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

Triptofano, Melatonina e seus produtos de oxidação:
Ações sobre os linfócitos T

Alziana Moreno da Cunha Pedrosa

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Ana Campa

São Paulo
2006

Alziana Moreno da Cunha Pedrosa

Triptofano, Melatonina e seus produtos de oxidação:
Ações sobre os linfócitos T

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Ana Campa
orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

“Toda tese tem uma história, que tem páginas engraçadas, alegres, divertidas e outras que são difíceis, pesadas, tristes. Aprendemos com todas elas e não são lições de consumo imediato, pelo contrário serão incorporadas na nossa vida. No limite, nós somos o maior objeto da tese, pois enquanto sujeito dela vivemos um embate de forças internas e externas que nos ensina muito sobre nós mesmos.”

Dedicatória

Dedico esta tese ao meu saudoso pai **Antonio Alves da Cunha Pedrosa**, cujo maior sonho era ter uma filha doutora. Não tivemos oportunidade de nos despedirmos, mas saiba que o meu amor por você é eterno e me deu forças para continuar e vencer os obstáculos desta caminhada.

A minha super-mãe e maior incentivadora, **Maria de Lourdes Moreno** que muitas vezes abdicou dos seus sonhos para realizar os meus. Mainha sua presença, seu exemplo e seus ensinamentos foram fundamentais para a realização deste sonho. Eu jamais chegaria até aqui sem você ao meu lado. A você, a minha eterna gratidão.

Ao meu irmão **João Antonio Moreno da C. Pedrosa**, pelo apoio e carinho.

Agradecimento Especial

A minha orientadora,
Prof^a Dr^a. Ana Campa, por ter confiado a
mim este trabalho e pela oportunidade de aprender e colaborar no seu grupo de
pesquisa. Trabalhar com Ana Campa é um sonho de muitos alunos e sem dúvida foi
uma experiência muito rica para mim tanto no aspecto profissional quanto no pessoal.
Muita obrigada!

Agradecimentos

A Deus, por esta grande oportunidade.

Ao Prof. Dr. Gustavo Amarante-Mendes (Instituto de Ciências Biomédicas/USP), pela co-orientação e troca de conhecimentos na área de Imunologia. Aos seus alunos de Pós-graduação Ana Elisa Bueno-Silva e principalmente, Ricardo Weinlich pela indispensável colaboração e por sua valiosa amizade.

A Dra. Flávia Manglone (Faculdade de Medicina/USP) pelos ensinamentos da técnica RNase Protection Assay (RPA) e amizade.

A Prof^a. Dr^a. Regina Markus e a aluna Erica Cecon (Instituto de Biociências/USP) pelo apoio técnico-científico na realização do ensaio de retardo da mobilidade eletroforética (EMSA).

A toda a minha família, especialmente a minha avó Alzira Moreno pelo incentivo.

A minha família paulista Margarida, Mazinho (*in memorian*), Rodrigo e Rafael Mascarenhas, pelo acolhimento tão carinhoso e pelo apoio fundamental. Muito obrigada por tudo!

Aos meus grandes amigos Sueli e Sandro Lautenschlager, pelo apoio incondicional nos momentos difíceis, por compartilhar também as alegrias e uma sincera amizade.

A minha amiga-irmã Danielle Maia, pelo companheirismo ímpar em todos os anos, meses e dias desta longa jornada. Ao longo deste tempo a nossa amizade criou raízes fortes o suficiente para jamais ser esquecida.

Ao Sr. Sérgio, Conceição e Kátia Mações, pelos ensinamentos de vida e pelo privilégio de conviver com vocês.

A Dr^a.Stefania Ribeiro, por participar da tarefa mais difícil, porém muito gratificante: o auto-conhecimento.

A Ricardo Costa, pelo incentivo e companheirismo nos primeiros passos da minha vida acadêmica. A Maria do Carmo Valgueiro e Josenildo Rodrigues, pelo apoio e amizade ao longo de todos estes anos.

Aos amigos de laboratório: Sueli Lautenschlager, Maria Rita Rodrigues, Elaine Hatanaka, Sabrina Okada, Cristiani Burguer, Flávia Garcia, Flávia Mamy, Silene Migliorini, Lillian Buriolli, Kátia Cidi, Melissa Medrano e, principalmente, Silvana Sandri que se fez presente em momentos muito importantes.

A minha grande amiga Sueli Silva, pelo imenso carinho e diversos momentos de descontração.

