000) ou peroxinitrito (Zhang, Squadrito et al. 1999) formando um cátion radical que reagindo com ânion superóxido leva a formação de AFMK. Espera-se a formação de AMK pela ação de formamidases, além deste ser originado enzimaticamente, *in vitro* pela ação da CAT (Tan, Manchester et al. 1999) e esterase (Hirata, Hayaishi et al. 1974).

Nós demonstramos recentemente que AFMK pode ser formado pela oxidação de melatonina por neutrófilos (Silva, Ximenes et al. 2000) e macrófagos ativados (Rodrigues, Rodriguez et al. 2003), numa reação catalisada pela enzima mieloperoxidase (Figura 5).

Figura 5: Representação esquemática de possíveis vias enzimáticas e químicas de formação de AFMK a partir de melatonina.

Trabalhos recentes apontam para a possibilidade de que compostos do tipo quinurenina, tenham por si mesmos, efeitos biológicos. Como exemplo, temos que o AMK é um potente inibidor da biosíntese de prostaglandinas (Kelly, Amato et al. 1984). O AFMK apresentou efeito antioxidante, reduzindo a peroxidação

lipídica, a morte neuronal induzida por H_2O_2 e protegendo o DNA contra danos oxidativos (Tan, Manchester et al. 2001). Mais recentemente, foi demonstrado que as propriedades antioxidantes do AMK são ainda mais acentuadas que as do seu precursor, o AFMK (Ressmeyer, Mayo et al. 2003). Neste contexto, os produtos resultantes da oxidação da melatonina podem ter um papel importante nos efeitos descritos para melatonina.

Objetivos

2. Objetivos

Objetivo Geral:

Este trabalho foi proposto na tentativa de verificar (i) a importância do contato prévio de neutrófilos e macrófagos no foco inflamatório e (ii) a relevância da reação de oxidação da melatonina e de seus produtos de oxidação AFMK e AMK sobre a função de fagócitos mononucleares *in vitro*.

Objetivos específicos:

Capítulo 1: Efeito da depleção de neutrófilos sobre a ativação de macrófagos

- Caracterizar o perfil de ativação assumido pelos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 tratados ou não com mAb anti-granulócitos, quanto à atividade peroxidásica e capacidade de produzir ERO e ERN;
- Avaliar a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 tratados ou não com mAb anti-granulócitos;
- Avaliar a capacidade fungicida de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 tratados ou não com mAb anti-granulócitos.

Capítulo 2: Modulação da atividade de fagócitos mononucleares por melatonina e seus produtos de oxidação

A) Modelo murino:

- Avaliar o efeito da melatonina e de seus produtos AFMK e AMK sobre a liberação de NO por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6;
- Avaliar o efeito da melatonina e seus produtos AFMK e AMK sobre a capacidade microbicida de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6.

B) Modelo humano:

- Verificar a eficiência da oxidação da melatonina por células mononucleares isoladas de sangue periférico humano;
- Verificar o efeito da melatonina e de seus produtos de oxidação, AFMK e AMK, sobre a liberação de citocinas (TNF- α , IL-8, IL-12 e IFN- γ e IL-10) por células mononucleares isoladas de sangue periférico humano.

Material e Métodos

3. Material e Métodos

Material

Animais

Camundongos C57BL/6 (*wild type*) com 6-8 semanas de idade, mantidos em condições livre de patógenos (SPF) (Comissão de Ética- Processo: 156 - FCF), foram fornecidos pelo Biotério de camundongos isogênicos do Departamento de Imunologia, ICB-USP.

Células de sangue periférico humano

PBMC (células mononucleares de sangue periférico) e monócitos humanos foram isolados de sangue periférico obtidos 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 (Comissão de Ética- Processo: 156-FCF).

Parasitas

- O *Trypanosoma cruzi* Sylvio-X10/4 foi mantido por passagens semanais em culturas de células epiteliais de rim de macaco (LLC-MK₂).
- As leveduras de *Candida albicans* (ATCC 5372) foram mantidas em cultura em meio Sabouraud (Difco®) em temperatura ambiente.

Reagentes

Melatonina, azul de tripan, NADPH, dimetil sulfóxido (DMSO), citocromo C (Horse heart), acetato de forbol miristato (PMA), concanavalina A (Con A), lipopolissacarídeo (LPS –*Escherichia coli* 026:B6), albumina sérica bovina (BSA), interferon- γ recombinante humano e de camundongo (rIFN- γ), meio de cultura RPMI 1640 (R-4130) suplementado com L-glutamina (2mM), estreptomicina (0,1 mg/mL), penicilina (100 U/mL) e reagente de Griess (sulfanilamida 1%, dihidrocloreto de N-1-naftilenodiamina 0,1%, ácido fosfórico 2,5%) foram obtidos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EUA);

- Azida sódica, fosfato de sódio, fosfato diácido de potássio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, cloreto de sódio, etanol, metanol,

acetonitrila, bicarbonato de sódio, glicerina, tween 20 foram obtidos da Merck S.A.;

- mAb anti-granulócitos (hibridoma RB6-8C5 produtor de IgG 2b de rato e específico para o antígeno Gr-1 de granulócitos maduros de camundongos) e anticorpo inespecífico IgG de rato (IgG 2b) foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Momtchilo Russo – ICB – USP;

- Soro Fetal Bovino foi obtido da Gibco BRL – Life Technologies (Rockville, MD, EUA);

- Peróxido de hidrogênio 60% foi obtido da INTEROX;

- 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4 diona (luminol) foi obtido da Aldrich Chem. Co.;

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

- As determinações de TNF- α , IFN- γ e IL-8 foram realizadas através de placas de ELISA montadas a partir de Kits DuoSet da R&D System.

- A determinação de IL-12 foi realizada por ELISA do Kit Human IL-12 (p70) da BD Biosciences.

Equipamentos

- Balança Analítica AG 204 Mettler Toledo

- Banho-maria 37⁰ C com Agitador orbital – Gyrotory Water Bath Shaker
Modelo G76

- Banho-maria 37⁰ C

- Centrífuga Refrigerada Eppendorf®, rotor 5804-R

- Citocentrífuga - Incibrás

- Citômetro de Fluxo FACScalibur (Becton & Dickison, Mountain View, CA, EUA), usando *software* Cell Quest.

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência - HPLC Shimadzu LC-10 AT com detectores UV-VIS SPD-10AT-VP e Fluorescência RF10A XL. Coluna de fase reversa C₁₈ LUNA⁺ Supercosil 25 cm x 4,6 mm, 5µm
- Espectrofotômetro UV/VIS marca Shimadzu 1601-PC
- Estufa de esterilização FABBE – Modelo 119
- Estufa incubadora de CO₂, ThermoForma , modelo 310
- Fluxo laminar VECO
- Freezer -20° C e -80° C
- Homogeinizador tipo Potter-Elvehjem
- Leitora de Elisa, modelo SLT- Spectra
- Luminômetro EG & G Berthold LB 96V de microplacas
- Microscópio binocular marca Nikon
- Microscópio Invertido - Leica
- pHmetro Micronal B374
- Sonicador Branson Sonifier 450
- Sped Vac Plus, modelo SC110, Savant

Métodos

Preparo de Reagentes

- Tampão fosfato salino (PBS, *phosphate buffer saline*) 10 mM, pH 7,4, filtrado em millipore de poro 0,22µm (Millipore);
- Solução estoque de PMA foi solubilizada em DMSO (100µm/mL) e estocada a -20°C. A solução de trabalho foi diluída em PBS no momento do ensaio;
- Foram preparadas soluções aquosas de CaCl₂ 100mM, MgCl₂ 50mM, NaCl 0,9%, azida sódica 10 mM, e H₂O₂ 10mM.
- A melatonina 10mM foi preparada em solução etanólica 5%.
- Solução estoque de luminol 10mM foi obtida pela dissolução em água; a adição de NaOH foi necessária para solubilização.

- Solução estoque de LPS foi solubilizada em solução salina (NaCl 0,9%) e mantida a -20°C.
- Soluções utilizadas nas determinações das citocinas:
- Tampão de lavagem (0,05% Tween 20 em PBS, pH 7.4);
- Tampão bloqueador (1% de BSA, 5% de sacarose em PBS com 0,05% de NaN_3);
- Reagente diluente (0,1% de BSA, 0,05% Tween 20 em tampão Tris-salina, pH 7.4).

Síntese de AFMK e AMK

AFMK e AMK foram sintetizados a partir da reação de melatonina (1mM) dissolvida em 100 mL de H_2O_2 30%. Esta reação foi incubada 2 horas a temperatura ambiente sob agitação. Após este período foi realizada uma extração com 50 mL de diclorometano (repetida três vezes). O solvente foi evaporado utilizando nitrogênio e o produto bruto foi ressuspendido em H_2O milliQ (134). Os produtos (AFMK e AMK) foram purificados usando HPLC preparativo, SHIMADZU SCL-10A VP acoplado a um coletor de frações FRC-10A e um detector UV-VIS (254nm). As amostras foram injetadas (500 μL) em uma coluna preparativa C18 shimadzu Shim-pack, usando acetonitrila: H_2O (25:75) como fase móvel com fluxo de 10 mL/min. Os picos correspondentes ao AFMK e AMK foram coletados, e submetidos a secagem à vácuo, ressuspendidos em PBS submetidos à identificação espectrofotometria UV-visível (AFMK λ_{max} = 340, AMK λ_{max} = 380) (Figura-6) (Silva, Rodrigues et al. 2004). As concentrações de AFMK e AMK foram determinadas usando absorção em 340 nm (ϵ_{340} = 3600 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e 380nm (ϵ_{380} = 4500 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) respectivamente (Hirata, Hayaishi et al. 1974).

Figura 6: Espectro UV-VIS de AFMK and AMK. AFMK λ_{max} = 340, AMK λ_{max} = 380.

Identificação e isolamento de produtos de oxidação da Melatonina

A formação e isolamento dos produtos das reações de oxidação da melatonina foram monitorados por HPLC. PBMC e monócitos foram estimulados com LPS ou PMA ($2,5 \times 10^6$ células/mL), plaqueados (placas Nunc de fundo chato com 96 wells- volume final de 300 μ L) e mantidos em cultura por 0, 15 e 30 minutos e 1, 2, 4 e 18 horas, em presença de LPS ou PMA mais melatonina (0,1 mM) em estufa com 5% de CO_2 a 37°C. Os sobrenadantes foram analisados por HPLC SHIMADZU SCL-10A VP acoplado a SPD-10A VP (diode array) e RF-10A XL (fluorescência). Alíquotas de 40 μ L foram injetadas em coluna LC-18. As amostras foram eluídas com fluxo de 1,0 mL por minuto em fase móvel de acetonitrila: H_2O (25:75). AFMK foi detectado por fluorescência (excitação 340nm e emissão 460nm) e AMK por UV-VIS absorvância (254nm). As concentrações de AFMK e AMK foram determinadas através de curvas padrão preparadas a partir de concentrações conhecidas obtidas pela diluição de melatonina, AFMK e AMK em meio de cultura RPMI (Figura 7). O limite de detecção (S/N = 3:1) foi 0,15 e 0,10 μ M e o limite de quantificação (S/N = 10:1) foi 0,5 e 0,33 μ M, para AFMK e AMK respectivamente (Silva, Rodrigues et al. 2004). Nas condições utilizadas a relação do sinal com a concentração se mostrou linear para os dois compostos na faixa analisada (0,001-0,025 mM).

Figura 7-Área integrada de absorvância ou fluorescência do sinal de padrão comercial de melatonina (A) e padrões purificados de AFMK (B) e AMK (C) obtidos em HPLC.

Obtenção de macrófagos peritoneais ativados "in vivo" por Con A

Os animais receberam via intraperitoneal 10µg de Con A (diluída 200 µL de PBS estéril) e o grupo controle 200µL de PBS estéril. Os animais foram sacrificados 48h após receberem o estímulo (Rodrigues, Rodriguez et al. 2002). Alguns animais foram tratados previamente com anticorpo monoclonal anti-granulócitos (mAbAG). Os animais foram sacrificados com éter etílico e a sua cavidade peritoneal lavada com 5 mL de PBS estéril. A suspensão celular foi obtida por aspiração com seringa e agulha e colocada em tubo de polipropileno de fundo curvo. O "pool" de células foi contado e mantido em banho de gelo até a realização dos ensaios. A contagem de células foi feita em Câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada com Azul de Tripán 0.1%. Uma lâmina corada pelo método MGG modificado por Rosenfeld foi utilizada para avaliação da morfologia celular.

Tratamento dos animais com anticorpo monoclonal anti-granulócitos

Os animais (camundongos da linhagem C57BL/6) receberam 0,25 mg de mAbAG (RB6-8C5) (Hestdal, Ruscetti et al. 1991) ou anticorpo inespecífico (IgG 2b de rato) via intravenosa, 36 e 2 horas antes de receberem injeção intraperitoneal de Con A (10 µg) ou PBS estéril (grupo controle). 48 horas após a administração de Con A (ou PBS) os animais foram sacrificados e o lavado peritoneal recolhido. Foi feita uma contagem total e diferencial nas células coletadas. Os macrófagos foram utilizados para avaliar o "pool" de espécies reativas na presença de luminol (1mM) e PMA (53 ng/mL) e o homogenato celular foi utilizado para observar a oxidação do luminol na presença de H₂O₂ (0.5 mM).

OBS.: Alguns animais, injetados com anti-granulócitos e com Con A, receberam glicogênio 5% via i.p. 4 horas antes de serem sacrificados. Foi feita uma contagem diferencial neste grupo, onde foi obtido 100% de células mononucleares, mostrando a eficácia do tratamento com o anticorpo anti-granulócitos.

Quimiluminescência amplificada por Luminol

(Avaliação do “Burst” oxidativo e da atividade peroxidásica)

A intensidade de quimiluminescência foi acompanhada em luminômetro EG &G Berthold LB 96V de microplacas brancas num volume final de 0,3 mL. A reação com células foi iniciada com PMA (16 ng/ensaio) e com homogenatos celulares foi iniciada com H₂O₂ (0,5 mM). O luminol foi usado como substrato na concentração de 1 mM. Todas as reações foram feitas em PBS, pH 7,4, 37°C e foram acompanhadas por 30 minutos (Rodrigues, Rodriguez et al. 2002).