A Ana Dantas, Dora Lima, Edna Lima, Rose Oliveira, Cláudia e Dona Dorlei pela convivência e pelo auxílio na parte técnica e burocrática.

A todos os professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e colegas dos demais laboratórios por compartilhar seus conhecimentos, suas idéias sobre a pós-graduação e a utilização de alguns equipamentos.

A Anniger Helena, Glória Souza, Kátia Kioko, Themis di Paula, MarianaFerrari e Elida Néri pela convivência saudável e diária no lar, pelos momentos de descontração e pelas lições de vida que eu aprendi com cada uma de vocês.

A Ricardo Rodrigues, pelo carinho e por tornar os meus dias mais felizes nos momentos finais desta tese.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro.

Sumário

1	Lista de Abreviaturas	9
2	Resumo	10
3	Abstract	11
4	Introdução	13
4.1	Triptofano e seus produtos de oxidação	14
4.2	Melatonina e seus produtos de oxidação	18
4.3	Linfócitos T	22
5	Objetivos	27
6	Materias e Métodos	29
6.1	Materiais	29
6.1.1	Células	29
6.1.2	Reagentes	29
6.2	Métodos	30
6.2.1	Síntese de AFMK e AMK	30
6.2.2	Cultura de Células	32
6.2.2.1	Células Mononucleares (PBMC)	32
6.2.2.2	Cultivo de Células DO11.10	32
6.2.3	Ensaio de Proliferação Celular	32
6.2.4	Determinação de Citocinas	33
6.2.5	Ensaio de Morte Celular Induzida por ativação (AICD)	33
6.2.6	Quantificação de morte celular por apoptose através da citometria de fluxo	33
6.2.6.1	Fragmentação de DNA	34
6.2.6.2	Técnica de Exclusão de Iodeto de propídeo	34
6.2.7	Extração de RNA total	34
6.2.8	Conversão de RNA para cDNA	35
6.2.9	Reação em cadeia da Polimerase por Transcrição Reversa (RT-PCR)	35
6.2.10	Imunofluorescência para proteínas de superfície	36
6.2.11	Western-blot	37
6.2.12	Transformação das bactérias	37
6.2.13	Extração de DNA plasmidial	38
6.2.14	Eletroporação	38
6.2.15	Ensaio de Luciferase	39
6.2.16	Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)	40
6.2.17	Ensaio de retardo da mobilidade eletroforética (EMSA)	40
6.2.18	Análises Estatísticas	41
7	Resultados e Discussão	43
7.1	Resultados	45
7.1.1	Efeito de KYN, AFMK e AMK sobre as ações dos PBMC ativados com PHA	45
7.2	Discussão	53
7.3	RESULTADOS	59
7.3.1	Efeito de melatonina e AFMK sobre a AICD de células T DO11.10	59
7.3.2	Efeito de melatonina e AFMK sobre a expressão de FAS, FASL e FLIP	63
7.3.3	Efeito de melatonina e AFMK na apoptose induzidas por anti-Fas	67
7.3.4	Efeito de melatonina e AFMK na AICD: ação antioxidante?	69
7.3.5	Efeito de melatonina e AFMK na ativação do fator NF- κ B	73
7.3.6	Efeito de melatonina e AFMK na ativação do fator NFAT	75
7.4	Discussão	78
8	Conclusões	95
9	Considerações Finais	97
10	Referências bibliográficas	102

1 Lista de Abreviaturas

AFMK	<i>N</i> ¹ -acetil- <i>N</i> ² -formil-5-metoxiquinuramina
AICD	morte celular induzida por ativação
AMK	<i>N</i> ¹ -acetil-5-metoxiquinuramina
Csa	ciclosporina
ELISA	ensaio imunoenzimático
EMSA	ensaio de retardo da mobilidade eletroforética
FasL	ligante Fas
FLIP	“Fas-like Interleuckin-1 β -coverting enzyme”
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HAA	3-hidroxiantranílico
HFS	solução fluorescente hipotônica - “hypotonic fluorescent solution”
IDO	indolamina 2,3-dioxigenase
IFN- γ	interferon gamma
IL	interleucina
KYN	<i>L</i> -quinurenina
LPS	lipopolissacarídeo
MEL	melatonina
NAC	N-acetil-L-cisteína
NFAT	Fator de Transcrição Nuclear de Células T ativadas
NFK	<i>N</i> -formil-quinurenina
NF-kB	Fator Nuclear kB
NOS	óxido nítrico sintase
PBMC	células mononucleares de sangue periférico
PHA	fitohemaglutinina
ROS	espécies reativas de oxigênio
RT-PCR	reação em cadeia da Polimerase por Transcrição Reversa
TNF- α	Fator de necrose tumoral