Ensaio da Redução do Citocromo C

(Produção de ânion superóxido)

A produção de superóxido pelo sistema NADPH oxidase em macrófagos foi monitorado pela redução do Citocromo C (Jones and Hancock 1994). O ensaio foi realizado em cubeta de Quartzo de 1 mL contendo 1 x 10⁶ célula, 100 µM de citocromo C e catalase (20 µg/mL) em PBS com glicose 10 mM, pH 7,4. As cubetas foram mantidas a 37°C por 10 minutos em espectrofotômetro para equilíbrio do sistema. A produção de superóxido foi iniciada pela adição de PMA (100ng/mL). Após a adição do estímulo a reação foi monitorada em espectrofotômetro por 5 minutos em comprimento de onda de 550 nm.

Teste de Fagocitose e da Atividade fungicida “in vitro” de macrófagos peritoneais ativados “in vivo” com Con A

- Obtenção de Soro Homólogo Normal

Foi coletado o sangue de 3 camundongos aparentemente saudáveis da linhagem C57BL/6 e centrifugado (4°C, 2.500 rpm, 10 min). Foi utilizado 0,3 mL de soro para opsonização da *Candida albicans*. O soro utilizado foi coletado no mesmo dia do experimento. Todo o processamento foi realizado em condições assépticas, sendo o material utilizado previamente esterilizado.

- Preparo e Opsonização da Suspensão de *Candida albicans*

As leveduras de *C. albicans* (ATCC 5372) foram obtidas após cultura de 24 hs em meio Sabouraud (Difco®). Foi preparada uma suspensão de *C. albicans*

(5×10^6 células/mL) em 2,7 mL de PBS estéril, pH 7,4. As células foram contadas em câmara de Neubauer. A seguir foi adicionado 0,3 mL (10%) do soro previamente separado à suspensão de *C. albicans* e foi incubada a 37°C, 30 minutos, sob agitação.

- Ensaio

Macrófagos peritoneais foram obtidos como previamente descrito, ressuspensos em meio RPMI e mantidos em gelo até o momento do ensaio. Em tubos plásticos, estéreis, foram adicionados a suspensão de macrófagos (1×10^6 células/mL) e a suspensão opsonizada de *C. albicans* (5×10^6 células/mL), mantendo-se uma proporção de 1 macrófago/5 fungos. Os tubos foram incubados a 37°C, em sistema rotatório, à velocidade de 10 rpm, durante 30, 60, 90 e 120 minutos para avaliação da fagocitose e "killing". O controle da reação foi feito com tubos contendo a suspensão de macrófagos e tubos contendo a suspensão de *C. albicans* opsonizada. Após esse período foram preparadas lâminas por citocentrifugação (Incibras®) de alíquotas 50 µL das suspensões contendo *C. albicans* e macrófagos e dos controles, foram imediatamente fixadas e coradas com May-Grunwald-Giemsa modificado por ROSENFELD (1947).

Avaliação da Fagocitose

Para avaliação da fagocitose foram contados, no mínimo, 200 macrófagos, sendo considerados como tendo atividade fagocítica os macrófagos que apresentaram uma ou mais *Candida albicans* internalizadas. Os valores foram expressos em percentagem.

Avaliação da Atividade fungicida ("killing")

A atividade fungicida foi avaliada através da técnica de coloração proposta por HERSCOWITZ (1981), modificada por CORAZZINI (1993). Nessa técnica, as leveduras vivas, intracelulares, coram-se em azul pelo corante de May-Grunwald-Giemsa, enquanto as leveduras mortas não se coram. A atividade fungicida foi avaliada contando-se, ao menos, 200 macrófagos que fagocitaram *Candida albicans*.

Atividade microbicida dos macrófagos tratados “in vitro” com melatonina, AFMK e AMK

Obtenção e tratamento dos macrófagos

Macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos injetados i.p. com amido 3% (Sigma) cinco dias antes da lavagem peritoneal com RPMI 1640 completo (suplementado com penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), 2-mercaptoetanol (50 µM), L-glutamina (2 mM), piruvato de sódio (1 mM) e 3% de FCS, previamente inativado pelo calor) (Bastos, Alvarez et al. 2002). As células obtidas do lavado peritoneal (10^6) foram incubadas por 4 horas após lavagens em meio RPMI 1640 completo. As células não aderentes foram removidas por lavagens seqüenciais com o meio, enquanto as células aderentes foram analisadas por citometria de fluxo em um FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EUA) (Aproximadamente 98% das células aderentes apresentavam fenótipo de macrófagos, com alta expressão de CD11b (Mac-1).

Dosagem de NO

Os macrófagos foram pré-cultivados com melatonina, AFMK e AMK por 24 h. Após este período, foram lavados e estimulados com LPS e rIFN- γ por mais 24 h ou tratadas com melatonina, AFMK e AMK na presença de LPS ou rIFN- γ . Os macrófagos ficaram em cultura em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C por 48 horas.

Os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados para análise da produção de NO pelo método de Griess, como descrito previamente (Ding, Nathan et al. 1988). Resumidamente, 50 µl dos sobrenadantes das culturas foram incubados com 50 µl do reagente de Griess (sulfanilamida 1%, dihidrocloreto de N-1-naftilenodiamina 0,1%, ácido fosfórico 2,5%) por 5 min em temperatura ambiente. A concentração de NO₂ foi determinada por leitura da densidade óptica a 550 nm em referência ao padrão da solução de NaNO₂. Os resultados expressam os valores obtidos de dosagens realizadas em triplicata.

Atividade microbicida dos macrófagos tratados “in vitro” com melatonina, AFMK e AMK frente ao T. cruzi

Macrófagos peritoneais foram adicionados a câmaras de cultura de tecidos (Lab-Tek Chamber Slide, Nunc, Rochester, NY, EUA) na concentração de 10^6 células/ poço e incubadas por 24 horas em meio RPMI completo a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂, na presença ou não de melatonina, AFMK ou AMK (1 mM). As culturas foram, então, infectadas com a forma tripomastigota de *T. cruzi* Sylvio X10/4 na razão 2:1 (2 parasitas para cada macrófago) por 4 horas. Após esse período, as culturas foram lavadas para remoção dos parasitas extracelulares e mantidas por 48 h adicionais com rIFN- γ (100 pg/ml) ou meio. Os sobrenadantes foram avaliados quanto à presença de parasitas extracelulares e as células foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa para contagem das amastigotas (forma intracelular do *T. cruzi*) presentes no interior das células (Bastos, Alvarez et al. 2002). Foram contados no mínimo 200 macrófagos.

Isolamento de células mononucleares humanas

Células mononucleares de sangue periférico foram obtidas 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 à vácuo heparinizados, 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® (densidade = 1077). O material foi centrifugado a 2500 rpm a temperatura ambiente por 20 minutos em centrífuga de bancada, foi recolhida a camada de mononucleares. As células mononucleares (~ 30% monócitos e 70% linfócitos) passaram por alguns processos de lavagem com PBS 10 mM, pH 7.4 em diferentes rotações (1800, 1500 (2X), 1200 rpm) (Boyum 1976) e foram ressuspensas em RPMI 1640. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer.

Isolamento de monócitos

O sedimento de células mononucleares (separadas como descrito acima) foi ressuspenso em 5mL de RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (solução A);

esta solução foi lentamente adicionada à 5 mL de solução B (5 mL de RPMI + 4,75 mL de Percoll + 0,325 mL de PBS 10X). Esta mistura foi centrifugada por 30 minutos, 1500 rpm, 20° C, sem freio. Foi coletado o anel formado de monócitos e o sedimento foi desprezado (linfócitos) (Fluks 1981). As células coletadas foram lavadas em PBS, ressuspensas em RPMI e a contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada com Azul de Tripan 0,1% e uma lâmina corada pelo método de MGG modificado por Rosenfeld foi utilizada para avaliação da proporção entre linfócitos e monócitos. As células foram incubadas em placas de 96 wells por 2 horas, após este período as células não aderentes foram retiradas e o meio de cultura foi substituído.

Cultura de PBMC ou monócitos para determinação de citocinas

O meio de cultura utilizado foi RPMI 1640 suplementado com L-glutamina 0.3g/L, Hepes 2,32g/L), bicarbonato de sódio 2.0 g/L, estreptomicina 100µg/mL, penicilina 100 UI/mL e 10% soro fetal bovino. O meio foi filtrado em filtro Millipore de poro 0.22µm e acondicionado em frasco de vidro previamente esterilizado. Todo o procedimento foi realizado em fluxo laminar. Células mononucleares ou monócitos purificados foram mantidos em placas Nunc® de fundo chato e foram submetidos à cultura em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Para as dosagens de IL-8 e TNF-α foram utilizadas 2,5 x 10⁵ células/ mL, tendo como estímulo celular LPS; para as dosagens de IFN-γ foram utilizadas 2,5 x 10⁶ células/ mL e o estímulo foi Con A e para as dosagens de IL-12 foram utilizadas 2,5 x 10⁶ células/ mL foi utilizado rIFN-γ humano como estímulo. A placa submetida à cultura foi centrifugada em a 2000 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante livre de células foi coletado e submetido a congelamento em tubos criogênicos a -80°C até o momento do ensaio de quantificação das citocinas por Elisa.

Determinação de citocinas

A determinação das citocinas foi feita por imunoensaio quantitativo. A determinação de IL-12 foi realizada por ELISA do Kit Human IL-12 (p70) da BD Biosciences. As concentrações de TNF-α, IFN-γ, IL-8 e IL-10 foram determinadas

através de placas de ELISA montadas e padronizadas a partir de Kits DuoSet da R&D System, como descritos a seguir:

As citocinas foram mensuradas em sobrenadante de cultura de células por ensaio imunoenzimático ELISA. O princípio básico do teste é a imobilização de um dos reagentes em uma fase sólida, enquanto outro reagente pode ser ligado a uma enzima, com preservação tanto da atividade enzimática como da imunológica do antígeno. No nosso caso, a fase sólida é o anticorpo de captura diluído em PBS, após incubação com as amostras e o padrão foi utilizado o anticorpo de detecção. Na revelação da reação utilizamos estreptavidina conjugada com peroxidase de raiz forte (HRP) (diluição 1:200 com o reagente diluente). O substrato utilizado foi uma mistura 1:1 de H_2O_2 e tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi terminada pela adição de H_2SO_4 (2N). A leitura foi realizada em 450 nm e uma leitura de correção em 540 nm. A leitura de correção é importante para eliminar qualquer interferente presente na placa.

- Preparo da Placa para dosagem das citocinas (Duo-Set):

- 1- O anticorpo de captura foi diluído em PBS, numa concentração final de 4 $\mu\text{g/mL}$ (para as 3 citocinas). Foram colocados 100 μL do anticorpo diluído por poço sendo então a placa coberta e incubada por 20 horas a temperatura ambiente;

- 2- No dia seguinte, os poços foram aspirados e lavados com 400 μL de tampão de lavagem (0,05% Tween 20 em PBS, pH 7.4) três vezes seguidas;

- 3- As placas foram bloqueadas adicionando 300 μL de tampão bloqueador (1% de BSA, 5% de sacarose em PBS com 0,05% de NaN_3) a seguir as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 1 hora;

- 4- As lavagens e aspirações foram repetidas e as placas foram secas a vácuo.

Procedimento de dosagem das citocinas:

- 1- Quando necessário fez-se a diluição das amostras ou padrões com o reagente diluente (0,1% de BSA, 0,05% Tween 20 em tampão Tris-salina, pH 7.4), por poço finalizado 100 μL de amostra. A placa foi coberta com fita adesiva e incubada por 2 horas a temperatura ambiente;

2- Os poços foram aspirados e lavados com 400 μ L de tampão de lavagem (0,05% Tween 20 em PBS, pH 7.4) três vezes seguidas.

3- 100 μ L do anticorpo de detecção (300ng/mL para TNF- α , 100 ng/mL para IFN- γ ou 20ng/mL para IL-8) diluído no reagente diluente foi adicionado. A placa foi coberta novamente com fita adesiva e incubada por duas horas a temperatura ambiente;

4- As aspirações e lavagens do passo 2 foram repetidas;

5- 100 μ L de estreptavidina-HRP (diluída 1:200 no reagente diluente), foi adicionado e a placa foi incubada 20 minutos a temperatura ambiente evitando luz direta;

6- As aspirações e lavagens do passo 2 foram repetidas;

7- 100 μ L da solução substrato foram adicionados em cada poço e incubados durante 20 minutos a temperatura ambiente evitando luz direta. A solução substrato foi preparada diluindo-se o reagente colorido A (H₂O₂) e o reagente colorido B (tetrametilbenzidina) na proporção 1:1;

8- 50 μ L da solução "stop" (H₂SO₄, 2N) foi adicionado em cada poço homogeneizando bem;

9- A densidade óptica das placas foi determinada imediatamente a 450/550 nm.

Os resultados foram expressos através da construção de uma curva padrão linear com oito pontos, de concentrações conhecidas de TNF- α e IFN- γ (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,3; 15,6 e 7,81 pg/mL) e para IL-8 (2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,5 e 15,6 pg/mL).

Análise Estatística:

- Para os ensaios feitos com macrófagos peritoneais de camundongos, a análise estatística utilizada foi a Análise de Variância (ANOVA). As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando o valor de $p < 0.05$ (5%).

- Para os ensaios feitos com células humanas, a análise estatística utilizada foi a ANOVA, seguida do teste de Comparação Múltipla Dunnett através do Programa INSTAT. O nível de significância foi de 95%, onde * equivale a $p \leq 0.05$, ** a $p \leq 0.01$ e *** a $p \leq 0.001$.

Resultados e Discussão

4. Capítulo 1

Efeito da depleção de neutrófilos sobre a ativação de macrófagos

Resultados e Discussão

4.1 Resultados

Em trabalho anterior do grupo avaliamos, em camundongos, se neutrófilos contribuíam com o conteúdo de MPO presente em monócitos recém migrados para a cavidade peritoneal, em resposta à injeção i.p. com Con A. Mostramos que macrófagos recém migrados para o foco inflamatório conservam MPO e que esta enzima está ativa na catálise da formação de HOCl. A contribuição de neutrófilos para o conteúdo de MPO de macrófagos foi excluída pelo tratamento dos camundongos com anticorpo monoclonal antigranulócitos (Rodrigues, Rodriguez et al. 2002).

Neste estudo avaliamos o impacto da retirada de neutrófilos sobre algumas funções de macrófagos, especialmente em relação à atividade do sistema NADPH oxidase, produção de NO e da atividade microbicida destas células.

Para tanto, tratamos camundongos C57BL/6 pela via intravenosa com 250 μ g de anticorpo monoclonal anti-granulócitos RB6C-5 (mAbAG), 36 horas antes da injeção i.p. com Con A.

Efeito do tratamento com o anticorpo monoclonal anti-granulócito em camundongos injetados com Con A

Animais da linhagem C57BL/6 foram tratados pela via i.v. com 250 μ g do anticorpo mAbAG 36 horas antes da injeção i.p. com 10 μ g de Con A. Os animais foram sacrificados 48 horas após a injeção de Con A e as células do peritônio foram colhidas e foi determinado o número total e diferencial das células.

Como podemos observar na figura 8, há um aumento significativo do número total de células no peritônio dos animais injetados com Con A em relação ao grupo de animais controle. Nos animais que foram previamente tratados com o mAbAG, observamos que há uma inibição do número total de células migradas para o peritônio em relação ao grupo de animais onde foi injetado somente Con A. Em todos os grupos estudados, a contagem diferencial mostra que a maioria das células obtidas são células mononucleares.

Figura 8. Efeito do tratamento com o anticorpo mAbAG sobre o influxo celular ao peritônio em animais injetados com Con A. Animais da linhagem C57BL/6 foram injetados ou não com 250 μ g de mAbAG pela via i.v. 36 horas depois os animais receberam 10 μ g de Con A i.p. Os animais controle foram injetados com PBS. 48 horas após a injeção de Con A, os animais foram sacrificados e foi determinado o influxo celular ao peritônio. Os dados correspondem à média $\pm$ SEM de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo Con A.

Outro parâmetro avaliado neste trabalho foi o efeito do tratamento com o mAbAG na produção de ERO por macrófagos. Para isto nós utilizamos o ensaio de quimiluminescência amplificada por luminol. Este ensaio reflete tanto a produção de ERO quanto a atividade peroxidásica dos sistemas biológicos, ou seja, do sistema NADPH oxidase e da enzima MPO.

A figura 9 mostra um aumento significativo no “burst” oxidativo das células do peritônio de camundongos injetados com Con A em relação ao controle e ao grupo de animais previamente tratados com o mAbAG. Como podemos observar há uma redução significativa no “burst” oxidativo nos camundongos que receberam o tratamento com o anticorpo em relação aos que não receberam, mostrando a importância dos neutrófilos nesta função de macrófagos.

A diferença no “pool” de ERO dos diferentes grupos foi confirmada pelo ensaio de redução do citocromo C, que é normalmente usado para estimar a produção de ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$). O que nós observamos é uma inibição total na produção de $O_2^{\cdot-}$ na situação onde há depleção de neutrófilos (Figura 10).

Figura 9. Efeito do tratamento com o mAbAG sobre a quimiluminescência na presença de luminol de macrófagos peritoneais. Animais da linhagem C57BL/6 foram injetados ou não com 250 µg de mAbAG pela via i.v. 36 horas depois os animais receberam 10µg de Con A i.p. Os animais controle foram injetados com PBS. Macrófagos peritoneais de C57BL/6 (1×10^6 células/ensaio) foram incubados com luminol (1mM) e PMA (55ng/mL). O meio da reação foi PBS 10mM pH 7.4, temperatura 37°C num volume final de 300µL. Representativo de 8 experimentos. *** $p < 0.001$ e # $p < 0.05$

Figura 10. Efeito do tratamento com o mAbAG na produção de ânion superóxido por macrófagos. Animais da linhagem C57BL/6 foram injetados ou não com 250 µg de mAbAG pela via i.v. 36 horas depois os animais receberam 10µg de Con A i.p. Os animais controle foram injetados com PBS. Macrófagos peritoneais de C57BL/6 (1×10^6 células/ensaio) foram incubados com citocromo C e estimulados com PMA (100 ng/mL). A reação foi monitorada em espectrofotômetro por 5 minutos em comprimento de onda de 550 nm. Representativo de 3 experimentos. * $p < 0.001$.

Além da atividade de NADPH oxidase, foi avaliado também o conteúdo peroxidásico destas células. Para isto utilizamos o ensaio de quimiluminescência amplificada por luminol na presença de homogenato de macrófagos e H_2O_2 (Figura 11).

Figura 11. Efeito do tratamento com o mAbAG sobre a atividade peroxidásica de macrófagos. Animais da linhagem C57BL/6 foram injetados ou não com 250 μ g de mAbAG pela via i.v. 36 horas depois os animais receberam 10 μ g de Con A i.p. Os animais controle foram injetados com PBS. Valores da média $\pm$ erro padrão da área integrada de emissão de luz obtida quando homogenatos de macrófagos peritoneais foram incubados com luminol (1mM) e H_2O_2 (0.5 mM). O meio da reação foi PBS 10mM pH 7.4, temperatura 37°C num volume final de 300 μ L. Os dados representam a média $\pm$ SEM 09 experimentos.

O NO, um outro produto secretado pelos macrófagos, tem sido apontado como um importante mediador biológico. Além de sua atividade microbicida, várias funções imunorregulatórias têm sido descritas para o NO (Bogdan 2001).

Avaliamos, portanto, a influência do tratamento com mAbAG na produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais. Verificamos que células peritoneais de camundongos injetados com Con A, tratados ou não com o mAbAG, quando estimuladas *in vitro* com LPS, têm uma produção significativa de NO em relação ao grupo controle (Figura 12).

Figura 12. Efeito do tratamento com o mAbAG sobre a produção de NO por células no peritônio em animais injetados com Con A. Animais da linhagem C57BL/6 foram injetados ou não com 250 µg de mAbAG pela via i.v. 36 horas depois os animais receberam 10µg de Con A i.p. Os animais controle foram injetados com PBS. 48 horas após a injeção de Con A, os animais foram sacrificados e os macrófagos peritoneais cultivados por 48 h na presença ou não de LPS (1µg/mL) onde foi determinada a produção de NO. Os dados correspondem à média ± SEM de 5 animais por grupo. * $p < 0.05$ em relação ao controle (com LPS) e # $p < 0.05$ em relação ao controle (espontâneo).

A atividade microbicida de células fagocíticas depende de diversos fatores solúveis como, citocinas, lipídeos bioativos e hormônios que podem promover a comunicação entre diferentes sistemas. Fazem parte do arsenal bioquímico envolvido na atividade de "killing" o sistema NADPH oxidase e as enzimas MPO e NOS, que são responsáveis pela mobilização de cátions e produção de ERO e ERN.

Diante dos resultados encontrados, resolvemos verificar se o tratamento com mAbAG afetaria a capacidade microbicida dos macrófagos. Para isto, avaliamos a contribuição de neutrófilos nas atividades de fagocitose e "killing" de macrófagos migrados para o peritônio em resposta a injeção de Con A.

A fagocitose e atividade de "killing" de macrófagos peritoneais obtidos após 48 hs da administração de Con A foram avaliadas nos tempos zero, 30, 60, 90 e 120 minutos. Os macrófagos peritoneais foram incubados com células leveduriformes de *C. albicans* opsonizadas em uma proporção de 1: 5. Após o período de incubação, foi feito um citocentrifugado onde foi avaliada a

porcentagem de fagocitose e morte de *C. albicans* pelos macrófagos (Figura 13). Aqui comparamos 3 grupos: macrófagos residentes, macrófagos de animais tratados com mAbAG e injetados com Con A e macrófagos de animais injetados com Con A.

Figura 13. Macrófagos contendo leveduras de *C. Albicans* viáveis (A) e não-viáveis (B).

Observamos que, tanto a atividade de fagocitose, quanto a capacidade fungicida dos macrófagos tratados com mAbAG, estão comprometidas. A fagocitose e morte de *C. albicans* por macrófagos ativados por Con A é bastante superior a dos macrófagos tratados com mAbAG, como pode ser observado nas Figuras 14 e 15. Há uma diferença extremamente significativa em ambos os processos, entre o grupo ativado por Con A comparado ao grupo tratado com Con A e com anticorpo e também com o grupo que não recebeu nenhum tratamento. Entretanto, não há diferença entre o grupo tratado com o anticorpo e o grupo que não recebeu nenhum tratamento (Figuras 14 e 15). Nossos resultados sugerem que neutrófilos ou os produtos sintetizados por eles modulam a atividade de fagocitose e "killing" de macrófagos.

(Nota da BCQ: Não foi possível capturar fielmente a imagem das figuras desta tese)

Figura 14. Efeito do tratamento com o mAbAG sobre a capacidade de fagocitose de *C. albicans* por macrófagos peritoneais de animais injetados ou não com Con A. Animais da linhagem C57BL/6 foram injetados ou não com 250 μ g de mAbAG pela via i.v. 36 horas depois os animais receberam 10 μ g de Con A i.p. Os macrófagos foram incubados com leveduras opsonizadas de *C. albicans* nos intervalos de 30, 60, 90 e 120 minutos onde foi avaliada a porcentagem de fagocitose. Os dados correspondem à média $\pm$ SEM de 4 experimentos, onde *** p <0.001 e ** p <0.05.

Figura 15. Efeito do tratamento com o mAbAG sobre a capacidade de "killing" de *C. albicans* por macrófagos peritoneais de animais injetados com Con A. Animais da linhagem C57BL/6 foram injetados ou não com 250 μ g de mAbAG pela via i.v. 36 horas depois os animais receberam 10 μ g de Con A i.p. Os macrófagos foram incubados com leveduras opsonizadas de *C. albicans* nos intervalos de 30, 60, 90 e 120 minutos onde foi avaliada a porcentagem de "killing". Os dados correspondem à média $\pm$ SEM de 4 experimentos, onde *** p <0.001 e ** p <0.05.

4.2 Discussão

A migração dos neutrófilos representa um dos primeiros eventos na resposta inflamatória aguda e crônica. Inicialmente, avaliamos o efeito da injeção *i.p.* de Con A sobre o influxo celular. A Con A induziu uma maior migração de células para o peritônio dos camundongos quando comparado aos controles (Figura 8). A contagem diferencial mostrou que 92% das células migradas, em resposta a Con A, eram células mononucleares, e uma quantidade mínima de leucócitos polimorfonucleares (PMN). Cabe ressaltar que nossos estudos foram iniciados 48 horas após a injeção *i.p.* de Con A.

Nos animais que receberam o tratamento com o mAbAG, antes da injeção de Con A, a migração celular foi comprometida (Figura 8), equiparando-se aos animais controle (macrófagos residentes). Estes resultados sugerem que a migração inicial de neutrófilos é fundamental para o posterior influxo de células mononucleares.

Os neutrófilos são fundamentais como primeira linha de defesa frente a uma infecção, e são células que liberam uma série de mediadores que podem induzir o acúmulo de células inflamatórias (Baggiolini and Clark-Lewis 1992; Kuna, Reddigari et al. 1993). Normalmente estas células morrem por apoptose no sítio inflamatório e são fagocitadas pelos macrófagos que persistem por muito mais tempo no local. Foi demonstrado que o “clearance” de neutrófilos interrompe a liberação de mediadores inflamatórios e que a administração de células apoptóticas aceleram a resolução da inflamação (Savill, Wyllie et al. 1989; Cox, Crossley et al. 1995); (Freire-de-Lima, Nascimento et al. 2000). Além disso, o influxo inicial de neutrófilos pode modificar a resposta das células Th e a susceptibilidade a algumas infecções como a *Leishmania major* (Ribeiro-Gomes, Otero et al. 2004).

A produção de ERO tem uma importante função na ativação de macrófagos e na destruição de patógenos (Ding, Nathan et al. 1988; Underhill and Ozinsky 2002). Estas espécies são geradas através de um processo denominado “burst” oxidativo, decorrente da ativação do sistema NADPH oxidase, acarretando a produção de ânion superóxido.

Utilizando a quimiluminescência amplificada por luminol e o ensaio de redução do citocromo observamos que houve uma forte inibição na produção de $O_2^{\cdot-}$ na situação onde há depleção de neutrófilos (Figura 9 e 10). Isto nos leva a acreditar que os neutrófilos ou produtos liberados por eles são fundamentais para a ativação dos macrófagos, pelo menos na ativação do sistema NADPH oxidase. Além da produção de ânion superóxido, o sistema NADPH oxidase é responsável pela passagem de H^+ e outros cátions, especialmente K^+ , para o interior do fagolisossoma, que também estão envolvidos no mecanismo microbicida dos fagócitos (Reeves, Lu et al. 2002).

A atividade peroxidásica, que reflete principalmente a atividade de MPO, também foi avaliada neste estudo. Houve uma diferença significativa entre os grupos que receberam Con A e os que não receberam, porém o tratamento com o mAbAG não afetou o conteúdo peroxidásico dos macrófagos (Figura 11). Aratani e cols. (2002), utilizando animais geneticamente deficientes para a MPO e para o sistema NADPH oxidase, mostraram a importância destas enzimas na capacidade microbicida dos macrófagos. Estes animais apresentaram níveis de susceptibilidade equivalentes para a *C. albicans*, indicando que a MPO é inábil na defesa do hospedeiro na ausência de NADPH oxidase, sugerindo que o H_2O_2 , o precursor do HOCl, é derivado somente do ânion superóxido produzido pelo sistema NADPH oxidase (Aratani, Kura et al. 2002).

Além das ERO, os derivados do nitrogênio também participam da atividade microbicida dos fagócitos (Ding, Nathan et al. 1988). O NO, formado pela reação de oxidação da L-arginina catalisada pela iNOS, reage com ânion superóxido formando $ONOO^-$ e NO_2^- , moléculas importantes para a função microbicida dos macrófagos (Bogdan 2001). Portanto, avaliamos a influência do tratamento com mAbAG na produção de NO pelos macrófagos peritoneais. Verificamos que macrófagos de camundongos injetados com Con A e estimulados *in vitro* por LPS produziram quantidades maiores de NO do que macrófagos de camundongos que não receberam injeção de Con A, independente do tratamento com o mAbAG (Figura 12). Aparentemente, a presença de neutrófilos não foi relevante para a produção desta molécula em nosso modelo experimental. Foi descrito anteriormente por Ribeiro-Gomes e cols. (2004), que a interação de macrófagos e neutrófilos é importante para o "killing" de *L. major*, sendo mediado por ERO, mas não por ERN (Ribeiro-Gomes, Otero et al. 2004).