2 Resumo

Os linfócitos T sofrem rígida regulação homeostática desde seu desenvolvimento até sua maturação, expansão clonal e morte celular. Compostos endógenos ou exógenos que alterem as funções fisiológicas dos linfócitos T podem modular passos importantes da resposta imune. Triptofano tem um papel importante na manutenção da homeostasia dos linfócitos T e é o precursor da síntese de melatonina. Neste estudo, avaliamos os efeitos de triptofano, melatonina e seus produtos de oxidação sobre os principais processos de ativação e desativação dos linfócitos T. Inicialmente, investigamos os efeitos biológicos de *L*-quinurenina (KYN, composto formado na via de metabolização do triptofano), melatonina e seus produtos de oxidação *N*¹-acetil-*N*²-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) e *N*¹-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK) sobre a proliferação dos linfócitos T humanos e na produção de interferon-gamma (IFN- γ) e das interleucinas IL-2, IL-10 e IL-12. Observamos que KYN, melatonina, AFMK e AMK inibem a linfoproliferação e a liberação de IL-2 e de IFN- γ . O efeito inibitório destes compostos na síntese de IFN- γ não está associado às variações na produção das duas citocinas mais importantes na regulação de IFN- γ , ou seja, IL-10 e IL-12. Na seqüência, descrevemos a ação da melatonina e seus produtos de oxidação, sobre a morte celular induzida por ativação (AICD) de hibridomas de linfócitos T e os possíveis mecanismos de ação. Os resultados deste estudo mostram que tanto melatonina quanto AFMK e AMK são potentes inibidores da apoptose dos linfócitos T. Estes compostos inibem a ativação do Fator de Transcrição Nuclear de Células T ativadas (NFAT) e suprimem a expressão da molécula Fas Ligante (FasL), que é o evento imprescindível para a indução da AICD. Como conclusões, verificamos que os produtos formados tanto a partir da oxidação de triptofano quanto de melatonina são potenciais reguladores da resposta imune e podem participar dos efeitos imunossupressores, nos quais a depleção de triptofano tem sido sugerida como principal mecanismo de regulação dos linfócitos T. Adicionalmente, nossos achados podem ter utilidade na avaliação de possíveis efeitos indesejáveis durante a utilização terapêutica de melatonina.

3 Abstract

T Lymphocytes are exposed to severe homeostatic regulation from development stage up to their maturation, clonal expansion and cell death. Endogenous or exogenous compounds altering the physiological functions of T lymphocytes can modulate important steps of the immune response. Tryptophan plays an important role for maintaining the homeostasis of T lymphocytes and is the precursor of the melatonin synthesis. In this study we evaluated the effects of tryptophan, melatonin and their oxidation products concerning the main activation and deactivation processes of T lymphocytes. Firstly, we analyzed the biological effects of *L*-kynurenine (KYN, a compound formed at the tryptophan metabolization pathway), melatonin and its oxidation products, *N*-acetyl-*N*-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and *N*-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), concerning the proliferation of human T lymphocytes and the production of interferon-gamma (IFN- γ) as well as of interleukins IL-2, IL-10 and IL-12. It was observed that KYN, melatonin, AFMK and AMK inhibit the lymphocytes proliferation and the release of IL-2 and IFN- γ . The inhibitory effect of these compounds in the IFN- γ synthesis is not related to the variations on the production of the two most important cytokines for the IFN- γ regulation, that is, IL-10 and IL-12. After that, we reported the melatonin action as well as of its oxidation products, in what concerns activation-induced cell death (AICD) of T lymphocytes hybridomas and probable activation mechanisms. The results of this study have shown that melatonin as well as AFMK and AMK are powerful inhibitors of the T lymphocytes apoptosis. These compounds inhibit the activation of the nuclear transcription factor of activated T cells (NFAT) and suppress the expression of the Fas-Ligand molecule (FasL), which is the essential event to the AICD induction. We concluded that products formed by the oxidation of either tryptophan or melatonin are potential regulators of the immune response and may participate on immunosuppression effects, in which the tryptophan depletion is believed to be the main mechanism for T lymphocytes regulation. Added to that, our results may be helpful for evaluating possible unwanted effects during the therapeutical use of melatonin.