Neste estudo observamos que o tratamento dos camundongos com o mAbAG comprometeu a produção de ânion superóxido pelos macrófagos peritoneais (Figura 10). Apesar desta molécula possuir baixa atividade microbicida sabemos que ela é importante para a geração de outras espécies mais potentes, como o HOCl. Além disso, cabe ressaltar que moléculas como ânions superóxido, HOCl e NO, atuam também como sinalizadores de eventos intracelulares, por exemplo, na ativação de fatores de transcrição importantes na síntese de citocinas (Schindler and Bogdan 2001; Pullar, Winterbourn et al. 2002; Singh, Balaraman et al. 2004).

Já foi demonstrado que a atividade candidida de macrófagos depende do metabolismo oxidativo (Lefkowitz, Gelderman et al. 1996; Marodi, Tournay et al. 1998; Moresco, Gaziri et al. 2002). Sendo assim avaliamos a importância dos neutrófilos na capacidade de fagocitose e “killing” de *C. albicans* dos macrófagos.

C. albicans é um patógeno oportunista que pode causar infecções mucocutâneas, gastrointestinais e sistêmicas, especialmente em pacientes neutropênicos e imunocomprometidos (Ashman, Farah et al. 2004). Macrófagos e neutrófilos são as principais células efetoras na resistência para infecções com *C. albicans* (Schuit 1979). Sabe-se que IFN- γ é um potente ativador do sistema imune e que exerce uma gama de efeitos em macrófagos, entre eles o aumento da atividade candidida em modelo murino (Romani, Mencacci et al. 1993; Gaziri, Gaziri et al. 1999).

Em nosso modelo experimental utilizamos macrófagos ativados *in vivo* por Con A. A ativação por Con A ocorre pela ligação direta dos carboidratos presentes na superfície de macrófagos ao receptor de célula T (TCR) nas células Th, induzindo uma resposta Th1, ou seja, aumento de IFN- γ (Romani, Mencacci et al. 1993). Foi bem demonstrado que citocinas produzidas por linfócitos Th1 ativam a capacidade fungicida de neutrófilos e macrófagos (Djeu 1992) e que Con A estimula a migração e ativação dos macrófagos (Loyola, Gaziri et al. 2002).

Observamos que macrófagos de animais injetados com Con A fagocitaram mais de 85% das leveduras de *C. albicans* no período de 60 minutos, enquanto os macrófagos tratados com mAbAG fagocitaram menos de 40% no mesmo período,

praticamente a mesma porcentagem dos macrófagos não tratados com Con A (Figura 14 e 15).

A fagocitose se dá após o reconhecimento de patógenos através de receptores específicos presentes na membrana dos fagócitos. Macrófagos se ligam a *C. albicans* opsonizada por receptores como FcR ou CR (Linehan, Martinez-Pomares et al. 2000). O CR3 (Mac 1 ou CD11b/CD18) é um importante receptor envolvido na ligação de *C. albicans* opsonizada com o C3b de macrófagos (Ehlers 2000). Foi demonstrado que a fagocitose mediada por CR3 é dependente da proteína Rho, enquanto que aquela mediada por FcR é dependente da proteína Rac, que está envolvida na ativação do sistema NADPH oxidase (Capo, Meconi et al. 1998; Caron and Hall 1998)(Figura 2). Apesar de não ter sido avaliado neste estudo é provável que a eficiência destes receptores esteja comprometida, uma vez que macrófagos tratados com mAbAG tiveram uma diminuição na fagocitose de *C. albicans* e também no “burst” oxidativo (Figura 14 e 9).

Da mesma forma que o processo de fagocitose, a capacidade microbicida dos macrófagos ativados por Con A foi bastante superior a dos macrófagos tratados com mAbAG (Figura 15). No período de 120 minutos macrófagos ativados por Con A mataram cerca de 35% das leveduras de *C. albicans* enquanto macrófagos tratados com o anticorpo antes da injeção de Con A mataram 11%. Estes dados sugerem que macrófagos que não tiveram contato com neutrófilos no foco inflamatório comportam-se de maneira semelhante aos macrófagos residentes, pelo menos na produção de ERO e na capacidade fagocítica e microbicida. Consistente com nossos resultados foi descrito que a depleção de neutrófilos aumentou, em camundongos, a susceptibilidade para a candidíase vaginal e sistêmica (Vazquez-Torres, Jones-Carson et al. 1994; Fulurija, Ashman et al. 1996). A importância desta interação celular foi demonstrada também por Freire-de-Lima e cols. (2000), que mostraram que macrófagos quando fagocitam células apoptóticas secretam TGF- β , que por sua vez suprime a expressão de citocinas pró-inflamatórias e aumenta a síntese de putrescina, propiciando a replicação do *T.cruzi* em macrófagos (Freire-de-Lima, Nascimento et al. 2000).

Apesar do conteúdo de MPO no nosso modelo não ter sofrido nenhuma alteração (Figura 11), a atividade de “killing” e fagocitose estão comprometidas,

mostrando a importância da geração de ânion superóxido, pelo sistema NADPH oxidase, nesta atividade dos macrófagos (Figura 10).

Sabe-se que além das ERO, proteínas secretadas para o fagossoma (lisozimas, proteases neutras e ácidas, fosfolipases e proteínas catiônicas) têm também um papel importante no processo de “killing” de patógenos (Belaaouaj, McCarthy et al. 1998; Tkalecivic, Novelli et al. 2000). Foi demonstrado que a elastase de neutrófilos está envolvida na atividade leishmanicida de macrófagos murino (Ribeiro-Gomes, Otero et al. 2004) e que animais deficientes em catepsina G e elastase, mas normais na produção de ânion superóxido, são menos resistentes a infecções por *Staphylococcus aureus* e *C. albicans* (Reeves, Lu et al. 2002). Foi mostrado ainda que a elastase e outras proteases presentes nos grânulos azurófilos de neutrófilos, induzem a liberação de TNF- α , *in vivo* e *in vitro* (Fadok, Bratton et al. 2001); (Adkison, Raptis et al. 2002), induzindo a produção de ERO em macrófagos (Speer, Pabst et al. 1984; Goossens, Grooten et al. 1995).

Nossos resultados mostraram que neutrófilos, ou produtos sintetizados por eles, modulam positivamente a atividade de fagocitose e “killing” de macrófagos. Estes dados sugerem que a interação entre macrófagos e neutrófilos é importante para a ativação de macrófagos e desempenha um papel crítico na defesa do organismo contra patógenos. Isto é especialmente importante, no caso de pacientes neutropênicos e imunocomprometidos.

5. Capítulo 2

Modulação da atividade de células mononucleares por melatonina e seus produtos de oxidação

Resultados e Discussão

5.1 Resultados

Visando ampliar os estudos sobre a melatonina e seus metabólitos na modulação do processo inflamatório, avaliamos o efeito desses compostos na liberação de citocinas pró-inflamatórias por células mononucleares humanas e na capacidade microbicida de macrófagos murino. As citocinas estudadas aqui foram IL-8, TNF- α , IL-12, IFN- γ e IL-10.

Efeito de melatonina, AFMK e AMK na liberação de citocinas pró-inflamatórias por células mononucleares.

A liberação de IL-8 foi medida em cultura de 18h de células mononucleares incubadas com melatonina, AFMK ou AMK, na presença ou não de LPS. Os compostos na faixa analisada (0,001-1mM) não afetam a produção basal de IL-8, o mesmo é observado quando as células são estimuladas com LPS (Figura 16). A liberação de IL-8 foi avaliada também em cultura de 48 h, mas nenhum efeito foi observado (dados não mostrados).

Figura 16. Efeito de melatonina (A), AFMK (B) e AMK (C) na liberação de IL-8 por células mononucleares.

Figura 16. Efeito de melatonina (A), AFMK (B) e AMK (C) na liberação de IL-8 por células mononucleares. As células (2.5×10^5 células/mL) foram incubadas com melatonina, AFMK ou AMK (0.001; 0.01; 0.1; e 1.0 mM) na ausência ou presença de LPS (1.0 μ g/mL). As citocinas foram dosadas no sobrenadante da cultura de 18 h por ELISA. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão de 5 experimentos.

O efeito de melatonina, AFMK e AMK (0,001-1mM) na liberação de TNF- α são mostrados na figura 17 e 18. TNF- α foi medido em cultura de 18 e 48 h de células mononucleares com os compostos, na presença ou não de LPS. A produção basal de TNF- α não é afetada pela presença de melatonina, AFMK ou AMK (Figura 17 e 18). Quando células mononucleares foram mantidas em cultura por 18 h na presença de LPS, somente AFMK em concentrações altas (0.01 e 1.0 mM) teve efeito sobre a liberação de TNF- α (Figura 17). Entretanto, em cultura de 48 h, os três compostos testados inibem a liberação de TNF- α , quando são utilizadas concentrações maiores (0.01 a 1.0 mM) (Figuras 18), num efeito dose dependente. Na concentração de 1 mM, AFMK é o composto mais eficiente, promovendo uma redução de aproximadamente 80% na liberação de TNF- α (Figura 18). Na menor concentração testada (0.001 mM) não houve diferença estatística (Figura 18 A, B e C).

Figura 17. Efeito de melatonina (A), AFMK (B) e AMK (C) na liberação de TNF- α por células mononucleares (cultura de 18 h).

Figura 17. Efeito de melatonina (A), AFMK (B) e AMK (C) na liberação de TNF- α por PBMC. As células (2.5×10^5 células/mL) foram incubadas com melatonina, AFMK ou AMK (0.001; 0.01; 0.1; e 1.0 mM) na ausência ou presença de LPS (2.5 μ g/mL). As citocinas foram dosadas no sobrenadante da cultura de 18 h por ELISA. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão de 5 experimentos. ** $p < 0.01$.

Figura 18. Efeito de melatonina (A), AFMK (B) e AMK (C) na liberação de TNF- α por células mononucleares (cultura de 48 h).

Figura 18. Efeito de melatonina (A), AFMK (B) e AMK (C) na liberação de TNF- α por células mononucleares. As células (2.5×10^6 células/mL) foram incubadas com melatonina, AFMK ou AMK (0.001; 0.01; 0.1; e 1.0 mM) na ausência ou presença de LPS (2.5 μ g/mL). As citocinas foram dosadas no sobrenadante da cultura de 48 h por ELISA. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão de 4 experimentos. ** $p < 0.01$ e *a* para AFMK diferente de AMK e melatonina.

Para avaliar o efeito de melatonina, AFMK e AMK na liberação de IFN- γ , nós utilizamos células mononucleares estimuladas ou não com Con A (cultura de 48 h). A produção basal de IFN- γ não é afetada pelos compostos testados. Quando as células são estimuladas com Con A, nós observamos uma inibição dose dependente na liberação de IFN- γ . Esta inibição ocorre quando são utilizadas altas concentrações dos compostos (0.01 a 1.0 mM). Os compostos, quando utilizados em concentração baixa (0.001 mM), não inibem a liberação de IFN- γ (Figura 19).

Figura 19. Efeito de melatonina (A), AFMK (B) e AMK (C) na liberação de IFN- γ por células mononucleares.

Figura 19. Efeito de melatonina (A), AFMK (B) e AMK (C) na liberação de IFN- γ por células mononucleares. As células (2.5×10^6 células/mL) foram incubadas com melatonina, AFMK ou AMK (0.001; 0.01; 0.1; e 1.0 mM) na ausência ou presença de Con A (10 μ g/mL). As citocinas foram dosadas no sobrenadante da cultura de 48 h por ELISA. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão de 5 experimentos. ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$.

Nossos estudos mostram uma forte inibição na liberação de IL-12 tanto por melatonina quanto pelos seus produtos de oxidação, AFMK e AMK (em todas as concentrações testadas), quando monócitos são estimulados com IFN- γ (Figura 20). AMK nas concentrações de 0.1 e 1.0 mM inibe a liberação de IL-12 com maior eficiência que AFMK e melatonina. A produção basal de IL-12 por monócitos não é afetada pela melatonina, AFMK e AMK (Figura 20).

Avaliamos também o efeito de melatonina, AFMK e AMK sobre a liberação de IL-10 por células mononucleares, porém nenhum efeito foi observado (Figura 21).

O fato de melatonina e seus metabólitos inibirem a liberação de citocinas poderia ser decorrente de um efeito citotóxico desses compostos, que levasse à perda de viabilidade celular. Entretanto, esta possibilidade foi descartada pela técnica de exclusão com azul de tripan para avaliar a viabilidade celular (dados não mostrados) e também por citometria de fluxo com marcação com anexina/iodeto de propídio (PI) e através de ensaios de fragmentação de DNA (Pedroza, A. tese de doutorado).

Figura 20. Efeito de melatonina (A), AFMK (B) e AMK (C) na liberação de IL-12 por monócitos.

Figura 20. Efeito de melatonina (A), AFMK (B) e AMK (C) na liberação de IL-12 por monócitos. As células (2.5×10^6 células/mL) foram incubadas com melatonina, AFMK ou AMK (0.001; 0.01; 0.1; e 1.0 mM) na ausência ou presença de IFN- γ (100 ng/mL). As citocinas foram dosadas no sobrenadante da cultura de 48 h por ELISA. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão de 4 experimentos. ** $p < 0.01$. a para AFMK diferente de melatonina, b para AMK diferente de melatonina e c para AMK diferente de AFMK.

Figura 21. Efeito de melatonina (A), AFMK (B) e AMK (C) na liberação de IL-10 por monócitos.

Figura 21. Efeito de melatonina (A), AFMK (B) e AMK (C) na liberação de IL-10 por monócitos. As células (2.5×10^6 células/mL) foram incubadas com melatonina, AFMK ou AMK (0.001; 0.01; 0.1; e 1.0 mM) na ausência ou presença de Con A (10 μ g/mL). As citocinas foram dosadas no sobrenadante da cultura de 48 h por ELISA. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão de 3 experimentos.

Formação de AFMK e AMK durante a oxidação de melatonina por células mononucleares

Considerando que macrófagos ativados via PMA oxidam melatonina à AFMK (Rodrigues, Rodriguez et al. 2003) e que este por sua vez é deformilado formando AMK, pode-se esperar que a redução observada na liberação de TNF- α , IFN- γ e IL-12, por células mononucleares ativadas incubadas com melatonina, tenha a contribuição de ambos, AFMK e AMK. Da mesma forma que a contribuição de AMK é esperada onde células mononucleares ativadas são incubadas com AFMK. Para verificarmos a contribuição destes produtos (AFMK e AMK), eles foram identificados e quantificados por HPLC, nas mesmas condições empregadas na dosagem de citocinas. Para tanto, o sobrenadante recuperado após 0, 15, e 30 minutos e 1, 2, 4 e 18 horas das culturas de células mononucleares mantida em RPMI-1640 na presença de 0,1 mM de melatonina e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de LPS foi analisado. Para efeito comparativo foram feitos experimentos com células mononucleares ativadas com PMA (55 ng/mL). A concentração de AFMK e AMK obtida nestas culturas (Figura 21) foi calculada pela curva padrão mostrada em Material e Métodos. A condição cromatográfica utilizada aqui possibilita uma separação eficiente e uma quantificação sensível de AFMK e AMK.

A cinética de formação de AFMK e AMK mostra que células mononucleares ativadas com LPS ou PMA convertem melatonina em AFMK (Figura 22A) e também AMK (Figura 22B). A formação de AFMK pode ser observada em períodos curtos de incubação e aumenta com o tempo. A ativação de células mononucleares por PMA produz concentrações maiores de AFMK e AMK do que ativação por LPS. Quando as células são estimuladas por LPS, o AMK só pode ser detectado após 18 h de incubação (Figura 22B). A concentração de AMK nas culturas é relativamente baixa quando comparada com o seu precursor AFMK.

Figura 22. Cinética de formação de AFMK (A) e AMK (B) por células mononucleares.

Figura 22. Cinética de formação de AFMK (A) e AMK (B) por células mononucleares (7.5×10^5 cells/mL) após incubação a 37° C com melatonina (0.1 mM) na presença de PMA (55 ng/mL) ou LPS (1,0 µg/mL) em meio de cultura RPMI. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes (duplicata).

Para discriminar a participação de monócitos na oxidação de melatonina, nós isolamos monócitos da população mista de células mononucleares. Monócitos purificados são mais eficientes em promover a oxidação de melatonina a AFMK, sendo que a produção de AFMK é aproximadamente 10 vezes maior do que PBMC (Figura 23).

Figura 23. Cinética de formação de AFMK por PBMC e monócitos.

Figura 23. Cinética de formação de AFMK por PBMC (■) ou monócitos (■) ($2,5 \times 10^6$ células/mL) após incubação a 37°C com melatonina (0,1 mM) na presença de LPS (1,0 µg/mL) em meio de cultura RPMI. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 4 experimentos.

Esses resultados confirmam a hipótese de que nos sistemas onde células mononucleares estimuladas são incubadas com melatonina ou com AFMK, há a contribuição, respectivamente, de AFMK e AMK, na redução da liberação de TNF- α , IFN- γ e IL-12. Estas citocinas têm um papel importante na atividade microbicida de fagócitos mononucleares.

Sendo assim, nós avaliamos o efeito da melatonina e seus metabólitos sobre a capacidade microbicida destas células. Para isto, usamos um modelo animal, onde macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados com tripomastigotas de *T. cruzi*.

Com esse objetivo, macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram cultivados por 24 horas na presença ou não de melatonina, AFMK e AMK. Após

esse período, foi realizada a infecção das culturas com tripomastigotas de *T. cruzi* na proporção de 1:2 (1 macrófagos: 2 parasitas) por 4 horas. As culturas foram lavadas para remoção dos parasitas extracelulares e foram mantidas por 48 horas adicionais com rIFN- γ . A capacidade microbicida dos macrófagos foi avaliada pela determinação do número de amastigotas (forma intracelular do *T. cruzi*) presentes no interior das células, como mostra a figura 24.

Figura 24. Avaliação da capacidade de replicação do *T. cruzi* em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 tratados ou não com MLT, AFMK e AMK na presença de rIFN- γ (100 pg/mL). Os experimentos foram repetidos 3 vezes com o mesmo padrão de resultados (n=3). Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão dos diferentes experimentos. ***p<0.001 para as células tratadas somente com rIFN- γ e ###p<0.05 para os valores obtidos com MLT em relação aos valores obtidos para AFMK e AMK.

O tratamento com rIFN- γ induz um aumento na capacidade microbicida dos macrófagos bastante significativo em relação aos macrófagos previamente tratados com a melatonina e seus produtos de oxidação (Figura 24). O número de macrófagos infectados com amastigotas de *T. cruzi* é aproximadamente 11, 19 e 21 vezes maior quando são previamente tratados com melatonina, AFMK e AMK respectivamente, comparados com macrófagos tratados somente com rIFN- γ (Figura 24). Neste caso, a diferença entre os compostos é bastante significativa,

sendo que a atividade microbicida é mais comprometida na presença de AFMK e AMK do que de melatonina.

Foi demonstrado que NO exerce papel importante na capacidade microbicida dos macrófagos frente ao *T. cruzi* (Vespa, Cunha et al. 1994). Desta forma, avaliamos a liberação de NO nas culturas de macrófagos infectados com *T. cruzi* na presença de melatonina, AFMK ou AMK (Figura 25).

Figura 25. Efeito do tratamento com MLT, AFMK e AMK na produção de NO por macrófagos peritoneais infectados com tripomastigotas de *T. cruzi* na presença de rIFN- γ (100 pg/ml). Os experimentos foram repetidos 3 vezes com o mesmo padrão de resultados (n=3). Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão dos diferentes experimentos. **p<0.05 em relação aos valores obtidos para as células tratadas somente com rIFN- γ .

Como mostra a Figura 25, os macrófagos que foram previamente incubados com melatonina, AFMK e AMK apresentaram uma produção deficiente de NO em resposta ao rIFN- γ , quando comparada aos níveis de NO produzidos pelas células que foram incubadas somente com rIFN- γ . Esses resultados sugerem que MLT, AFMK e AMK influenciam negativamente a capacidade dos macrófagos peritoneais produzirem NO em resposta à estimulação com IFN- γ , comprometendo a capacidade microbicida dos macrófagos neste modelo de infecção com o *T. cruzi*.

5.2 Discussão

O início de um processo inflamatório caracteriza-se pela liberação de citocinas de “alarme”, entre elas TNF- α e IL-8. A secreção destas citocinas é fortemente induzida por LPS e é dependente da ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 (Schreck, Albermann et al. 1992; McDonald, Bald et al. 1997; Borish and Steinke 2003).

Nossos resultados mostraram que LPS estimulou fortemente as células mononucleares a produzirem IL-8 (Figura 16). Entretanto, a adição de melatonina, AFMK ou AMK nas concentrações testadas (0,001-1mM) não afetaram a produção de IL-8 por células mononucleares, ativados ou não por LPS (Figura 16). A produção basal de TNF- α também não foi afetada pela presença de melatonina, AFMK ou AMK (Figura 17 e 18). Quando avaliamos a liberação de TNF- α em cultura de 18h, vimos que somente AFMK em concentrações mais altas (0.01 e 1 mM) teve efeito inibitório.

Em trabalho recente do grupo, foi mostrado que melatonina e seus metabólitos inibem eficientemente a liberação de IL-8 e TNF- α por neutrófilos estimulados com LPS em cultura de 18h (Silva, Rodrigues et al. 2004). Aqui, curiosamente vimos inibição na liberação de TNF- α somente em cultura de 48h. Quando avaliamos esta liberação, em cultura de 48h, observamos que melatonina, AFMK e AMK em concentrações maiores, inibiram a liberação de TNF- α sendo que na concentração de 1 mM, o AFMK foi o mais eficiente (cerca de 80% de inibição), com uma diferença significativa em relação a melatonina e ao AMK (Figura 18). Vários trabalhos amparam a modulação negativa da melatonina na secreção TNF- α (Di Stefano and Paulesu 1994; Liu, Ng et al. 2001) embora outros estudos tenham mostrado um aumento na secreção desta citocina pelo tratamento com melatonina (Reiter, Calvo et al. 2000; Jaworek, Leja-Szpak et al. 2003). Ainda não existem estudos sobre o efeito dos metabólitos da melatonina na secreção de citocinas. Avaliamos também a liberação de IL-8 por células mononucleares em cultura de 48h e nenhum efeito foi observado (dados não mostrados).

ERO são capazes de ativar vias de sinalização, importantes na inflamação, como ativação de NF- κ B e AP-1 (Hensley, Robinson et al. 2000). A inibição da

produção de citocinas por melatonina e seus metabólitos é consistente com a ativação dessas vias de sinalização. De fato, foi descrito que melatonina inibe a ativação do fator de transcrição NF- κ B (Mohan, Sadeghi et al. 1995; Lezoualc'h, Sparapani et al. 1998). Vale acrescentar ainda que melatonina estimula a expressão gênica de algumas enzimas antioxidantes como SOD, CAT e GPx (Antolin, Rodriguez et al. 1996; Rodriguez, Mayo et al. 2004) e que estas enzimas inibem a ativação de NF- κ B (Tak and Firestein 2001).

Apesar da secreção de IL-8 por neutrófilos ter sido inibida pelo tratamento com a melatonina e seus metabólitos (Silva, Rodrigues et al. 2004), o mesmo não foi observado em células mononucleares. Uma provável explicação para esta especificidade celular pode ser que o efeito oxidante/antioxidante na ativação/desativação de fatores transcricionais varie de célula para célula (Michiels, Minet et al. 2002). É possível que neutrófilos sejam um alvo inicial para os efeitos de melatonina e seus metabólitos, uma vez que IL-8 e TNF- α são produzidas nos primeiros momentos da inflamação, onde a migração de neutrófilos é superior a de monócitos.

Com o objetivo de melhor compreendermos os efeitos de melatonina e de seus metabólitos, avaliamos também a liberação de IL-12 e IFN- γ por células mononucleares. Estas citocinas além de serem importantes na resposta imune inata, participam também da transição para a resposta imune específica.

A IL-12, uma citocina produzida principalmente por monócitos, macrófagos e células dendríticas, possui uma função central no direcionamento das respostas imunes, atribuída em grande parte à sua capacidade de estimular a produção de IFN- γ por células NK, linfócitos T e por macrófagos. O IFN- γ é a mais importante citocina da imunidade celular, aumenta a capacidade de apresentação de antígenos e a atividade microbicida dos macrófagos (Borish and Steinke 2003; Beutler 2004).

Nossos estudos mostraram uma inibição significativa na liberação de IL-12 por monócitos humanos, tanto pelo tratamento com melatonina quanto por seus produtos de oxidação, em todas as concentrações estudadas (Figura 20). AFMK e AMK foram significativamente mais eficientes em inibir a liberação de IL-12 do que a melatonina. Avaliamos também a liberação de IL-12 por PBMC e o mesmo perfil de inibição foi observado (dados não mostrados).

A liberação de IFN- γ por células mononucleares também foi inibida pelo tratamento com melatonina, AFMK e AMK; neste caso não houve diferença estatística entre os compostos (Figura 19). Para IFN- γ , da mesma forma que TNF- α , os dados da literatura mostram resultados contraditórios, pois vários trabalhos mostram que melatonina diminui a secreção destas citocinas (Pioli, Caroleo et al. 1993; Garcia-Maurino, Gonzalez-Haba et al. 1997), enquanto outros mostram um efeito contrário (Di Stefano and Paulesu 1994; Mohan, Sadeghi et al. 1995; Shaji, Kulkarni et al. 1998).

A IL-12, secretada por fagócitos mononucleares, induz a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ para a subpopulação Th1, que por sua vez secreta citocinas como IFN- γ , IL-2 e IL-12. Da mesma forma, a IL-4 induz a diferenciação para a subpopulação Th2, que secreta citocinas como IL-4 e IL-10, entre outras (Borish and Steinke 2003).

Foi descrito que em camundongos tratados com melatonina houve um aumento na produção de citocinas do padrão Th2, como IL-4, IL-10 e TGF- β (Maestroni 1995; Shaji, Kulkarni et al. 1998; Raghavendra, Singh et al. 2001). Estas citocinas são conhecidas por suas propriedades imunossupressivas e antiinflamatórias (Baggiolini, Dewald et al. 1997).

IL-10 é hábil em suprimir a produção de IL-12, IFN- γ e outras citocinas Th1 (Baggiolini, Dewald et al. 1997; Borish and Steinke 2003). Nossos resultados sugerem que, aparentemente, a IL-10 não foi responsável pela inibição da liberação de IL-12 e IFN- γ , uma vez que a secreção de IL-10 não foi afetada pelo tratamento com os compostos (Figura 21). As concentrações de IL-4 e TGF- β não foram avaliadas, mas se elevadas, poderia explicar a diminuição de IL-12 e consequentemente de IFN- γ pelo tratamento com a melatonina e seus produtos de oxidação.

De uma forma geral os produtos da oxidação da melatonina tiveram um efeito mais pronunciado do que a própria melatonina. Considerando que o produto principal da oxidação da melatonina por células mononucleares é o AFMK (Rodrigues, Rodriguez et al. 2003), e que a deformilação desse composto leva ao AMK, pode-se esperar que a redução na liberação das citocinas por células ativadas incubadas com melatonina tenha a contribuição de ambos, AFMK e

AMK. Da mesma forma, podemos esperar que no sistema onde seja colocado o AFMK teremos a contribuição de AMK.

Verificamos que células mononucleares ativadas com LPS ou PMA convertem melatonina em AFMK e AMK (Figura 22 A e B). A formação de AFMK foi observada em períodos curtos de incubação e aumentou com o tempo. A ativação de células mononucleares por PMA produziu concentrações maiores de AFMK e AMK do que ativação por LPS (Figura 22 A e B). Isto se deve provavelmente a maior habilidade de PMA em relação a LPS em induzir a produção de ânion superóxido e a degranulação de MPO, o que favorece a oxidação de melatonina.

A concentração de AMK nas culturas é relativamente baixa quando comparada com o seu precursor AFMK. AMK pode ser formado por uma rota enzimática de deformilação de AFMK ou então por uma rota química. A baixa quantidade de AMK pode ser devido a deformilação ineficiente de AFMK em células mononucleares. Uma outra possibilidade é que AMK formado poderia ser subsequentelemente metabolizado. Dados do grupo mostram que AMK é oxidado pela própria MPO (Silva, Rodrigues et al. 2004) e recentemente um estudo descreve a alta reatividade de AMK com ERO (Ressmeyer, Mayo et al. 2003). Conseqüentemente, a concentração de AMK encontrado em nossos experimentos poderia representar apenas uma fração da concentração total produzida pela deformilação de AFMK. Isto confirma nossa hipótese de que no sistema onde células mononucleares estimuladas são incubadas com melatonina, há a contribuição de AFMK na redução da liberação de TNF- α , IFN- γ , IL-12. Da mesma forma que no sistema onde células mononucleares estimuladas são incubadas com AFMK existirá a contribuição de AMK.