Introdução

4 Introdução

Em condições normais a resposta imune é mantida sob um rígido controle. Este controle é resultante de complexos processos de ativação e desativação celular conduzidos por moléculas produzidas sistêmica ou localmente. Dentre os compostos que tem mostrado atividade biológica sobre as células do sistema imune encontram-se os compostos indólicos como o triptofano e a melatonina.

Triptofano tem um papel importante na manutenção da homeostasia dos linfócitos T e na participação dos mecanismos de tolerância imunológica. Atualmente, sabe-se que os produtos gerados a partir da oxidação do triptofano também possuem atividades imunoregulatórias importantes sobre os linfócitos e outras células do sistema imune. Entretanto, estudos sobre as ações fisiológicas desencadeadas pelos primeiros produtos formados na via de metabolização do triptofano na resposta imune como, por exemplo, KYN são escassos. Isto é especialmente interessante se considerarmos que em alguns tipos celulares a oxidação de triptofano resulta em KYN como produto final. Além dos metabólitos do tipo quinureninas, o triptofano também dá origem a outros produtos incluindo serotonina e melatonina.

Em trabalhos anteriores, demonstramos a rota de metabolização de melatonina, com a formação de compostos biologicamente ativos, AFMK e AMK, cujas estruturas são semelhantes às quinureninas originadas da oxidação de triptofano. Algumas atividades biológicas de AFMK e AMK sobre os neutrófilos e monócitos já foram descritas. No entanto, os efeitos de AFMK e AMK sobre a função dos linfócitos ainda permanecem desconhecidos.

Assim sendo, este trabalho foi proposto para verificar se os produtos de oxidação tanto de triptofano quanto de melatonina possuem efeitos imunomodulatórios em linfócitos T. Para tanto, avaliamos os principais processos de ativação e desativação dos linfócitos T na presença de KYN, AFMK e AMK. Seguem-se, nesta introdução, informações básicas para a compreensão da nossa proposta e dos nossos resultados.

4.1 Triptofano e seus produtos de oxidação

L-Triptofano, um aminoácido essencial, além de fazer parte de proteínas é um precursor de compostos bioativos. Estes compostos são formados em duas rotas ou vias metabólicas específicas: via serotoninérgica e via das quinureninas (figura 1). A via serotoninérgica, ativa em plaquetas e neurônios, converte o triptofano no neurotransmissor serotonina numa rota intermediada por 5-hidroxitriptofano. Alguns tecidos são capazes de utilizar serotonina para a síntese do hormônio melatonina numa rota intermediada por *N*-acetilserotonina. Na via das quinureninas, o triptofano é oxidado a *N*-formil-quinurenina (NFK) que subsequente é deformilada e transforma-se em L-quinurenina (KYN). A partir deste último, uma série de compostos com potencial atividade biológica especialmente neurotóxica é formada como, por exemplo, 3-hidroxi-quinurenina e o ácido quinolínico [1,2].

Figura 1. Vias de metabolização do aminoácido triptofano

Enquanto a via serotoninérgica e os efeitos biológicos de seus intermediários foram extensivamente estudados, a via das quinureninas é alvo de atenção especialmente nos anos recentes. O metabolismo do triptofano nesta via é mediado por duas enzimas diferentes: triptofano 2,3-dioxigenase (TDO) e indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) [3]. Apesar de ambas catalisarem a formação de produtos de abertura do anel indólico a partir do triptofano, elas apresentam diferenças no peso molecular, possuem diferentes indutores e especificidade. A TDO está localizada principalmente no fígado, é induzida pelo triptofano e por hormônios glicocorticóides [4]. IDO está distribuída em diversos tecidos, tais como pulmão, intestino, placenta e no sistema nervoso central. Adicionalmente, IDO é expressa em uma variedade de células incluindo macrófagos, células dendríticas e fibroblastos [5,6,7]. Embora o papel fisiológico da IDO seja ainda pouco conhecido, sabe-se que a síntese desta enzima é fortemente induzida pela citocina pró-inflamatória IFN- γ *in vitro* e também *in vivo*. Outras citocinas como o IFN- α , IL-1 e fator de necrose tumoral (TNF- α) e o lipopolissacarídeo (LPS) também são capazes de induzir a expressão de IDO, embora sejam menos eficazes [8, 9, 10]. Alguns estudos sugerem que IDO atua sobre outros compostos indólicos, tais como serotonina e melatonina diferentemente da TDO que tem especificidade apenas pelo substrato triptofano [3]. O decréscimo da atividade de TDO ocorre concomitantemente com a indução de IDO resultando em uma mudança coordenada do sítio de degradação do triptofano do fígado para outros tecidos. O significado fisiológico desta dicotomia TDO/IDO no metabolismo do triptofano não está bem esclarecido, possivelmente este processo seja controlado de maneira diferente na homeostasia e durante a doença [11].