Quando separamos monócitos da população mista de células mononucleares, vimos que a oxidação de melatonina é muito superior em monócitos (cerca de 10 vezes mais). Se considerarmos que monócitos representam aproximadamente 10% da população mista de células mononucleares, podemos sugerir que monócitos são os principais responsáveis pela oxidação de melatonina (Figura 23).

A oxidação da melatonina por células inflamatórias pode ser uma das rotas de metabolização da melatonina e formação de compostos biologicamente ativos como AFMK e AMK. AFMK pode ser sintetizado no sistema nervoso central (Tan,

Manchester et al. 2001) e nós acreditamos que esta síntese também ocorra no foco inflamatório, uma vez que este ambiente possui todas as condições necessárias, como ERO e MPO, para que melatonina se converta em AFMK. Fica evidente que a importância da oxidação de melatonina *in vivo* dependerá de algumas condições como a concentração de melatonina no foco inflamatório e de uma fonte bioquímica eficiente de ERO. É possível que estas duas condições ocorram *in vivo* uma vez que monócitos (Finocchiaro, Nahmod et al. 1991), macrófagos (Martins, Ferreira et al. 2004) e linfócitos (Carrillo-Vico, Calvo et al. 2004) podem sintetizar melatonina e fagócitos ativados são capazes de produzir altas quantidades de ERO (Babior 1999).

Demonstramos que a melatonina é oxidada principalmente por monócitos originando produtos que inibem a liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IFN- γ e IL-12. Estas citocinas têm uma participação efetiva na atividade fagocítica e microbicida de fagócitos (Baggiolini, Dewald et al. 1997; Borish and Steinke 2003). De fato, a importância destas citocinas na capacidade microbicida de macrófagos foi reportada para inúmeros tipos de infecção, como leishmaniose, listeriose, toxoplasmose, esquistossomose, tuberculose, candidíase, malária, doença de chagas, entre outras (Crutcher, Stevenson et al. 1995; Aliberti, Cardoso et al. 1996; Toossi, Mincek et al. 1997; Silva, Aliberti et al. 1998; Stobie, Gurunathan et al. 2000; Moresco, Gaziri et al. 2002).

T. cruzi é um parasita capaz de multiplicar-se no interior de macrófagos. Estudos anteriores mostraram que os macrófagos infectados pelo *T. cruzi* rapidamente produzem IL-12 que estimula a produção de IFN- γ por células NK, induzindo um aumento na capacidade microbicida dos macrófagos (Silva, Aliberti et al. 1998). Em contrapartida, a IL-10 e o TGF- β inibem a ativação dos macrófagos em resposta ao *T. cruzi*, regulando não apenas a síntese de IL-12, como neutralizando seus efeitos, especialmente a produção de IFN- γ induzida por ela (Silva, Twardzik et al. 1991; Silva, Morrissey et al. 1992). Porém, essa desativação pode ser importante para a prevenção de danos teciduais mediados pela produção de IFN- γ e IL-12 (Vodovotz, Bogdan et al. 1993).

Para avaliar se melatonina e seus metabólitos seriam capazes de influenciar a capacidade microbicida dos fagócitos mononucleares, nós usamos

um modelo experimental em que macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados com tripomastigotas de *T. cruzi*.

Nossos resultados mostraram que o tratamento com rIFN- γ teve um efeito positivo no controle do parasita pelos macrófagos murino, abolindo quase que completamente a replicação do parasita (Figura 24). Porém, os macrófagos tratados com a melatonina, AFMK e AMK mostraram uma deficiência na capacidade microbicida frente ao *T. cruzi*. Isto é, macrófagos tratados com melatonina mostraram-se mais permissivos à replicação do *T. cruzi* com um número 11 vezes maior da forma amastigota em seu interior do que macrófagos tratados somente com rIFN- γ . Quando os macrófagos foram tratados com AFMK e AMK a replicação foi ainda mais intensa, sendo 20 e 21 vezes respectivamente maior que em macrófagos tratados somente com rIFN- γ (Figura 24). Neste caso, a oxidação da melatonina estaria comprometendo a capacidade microbicida do macrófago. Isto poderia ser uma estratégia de sobrevivência do parasita, uma vez que *T. cruzi* é capaz de sintetizar melatonina (Macias, Rodriguez-Cabezas et al. 1999) e que estes parasitas multiplicam-se no interior de células que contêm as enzimas necessárias para que esta oxidação ocorra (Ozaki, Edelstein et al. 1988; Rodrigues, Rodriguez et al. 2002).

IFN- γ regula a capacidade microbicida dos macrófagos, especialmente através da indução da produção de NO (Gazzinelli, Oswald et al. 1992). NO parece ter um papel central na morte do *T. cruzi*, uma vez que o tratamento de camundongos C57BL/6 com inibidores de iNOS, os torna susceptíveis à infecção (Vespa, Cunha et al. 1994). Ainda, o tratamento de tripomastigotas com S-nitroso-acetyl-penicilamina, um doador de NO, é capaz de induzir a morte desses parasitas *in vitro* na ausência de qualquer tipo celular, mostrando o papel direto do NO na morte do *T. cruzi*.

Aqui, macrófagos infectados com *T. cruzi*, quando tratados com melatonina, AFMK e AMK, mostraram uma diminuição nos níveis de NO quando comparados com os macrófagos tratados apenas com IFN- γ (Figura 25). Nossos resultados mostraram que a diminuição da capacidade microbicida dos macrófagos foi coincidente com a diminuição dos níveis de NO (Figura 25), mostrando a importância desta molécula no controle deste parasita. Vários estudos já mostraram o efeito inibitório da melatonina sobre a expressão da iNOS

em macrófagos murino, desta forma diminuindo a produção de NO (Gilad, Wong et al. 1998). Ainda, foi mostrado que TGF- β , secretado por macrófagos, promove uma regulação negativa na produção de NO, aumentando a replicação de *T. cruzi* nestas células (Ribeiro-Gomes, Otero et al. 2004).

Apesar de ter sido estudado em modelos diferentes, podemos traçar um paralelo entre a inibição na liberação de citocinas próinflamatórias por células mononucleares humanas e a diminuição da atividade microbica de macrófagos murino pelo tratamento com melatonina, AFMK e AMK.

A baixa concentração de TNF- α poderia contribuir para a susceptibilidade dos macrófagos peritoneais dos camundongos frente ao *T. cruzi*, pois esta molécula parece estar intimamente envolvida no controle da infecção por esse parasita. Já foi demonstrado anteriormente que o tratamento de camundongos C57BL/6, resistentes à infecção pelo *T. cruzi*, com anticorpos monoclonais anti-TNF- α , aumenta a parasitemia e a mortalidade desses animais (Freire-de-Lima, Nascimento et al. 2000).

A IL-12 além da produção de IFN- γ , influencia outras funções efectoras dos macrófagos, por exemplo, a capacidade de controlar a expressão do mRNA para TGF- β em monócitos e células da medula óssea (Wilkinson, Aung et al. 2000). O TGF- β , conhecido como citocina desativadora de macrófagos, além de inibir a produção de IL-12, interfere na produção de IFN- γ , culminando na diminuição da capacidade microbica dos macrófagos (Silva, Twardzik et al. 1991). Como descrito anteriormente, melatonina aumenta a expressão do mRNA para TGF- β (Liu, Ng et al. 2001; Raghavendra, Singh et al. 2001).

Estes dados, em conjunto, mostram que melatonina e seus produtos de oxidação inibem a liberação de citocinas importantes no desenvolvimento da resposta imune, diminuindo a capacidade microbica de fagócitos.

Estes aspectos devem ser considerados no uso terapêutico da melatonina, especialmente quando doses farmacológicas desse composto são administradas.

Nossos resultados contribuem para a compreensão da atividade antiinflamatória da melatonina. Também demonstramos que AFMK e AMK são tanto ou mais potentes que a melatonina nas funções avaliadas neste estudo.

O fato de que células mononucleares oxidam melatonina, ampara fortemente a idéia de que pelo menos parte dos efeitos descritos para este hormônio sejam

mediados por seus metabólitos. Nossos estudos contribuem para ampliar o conhecimento sobre o papel imunomodulador descrito para melatonina e estender estes efeitos aos seus produtos de oxidação, AFMK e AMK (Figura 26).

Figura 26 – Síntese e metabolização de melatonina por leucócitos.

(L= linfócito, N= neutrófilo M=monócito/macrófago, MLT= melatonina)

- ⇌ Síntese
- Metabolização
- Efeito

Conclusões

6. Conclusões

Capítulo 1: Efeito da depleção de neutrófilos sobre a ativação de macrófagos

Nossos resultados demonstraram que a depleção de neutrófilos:

- compromete a migração de células mononucleares para o foco da inflamação, mostrando a importância da migração inicial de neutrófilos para o posterior influxo de células mononucleares;
- diminui a atividade do sistema NADPH oxidase de macrófagos, comprometendo a produção de ânion superóxido;
- não altera a atividade das enzimas MPO e iNOS, uma vez que a atividade peroxidásica e a produção de NO não são afetadas pelo tratamento com o anticorpo anti-granulócitos.

O comprometimento na produção ânion superóxido pode modificar a produção de outras ERO mais potentes, a capacidade fagocítica e fungicida de macrófagos, mesmo com uma atividade normal das enzimas MPO e iNOS.

Capítulo 2: Modulação da atividade de fagócitos mononucleares por melatonina e seus produtos de oxidação

- Concluimos que monócitos são mais eficientes na oxidação da melatonina a AFMK e AMK. Esta oxidação pode ser uma rota de metabolização durante a inflamação, uma vez que monócitos e linfócitos sintetizam melatonina e também porque fagócitos ativados são capazes de produzir altas quantidades de ERO;
- melatonina e seus produtos de oxidação, AFMK e AMK, inibem a liberação de TNF- α , IFN- γ e IL-12 por células mononucleares humanas (Figuras 16-21), mostrando que estes compostos podem ter efeitos antiinflamatórios importantes;
- melatonina, AFMK e AMK diminuem a liberação de NO por macrófagos murino infectados com a forma tripomastigota de *T. cruzi*;
- melatonina, AFMK e AMK diminuem a capacidade tripanomicida de macrófagos murino. Podemos concluir com os resultados encontrados que a oxidação de melatonina pode ser uma estratégia de sobrevivência do parasita *T.*

cruzi, uma vez que este parasita sintetiza melatonina e que macrófagos ativados possuem a enzima responsável (MPO) pela oxidação de melatonina;

- os efeitos do AFMK e AMK foram mais acentuados que os da própria melatonina, sugerindo que pelo menos parte dos efeitos imunomodulatórios descritos para melatonina possam ser originados da ação de seus produtos de oxidação.

Finalmente, concluímos que a interação entre neutrófilos e macrófagos, no foco inflamatório, é um fator importante para a ativação dos macrófagos e da atividade microbida destas células. Os efeitos inibitórios observados para AFMK e AMK, sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias e atividade microbida de macrófagos, demonstram que estes compostos participam da desativação do processo inflamatório.

Bibliografia

7. Bibliografia

- Abbas A.K., A.H. Lichtman, Pober JS (2000). Cellular and Immunology. W.B. Saunders Company, Fourth edition, Philadelphia, USA.
- Adkison, A. M., S. Z. Raptis, et al. (2002). "Dipeptidyl peptidase I activates neutrophil-derived serine proteases and regulates the development of acute experimental arthritis." J Clin Invest **109**(3): 363-71.
- Aliberti, J. C., M. A. Cardoso, et al. (1996). "Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes." Infect Immun **64**(6): 1961-7.
- Antolin, I., C. Rodriguez, et al. (1996). "Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes." Faseb J **10**(8): 882-90.
- Aratani, Y., F. Kura, et al. (2002). "Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*." Med Mycol **40**(6): 557-63.
- Ashman, R. B., C. S. Farah, et al. (2004). "Innate versus adaptive immunity in *Candida albicans* infection." Immunol Cell Biol **82**(2): 196-204.
- Babior, B. M. (1999). "NADPH oxidase: an update." Blood **93**(5): 1464-76.
- Baggiolini, M. and I. Clark-Lewis (1992). "Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine." FEBS Lett **307**(1): 97-101.
- Baggiolini, M., B. Dewald, et al. (1997). "Human chemokines: an update." Annu Rev Immunol **15**: 675-705.
- Barjavel, M. J., Z. Mamdouh, et al. (1998). "Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes." J Immunol **160**(3): 1191-7.
- Bastos, K. R., J. M. Alvarez, et al. (2002). "Macrophages from IL-12p40-deficient mice have a bias toward the M2 activation profile." J Leukoc Biol **71**(2): 271-8.
- Bastos, K. R., C. R. Marinho, et al. (2004). "What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells?" Microbes Infect **6**(6): 630-6.
- Belaaouaj, A., R. McCarthy, et al. (1998). "Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis." Nat Med **4**(5): 615-8.

- Belardelli, F. and M. Ferrantini (2002). "Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity." Trends Immunol **23**(4): 201-8.
- Beutler, B. (2004). "Innate immunity: an overview." Mol Immunol **40**(12): 845-59.
- Bogdan, C. (2001). "Nitric oxide and the immune response." Nat Immunol **2**(10): 907-16.
- Bogdan, C. (2001). "Nitric oxide and the regulation of gene expression." Trends Cell Biol **11**(2): 66-75.
- Bogdan, C., M. Rollinghoff, et al. (2000). "Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity." Curr Opin Immunol **12**(1): 64-76.
- Bokoch, G. M. and U. G. Knaus (2003). "NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore!" Trends Biochem Sci **28**(9): 502-8.
- Borderie, D., P. Hilliquin, et al. (2002). "Inhibition of inducible NO synthase by TH2 cytokines and TGF beta in rheumatoid arthritic synoviocytes: effects on nitrosothiol production." Nitric Oxide **6**(3): 271-82.
- Borish, L. C. and J. W. Steinke (2003). "2. Cytokines and chemokines." J Allergy Clin Immunol **111**(2 Suppl): S460-75.
- Bowie, A. and L. A. O'Neill (2000). "Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries." Biochem Pharmacol **59**(1): 13-23.
- Boyum, A. (1976). "Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages." Scand J Immunol Suppl **5**: 9-15.
- Brennan, M. L., M. M. Anderson, et al. (2001). "Increased atherosclerosis in myeloperoxidase-deficient mice." J Clin Invest **107**(4): 419-30.
- Calvo, J. R., M. Rafii-el-Idrissi, et al. (1995). "Immunomodulatory role of melatonin: specific binding sites in human and rodent lymphoid cells." J Pineal Res **18**(3): 119-26.
- Capo, C., S. Meconi, et al. (1998). "Effect of cytotoxic necrotizing factor-1 on actin cytoskeleton in human monocytes: role in the regulation of integrin-dependent phagocytosis." J Immunol **161**(8): 4301-8.
- Caroleo, M. C., D. Frasca, et al. (1992). "Melatonin as immunomodulator in immunodeficient mice." Immunopharmacology **23**(2): 81-9.

- Caron, E. and A. Hall (1998). "Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases." Science **282**(5394): 1717-21.
- Carrillo-Vico, A., J. R. Calvo, et al. (2004). "Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance." Faseb J **18**(3): 537-9.
- Cassatella, M. A., L. Meda, et al. (1995). "Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes." Eur J Immunol **25**(1): 1-5.
- Ceravolo, I. P., A. C. Chaves, et al. (1999). "Replication of *Toxoplasma gondii*, but not *Trypanosoma cruzi*, is regulated in human fibroblasts activated with gamma interferon: requirement of a functional JAK/STAT pathway." Infect Immun **67**(5): 2233-40.
- Christen, S., E. Peterhans, et al. (1990). "Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: possible implication for inflammatory diseases." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(7): 2506-10.
- Colotta, F., F. Re, et al. (1992). "Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products." Blood **80**(8): 2012-20.
- Corazzini, R. Avaliação morfo-fisiológica de macrófagos peritoniais de camundongos submetidos ao choque térmico. 1993. 156 p. Tese (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada), Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- Costantino, G., S. Cuzzocrea, et al. (1998). "Protective effects of melatonin in zymosan-activated plasma-induced paw inflammation." Eur J Pharmacol **363**(1): 57-63.
- Cox, G., J. Crossley, et al. (1995). "Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation in vivo." Am J Respir Cell Mol Biol **12**(2): 232-7.
- Crutcher, J. M., M. M. Stevenson, et al. (1995). "Interleukin-12 and malaria." Res Immunol **146**(7-8): 552-9.
- Cuzzocrea, S., B. Zingarelli, et al. (1997). "Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity." J Pineal Res **23**(2): 106-16.

- D'Andrea, A., M. Rengaraju, et al. (1992). "Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells." J Exp Med **176**(5): 1387-98.
- Daubener, W., C. Remscheid, et al. (1996). "Anti-parasitic effector mechanisms in human brain tumor cells: role of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha." Eur J Immunol **26**(2): 487-92.
- Daugherty, A., J. L. Dunn, et al. (1994). "Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions." J Clin Invest **94**(1): 437-44.
- Desai, B. B., P. M. Quinn, et al. (1992). "IL-12 receptor. II. Distribution and regulation of receptor expression." J Immunol **148**(10): 3125-32.
- Di Stefano, A. and L. Paulesu (1994). "Inhibitory effect of melatonin on production of IFN gamma or TNF alpha in peripheral blood mononuclear cells of some blood donors." J Pineal Res **17**(4): 164-9.
- Ding, A. H., C. F. Nathan, et al. (1988). "Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production." J Immunol **141**(7): 2407-12.
- Djeu, J. Y. (1992). "Cytokines and anti-fungal immunity." Adv Exp Med Biol **319**: 217-23.
- Drath, D. B. and M. L. Karnovsky (1975). "Superoxide production by phagocytic leukocytes." J Exp Med **141**(1): 257-62.
- Ehlers, M. R. (2000). "CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity." Microbes Infect **2**(3): 289-94.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, et al. (2001). "Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases." J Immunol **166**(11): 6847-54.
- Fearon, D. T. and R. M. Locksley (1996). "The instructive role of innate immunity in the acquired immune response." Science **272**(5258): 50-3.
- Ferrante, A., M. Nandoskar, et al. (1988). "Effects of tumour necrosis factor alpha and interleukin-1 alpha and beta on human neutrophil migration, respiratory burst and degranulation." Int Arch Allergy Appl Immunol **86**(1): 82-91.
- Finocchiaro, L. M., V. E. Nahmod, et al. (1991). "Melatonin biosynthesis and metabolism in peripheral blood mononuclear leucocytes." Biochem J **280** (Pt 3): 727-31.

- Fluks, A. J. (1981). "Three-step isolation of human blood monocytes using discontinuous density gradients of Percoll." J Immunol Methods **41**(2): 225-33.
- Freire-de-Lima, C. G., D. O. Nascimento, et al. (2000). "Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages." Nature **403**(6766): 199-203.
- Frucht, D. M., T. Fukao, et al. (2001). "IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge." Trends Immunol **22**(10): 556-60.
- Fukao, T., D. M. Frucht, et al. (2001). "Inducible expression of Stat4 in dendritic cells and macrophages and its critical role in innate and adaptive immune responses." J Immunol **166**(7): 4446-55.
- Fulurija, A., R. B. Ashman, et al. (1996). "Neutrophil depletion increases susceptibility to systemic and vaginal candidiasis in mice, and reveals differences between brain and kidney in mechanisms of host resistance." Microbiology **142** (Pt 12): 3487-96.
- Garcia-Maurino, S., M. G. Gonzalez-Haba, et al. (1998). "Involvement of nuclear binding sites for melatonin in the regulation of IL-2 and IL-6 production by human blood mononuclear cells." J Neuroimmunol **92**(1-2): 76-84.
- Garcia-Maurino, S., M. G. Gonzalez-Haba, et al. (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**(2): 574-81.
- Gaziri, G., L. C. Gaziri, et al. (1999). "Phagocytosis of *Candida albicans* by concanavalin-A activated peritoneal macrophages." Med Mycol **37**(3): 195-200.
- Gazzinelli, R. T., I. P. Oswald, et al. (1992). "The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta." Eur J Immunol **22**(10): 2501-6.
- Germann, T. and E. Rude (1995). "Interleukin-12." Int Arch Allergy Immunol **108**(2): 103-12.
- Gilad, E., H. R. Wong, et al. (1998). "Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFkappaB activation." Faseb J **12**(9): 685-93.

- Goossens, V., J. Grooten, et al. (1995). "Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(18): 8115-9.
- Granger, D. N. and P. Kubes (1996). "Nitric oxide as antiinflammatory agent." Methods Enzymol **269**: 434-42.
- Grisham, M. B., M. M. Jefferson, et al. (1984). "Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils. Ammonia-dependent bactericidal, cytotoxic, and cytolytic activities of the chloramines." J Biol Chem **259**(16): 10404-13.
- Grohmann, U., M. L. Belladonna, et al. (2001). "Positive regulatory role of IL-12 in macrophages and modulation by IFN-gamma." J Immunol **167**(1): 221-7.
- Groseclose, E. E. and L. Frank (1982). "The activity of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase in rats and mice is not altered by oxygen exposure." Biochim Biophys Acta **705**(3): 341-7.
- Gubler, U., A. O. Chua, et al. (1991). "Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(10): 4143-7.
- Hampton, M. B., A. J. Kettle, et al. (1998). "Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing." Blood **92**(9): 3007-17.
- Han, Y. J., Y. G. Kwon, et al. (2001). "Antioxidant enzymes suppress nitric oxide production through the inhibition of NF-kappa B activation: role of H₂O₂ and nitric oxide in inducible nitric oxide synthase expression in macrophages." Nitric Oxide **5**(5): 504-13.
- Hardeland, R., I. Balzer, et al. (1995). "On the primary functions of melatonin in evolution: mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation, and scavenging of free radicals." J Pineal Res **18**(2): 104-11.
- Hazen, S. L., R. Zhang, et al. (1999). "Formation of nitric oxide-derived oxidants by myeloperoxidase in monocytes: pathways for monocyte-mediated protein nitration and lipid peroxidation In vivo." Circ Res **85**(10): 950-8.
- Hensley, K., K. A. Robinson, et al. (2000). "Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury." Free Radic Biol Med **28**(10): 1456-62.
- Herscowitz, H.B., Holden, H.T., Bellanti, J.A., Ghaffar, A. (1981). Manual of macrophage methodology. New York, Marcel Dekker, Inc., Cap. 8, p. 272-275.

- Hestdal, K., F. W. Ruscetti, et al. (1991). "Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells." J Immunol **147**(1): 22-8.
- Heyes, M. P. and P. F. Morrison (1997). "Quantification of local de novo synthesis versus blood contributions to quinolinic acid concentrations in brain and systemic tissues." J Neurochem **68**(1): 280-8.
- Hirata, F., O. Hayaishi, et al. (1974). "In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin." J Biol Chem **249**(4): 1311-3.
- Jaworek, J., A. Leja-Szpak, et al. (2003). "Protective effect of melatonin and its precursor L-tryptophan on acute pancreatitis induced by caerulein overstimulation or ischemia/reperfusion." J Pineal Res **34**(1): 40-52.
- Jones, O. T. and J. T. Hancock (1994). "Assays of plasma membrane NADPH oxidase." Methods Enzymol **233**: 222-9.
- Kelly, R. W., F. Amato, et al. (1984). "N-acetyl-5-methoxy kynurenamine, a brain metabolite of melatonin, is a potent inhibitor of prostaglandin biosynthesis." Biochem Biophys Res Commun **121**(1): 372-9.
- Kennaway, D. J., H. M. Hugel, et al. (1988). "Structure-activity studies of melatonin analogues in prepubertal male rats." Aust J Biol Sci **41**(3): 393-400.
- Kim, Y. M., C. A. Bombeck, et al. (1999). "Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis." Circ Res **84**(3): 253-6.
- Klebanoff, S. J., M. A. Vadas, et al. (1986). "Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor." J Immunol **136**(11): 4220-5.
- Kobayashi, K., K. Hayashi, et al. (1989). "Effects of tryptophan and pH on the kinetics of superoxide radical binding to indoleamine 2,3-dioxygenase studied by pulse radiolysis." J Biol Chem **264**(26): 15280-3.
- Kobayashi, M., L. Fitz, et al. (1989). "Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes." J Exp Med **170**(3): 827-45.
- Kuna, P., S. R. Reddigari, et al. (1993). "Characterization of the human basophil response to cytokines, growth factors, and histamine releasing factors of the intercrine/chemokine family." J Immunol **150**(5): 1932-43.
- Kvetnoy, I., A. K. Sandvik, et al. (1997). "The diffuse neuroendocrine system and extrapineal melatonin." J Mol Endocrinol **18**(1): 1-3.

- Lamont, A. G. and L. Adorini (1996). "IL-12: a key cytokine in immune regulation." Immunol Today **17**(5): 214-7.
- Lefkowitz, D. L., K. Mills, et al. (1992). "Macrophage activation and immunomodulation by myeloperoxidase." Proc Soc Exp Biol Med **199**(2): 204-10.
- Lefkowitz, S. S., M. P. Gelderman, et al. (1996). "Phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by macrophages exposed to myeloperoxidase." J Infect Dis **173**(5): 1202-7.
- Leonard, W. J. and J. J. O'Shea (1998). "Jaks and STATs: biological implications." Annu Rev Immunol **16**: 293-322.
- Lezoualc'h, F., M. Sparapani, et al. (1998). "N-acetyl-serotonin (normelatonin) and melatonin protect neurons against oxidative challenges and suppress the activity of the transcription factor NF-kappaB." J Pineal Res **24**(3): 168-78.
- Linehan, S. A., L. Martinez-Pomares, et al. (2000). "Macrophage lectins in host defence." Microbes Infect **2**(3): 279-88.
- Littlejohn, T. K., O. Takikawa, et al. (2000). "Expression and purification of recombinant human indoleamine 2, 3-dioxygenase." Protein Expr Purif **19**(1): 22-9.
- Liu, F., T. B. Ng, et al. (2001). "Pineal indoles stimulate the gene expression of immunomodulating cytokines." J Neural Transm **108**(4): 397-405.
- Lopez-Gonzalez, M. A., J. R. Calvo, et al. (1993). "Characterization of melatonin binding sites in human peripheral blood neutrophils." Biotechnol Ther **4**(3-4): 253-62.
- Loyola, W., D. A. Gaziri, et al. (2002). "Concanavalin A enhances phagocytosis and killing of *Candida albicans* by mice peritoneal neutrophils and macrophages." FEMS Immunol Med Microbiol **33**(3): 201-8.
- Macatonia, S. E., N. A. Hosken, et al. (1995). "Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells." J Immunol **154**(10): 5071-9.
- Macias, M., M. N. Rodriguez-Cabezas, et al. (1999). "Presence and effects of melatonin in *Trypanosoma cruzi*." J Pineal Res **27**(2): 86-94.
- Maestroni, G. J. (1995). "T-helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin." J Pineal Res **18**(2): 84-9.

- Marcinkiewicz, J., A. Grabowska, et al. (1995). "Taurine chloramine, a product of activated neutrophils, inhibits in vitro the generation of nitric oxide and other macrophage inflammatory mediators." J Leukoc Biol **58**(6): 667-74.
- Mariotto, S., M. Menegazzi, et al. (2004). "Biochemical aspects of nitric oxide." Curr Pharm Des **10**(14): 1627-45.
- Marodi, L., C. Tournay, et al. (1998). "Augmentation of human macrophage candidacidal capacity by recombinant human myeloperoxidase and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." Infect Immun **66**(6): 2750-4.
- Martins, E., Jr., A. C. Ferreira, et al. (2004). "Tryptophan consumption and indoleamines production by peritoneal cavity macrophages." J Leukoc Biol **75**(6): 1116-21.
- Matthews, N., M. L. Neale, et al. (1987). "Tumour cell killing by tumour necrosis factor: inhibition by anaerobic conditions, free-radical scavengers and inhibitors of arachidonate metabolism." Immunology **62**(1): 153-5.
- Mayo, J. C., R. M. Sainz, et al. (1998). "Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells: implications for Parkinson's disease." J Pineal Res **24**(3): 179-92.
- McDonald, P. P., A. Bald, et al. (1997). "Activation of the NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils." Blood **89**(9): 3421-33.
- Mehta, S. J., R. D. Miller, et al. (1998). "Inhibition of Chlamydia pneumoniae replication in HEp-2 cells by interferon-gamma: role of tryptophan catabolism." J Infect Dis **177**(5): 1326-31.
- Michiels, C., E. Minet, et al. (2002). "Regulation of gene expression by oxygen: NF-kappaB and HIF-1, two extremes." Free Radic Biol Med **33**(9): 1231-42.
- Mohan, N., K. Sadeghi, et al. (1995). "The neurohormone melatonin inhibits cytokine, mitogen and ionizing radiation induced NF-kappa B." Biochem Mol Biol Int **37**(6): 1063-70.
- Moilanen, E., P. Vuorinen, et al. (1993). "Inhibition by nitric oxide-donors of human polymorphonuclear leucocyte functions." Br J Pharmacol **109**(3): 852-8.
- Moresco, T. R., L. C. Gaziri, et al. (2002). "Phagocytic and candidacidal activities of macrophages from suckling and adult mice pretreated with concanavalin-A." Med Mycol **40**(4): 393-7.

- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, et al. (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." J Immunol **136**(7): 2348-57.
- Munn, D. H., M. Zhou, et al. (1998). "Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism." Science **281**(5380): 1191-3.
- Murtaugh, M. P. and D. L. Foss (2002). "Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation." Vet Immunol Immunopathol **87**(3-4): 109-21.
- Nagra, R. M., B. Becher, et al. (1997). "Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis." J Neuroimmunol **78**(1-2): 97-107.
- Nathan, C. F., H. W. Murray, et al. (1983). "Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity." J Exp Med **158**(3): 670-89.
- Neri, B., V. de Leonardis, et al. (1998). "Melatonin as biological response modifier in cancer patients." Anticancer Res **18**(2B): 1329-32.
- Nicotera, P., B. Brune, et al. (1997). "Nitric oxide: inducer or suppressor of apoptosis?" Trends Pharmacol Sci **18**(6): 189-90.
- Ohnishi, T., F. Hirata, et al. (1977). "Indoleamine 2,3-dioxygenase. Potassium superoxide as substrate." J Biol Chem **252**(13): 4643-7.
- Ozaki, Y., M. P. Edelstein, et al. (1988). "Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase: a mechanism of the antitumor activity of interferon gamma." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(4): 1242-6.
- Palmer, R. M., M. S. Hickery, et al. (1993). "Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes." Biochem Biophys Res Commun **193**(1): 398-405.
- Pedroza, A.M.C. Metabolismo de triptofano e melatonina sobre a função de leucócitos mononucleares: regulação da enzima indolamina-2,3-dioxigenase. Orientação: Ana Campa. Tese de doutorado (em andamento), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- Pick, E. and Y. Keisari (1980). "A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture." J Immunol Methods **38**(1-2): 161-70.
- Pioli, C., M. C. Caroleo, et al. (1993). "Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and non specific signals for T-cell proliferation." Int J Immunopharmacol **15**(4): 463-8.

- Pullar, J. M., C. C. Winterbourn, et al. (2002). "The effect of hypochlorous acid on the expression of adhesion molecules and activation of NF-kappaB in cultured human endothelial cells." Antioxid Redox Signal **4**(1): 5-15.
- Quinn, A. C., A. J. Petros, et al. (1995). "Nitric oxide: an endogenous gas." Br J Anaesth **74**(4): 443-51.
- Raghavendra, V., V. Singh, et al. (2001). "Melatonin enhances Th2 cell mediated immune responses: lack of sensitivity to reversal by naltrexone or benzodiazepine receptor antagonists." Mol Cell Biochem **221**(1-2): 57-62.
- Raychaudhuri, B., R. Dweik, et al. (1999). "Nitric oxide blocks nuclear factor-kappaB activation in alveolar macrophages." Am J Respir Cell Mol Biol **21**(3): 311-6.
- Reeves, E. P., H. Lu, et al. (2002). "Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux." Nature **416**(6878): 291-7.
- Reiter, R. J., J. R. Calvo, et al. (2000). "Melatonin and its relation to the immune system and inflammation." Ann N Y Acad Sci **917**: 376-86.
- Reiter, R. J., D. X. Tan, et al. (2001). "Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence." Cell Biochem Biophys **34**(2): 237-56.
- Remick, D. G. and L. Villarete (1996). "Regulation of cytokine gene expression by reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates." J Leukoc Biol **59**(4): 471-5.
- Ressmeyer, A. R., J. C. Mayo, et al. (2003). "Antioxidant properties of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction." Redox Rep **8**(4): 205-13.
- Ribeiro-Gomes, F. L., A. C. Otero, et al. (2004). "Macrophage interactions with neutrophils regulate Leishmania major infection." J Immunol **172**(7): 4454-62.
- Robinson, B. W., T. L. McLemore, et al. (1985). "Gamma interferon is spontaneously released by alveolar macrophages and lung T lymphocytes in patients with pulmonary sarcoidosis." J Clin Invest **75**(5): 1488-95.
- Rodrigues, M. R., D. Rodriguez, et al. (2003). "Interferon-gamma independent oxidation of melatonin by macrophages." J Pineal Res **34**(1): 69-74.

- Rodrigues, M. R., D. Rodriguez, et al. (2002). "Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity." Biochem Biophys Res Commun **292**(4): 869-73.
- Rodriguez, C., J. C. Mayo, et al. (2004). "Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin." J Pineal Res **36**(1): 1-9.
- Romani, L., A. Mencacci, et al. (1993). "CD4+ subset expression in murine candidiasis. Th responses correlate directly with genetically determined susceptibility or vaccine-induced resistance." J Immunol **150**(3): 925-31.
- Roos, D., R. van Bruggen, et al. (2003). "Oxidative killing of microbes by neutrophils." Microbes Infect **5**(14): 1307-15.
- Rosenfeld, G. (1947). Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. Mem. Inst. Butantan, v. 20, p. 315-328.
- Rutherford, M. S., A. Witsell, et al. (1993). "Mechanisms generating functionally heterogeneous macrophages: chaos revisited." J Leukoc Biol **53**(5): 602-18.
- Sabroe, I., R. C. Read, et al. (2003). "Toll-like receptors in health and disease: complex questions remain." J Immunol **171**(4): 1630-5.
- Sainz, R. M., J. C. Mayo, et al. (1995). "The pineal neurohormone melatonin prevents in vivo and in vitro apoptosis in thymocytes." J Pineal Res **19**(4): 178-88.
- Savill, J. S., P. M. Henson, et al. (1989). "Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel "charge-sensitive" recognition mechanism." J Clin Invest **84**(5): 1518-27.
- Savill, J. S., A. H. Wyllie, et al. (1989). "Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages." J Clin Invest **83**(3): 865-75.
- Schindler, H. and C. Bogdan (2001). "NO as a signaling molecule: effects on kinases." Int Immunopharmacol **1**(8): 1443-55.
- Schindler, H., M. B. Lutz, et al. (2001). "The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4." J Immunol **166**(5): 3075-82.

- Schreck, R., K. Albermann, et al. (1992). "Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review)." Free Radic Res Commun **17**(4): 221-37.
- Schuit, K. E. (1979). "Phagocytosis and intracellular killing of pathogenic yeasts by human monocytes and neutrophils." Infect Immun **24**(3): 932-8.
- Seder, R. A., R. Gazzinelli, et al. (1993). "Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(21): 10188-92.
- Shaji, A. V., S. K. Kulkarni, et al. (1998). "Regulation of secretion of IL-4 and IgG1 isotype by melatonin-stimulated ovalbumin-specific T cells." Clin Exp Immunol **111**(1): 181-5.
- Silva, J. S., J. C. Aliberti, et al. (1998). "The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection." Braz J Med Biol Res **31**(1): 111-5.
- Silva, J. S., P. J. Morrissey, et al. (1992). "Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection." J Exp Med **175**(1): 169-74.
- Silva, J. S., D. R. Twardzik, et al. (1991). "Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta)." J Exp Med **174**(3): 539-45.
- Silva, S. O., M. R. Rodrigues, et al. (2004). "Oxidation of melatonin and its catabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine and N1-acetyl-5-methoxykynuramine, by activated leukocytes." J Pineal Res **37**(3): 171-5.
- Silva, S. O., M. R. Rodrigues, et al. (2004). "Neutrophils as a specific target for melatonin and kynuramines: effects on cytokine release." J Neuroimmunol **156**(1-2): 146-52.
- Silva, S. O., V. F. Ximenes, et al. (2000). "Myeloperoxidase-catalyzed oxidation of melatonin by activated neutrophils." Biochem Biophys Res Commun **279**(2): 657-62.
- Singh, V. K., S. Balaraman, et al. (2004). "Leishmania donovani activates nuclear transcription factor-kappaB in macrophages through reactive oxygen intermediates." Biochem Biophys Res Commun **322**(3): 1086-95.
- Speer, C. P., M. J. Pabst, et al. (1984). "Enhanced release of oxygen metabolites by monocyte-derived macrophages exposed to proteolytic enzymes: activity of neutrophil elastase and cathepsin G." J Immunol **133**(4): 2151-6.

- Stadler, J., M. Stefanovic-Racic, et al. (1991). "Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide." J Immunol **147**(11): 3915-20.
- Stobie, L., S. Gurunathan, et al. (2000). "The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(15): 8427-32.
- Tak, P. P. and G. S. Firestein (2001). "NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases." J Clin Invest **107**(1): 7-11.
- Takikawa, O., T. Kuroiwa, et al. (1988). "Mechanism of interferon-gamma action. Characterization of indoleamine 2,3-dioxygenase in cultured human cells induced by interferon-gamma and evaluation of the enzyme-mediated tryptophan degradation in its anticellular activity." J Biol Chem **263**(4): 2041-8.
- Takikawa, O., Y. Tagawa, et al. (1999). "Interferon-gamma-dependent/independent expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. Studies with interferon-gamma-knockout mice." Adv Exp Med Biol **467**: 553-7.
- Tan, D. X., L. C. Manchester, et al. (2001). "N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant." Faseb J **15**(12): 2294-6.
- Tan, D. X., L. C. Manchester, et al. (1999). "Cyclic 3-hydroxymelatonin: a melatonin metabolite generated as a result of hydroxyl radical scavenging." Biol Signals Recept **8**(1-2): 70-4.
- Tan, D. X., L. C. Manchester, et al. (2000). "Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation." Free Radic Biol Med **29**(11): 1177-85.
- Tan, D. X., L. C. Manchester, et al. (2000). "Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products." Biol Signals Recept **9**(3-4): 137-59.
- Tan, D. X., L. C. Manchester, et al. (1999). "Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance." Biochim Biophys Acta **1472**(1-2): 206-14.
- Tarpey, M. M., D. A. Wink, et al. (2004). "Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **286**(3): R431-44.

- Taylor, E. L., I. L. Megson, et al. (2003). "Nitric oxide: a key regulator of myeloid inflammatory cell apoptosis." Cell Death Differ **10**(4): 418-30.
- Taylor, M. W. and G. S. Feng (1991). "Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism." Faseb J **5**(11): 2516-22.
- Tkalcevic, J., M. Novelli, et al. (2000). "Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G." Immunity **12**(2): 201-10.
- Toossi, Z., M. Mincek, et al. (1997). "Modulation of IL-12 by transforming growth factor-beta (TGF-beta) in Mycobacterium tuberculosis-infected mononuclear phagocytes and in patients with active tuberculosis." J Clin Lab Immunol **49**(2): 59-75.
- Trinchieri, G. (1993). "Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells." Immunol Today **14**(7): 335-8.
- Trinchieri, G. (2003). "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity." Nat Rev Immunol **3**(2): 133-46.
- Underhill, D. M. and A. Ozinsky (2002). "Phagocytosis of microbes: complexity in action." Annu Rev Immunol **20**: 825-52.
- van Furth, R., M. van Schadewijk-Nieuwstad, et al. (1985). "Morphological, cytochemical, functional, and proliferative characteristics of four murine macrophage-like cell lines." Cell Immunol **90**(2): 339-57.
- Vazquez-Torres, A., J. Jones-Carson, et al. (1994). "Candidacidal activity of macrophages from immunocompetent and congenitally immunodeficient mice." J Infect Dis **170**(1): 180-8.
- Vespa, G. N., F. Q. Cunha, et al. (1994). "Nitric oxide is involved in control of Trypanosoma cruzi-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro." Infect Immun **62**(11): 5177-82.
- Vodovotz, Y., C. Bogdan, et al. (1993). "Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta." J Exp Med **178**(2): 605-13.
- Ward, C., T. H. Wong, et al. (2000). "Induction of human neutrophil apoptosis by nitric oxide donors: evidence for a caspase-dependent, cyclic-GMP-independent, mechanism." Biochem Pharmacol **59**(3): 305-14.

- Watanabe, Y., R. Yoshida, et al. (1981). "Immunohistochemical localization of indoleamine 2,3-dioxygenase in the argyrophilic cells of rabbit duodenum and thyroid gland." J Histochem Cytochem **29**(5): 623-32.
- Welters, I. D., A. Menzebach, et al. (2000). "Morphine inhibits NF-kappaB nuclear binding in human neutrophils and monocytes by a nitric oxide-dependent mechanism." Anesthesiology **92**(6): 1677-84.
- Wilkinson, K. A., H. Aung, et al. (2000). "Modulation of transforming growth factor beta-1 gene expression by interleukin-12." Scand J Immunol **52**(3): 271-7.
- Winterbourn, C. C., M. C. Vissers, et al. (2000). "Myeloperoxidase." Curr Opin Hematol **7**(1): 53-8.
- Wong, G. H., J. H. Elwell, et al. (1989). "Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor." Cell **58**(5): 923-31.
- Xing, Z., A. Zganiacz, et al. (2000). "Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF-alpha and nitric oxide from macrophages via IFN-gamma induction." J Leukoc Biol **68**(6): 897-902.
- Yoshida, R. and O. Hayaishi (1987). "Indoleamine 2,3-dioxygenase." Methods Enzymol **142**: 188-95.
- Zhang, H., G. L. Squadrito, et al. (1999). "Reaction of peroxynitrite with melatonin: A mechanistic study." Chem Res Toxicol **12**(6): 526-34.

Anexos

Anexo I

Aprovação do Comitê de Ética FCF-USP

DECLARAÇÃO

Declaramos, para os devidos fins, que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião de 24 de fevereiro de 2003, **aprovou** o projeto “Efeito de compostos indólicos e seus produtos de oxidação sobre funções de células mononucleares”, apresentado pela pesquisadora **Maria Rita Rodrigues**, sob orientação da Profa. Ana Campa.

Informamos que, após a execução de 50% do cronograma do projeto, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97, a pesquisadora deverá apresentar um relatório parcial.

São Paulo, 30 de setembro de 2003.

Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCF/USP

OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DO(S)
ARTIGO(S) NESTE ARQUIVO