A associação entre inflamação, síntese de IFN- γ , aumento da expressão de IDO e metabolismo do triptofano intracelular parece operar durante a ativação do sistema imune e em processos infecciosos. Estudos anteriores demonstram que o efeito inibitório de IFN- γ no crescimento de patógenos intracelulares *in vitro*, tais como o *Toxoplasma gondii*, é parcialmente atribuído à depleção do triptofano utilizado para a síntese protéica do parasita, através da indução de IDO [12, 13]. Adicionalmente, a depleção de triptofano via IDO é o mecanismo pelo qual o IFN- γ exerce seu efeito antiproliferativo *in vitro* nas células tumorais [14].

Outros estudos também propõem que o catabolismo de triptofano por IDO localizado na placenta previna a rejeição imunológica de fetos de mamíferos. Munn e colaboradores (1998) sugerem que este mecanismo envolve a inibição da proliferação das células T maternas, tornando-as tolerantes ao feto, por meio da depleção local do triptofano. A contribuição desta enzima neste processo é investigada pela administração do 1-metil-triptofano, inibidor farmacológico de IDO, em ratas durante a gestação. A expressão da enzima na placenta é crucial para manter a tolerância mediada pelas células maternas, uma vez que as ratas tratadas com 1-metil-triptofano rejeitam o feto [15]. A partir deste trabalho, Kudo e colaboradores (2000) descreveram a localização e caracterização da IDO na placenta de seres humanos. Assim, a ativação da IDO e os efeitos de quinureninas sobre células T poderia explicar a inibição do processo de rejeição imune do feto na gravidez de humanos [16]. Desta forma, o metabolismo do triptofano catabolizado pela IDO tem atraído bastante interesse devido a sua participação na modulação da resposta imune.

A participação de IDO na ativação e regulação do sistema imune tornou-se mais evidente com os estudos *in vitro* que mostram a produção desta enzima por células apresentadoras de antígenos (células dendríticas e monócito/macrofágos) e a capacidade destas células inibirem a proliferação de linfócitos humanos através da degradação do triptofano [17,18]. Atualmente, tem-se relacionado à atividade de IDO nas células apresentadoras de antígenos a imunossupressão de linfócitos e aos processos de tolerância imunológica [19].

Como resultado dos trabalhos iniciais que relacionam IDO com tolerância, vários pesquisadores investigaram como estaria a expressão e a atividade da IDO em diversas linhagens de células tumorais humanas. Os resultados destes estudos indicaram a expressão constitutiva do gene responsável pela síntese da enzima na maioria dos tumores, principalmente nos carcinomas de próstata, pâncreas e pulmão [20]. A atividade enzimática nestes tumores parece suficiente para mediar efeitos *in vivo*. Assim, pode-se imaginar que IDO controle tanto o crescimento tumoral quanto o crescimento das células mononucleares que invadem o microambiente do tumor. Neste último caso, a enzima poderia contribuir como mecanismo de escape das células tumorais contra a rejeição mediada pelos linfócitos [21].

Não se sabe ao certo qual é o mecanismo principal pelo qual a IDO desenvolve seu papel imunoregulatório. Apesar da depleção de triptofano, por si só afetar a ativação dos linfócitos T, estudos recentes dão ênfase as atividades imunomodulatórias dos metabólitos gerados a partir da oxidação do triptofano catalisada pela IDO. Estes metabólitos são capazes de inibir a proliferação e induzir a apoptose de células T *in vitro* [22, 23]. Alguns efeitos biológicos sobre a ativação de macrófagos no que concerne a produção de espécies reativas de nitrogênio, expressão da enzima óxido nítrico sintase (iNOs), produção de citocinas e apoptose destas células também já foram descritos para os ácidos 3-hidroxi-antranílico (3-HAA) e picolínico [24]. Assim sendo, a ação direta dos metabólitos de triptofano sobre determinados tipos celulares sugere um mecanismo alternativo pelo qual IDO atuaria no sistema imune. Isto é especialmente interessante uma vez que durante a resposta imune, altas concentrações dos metabólitos do triptofano estão presentes no sangue, órgãos linfóides e nos locais da inflamação [25].

Estudos com anticorpos para o ácido quinolínico mostram que as células do sistema imune são capazes de sintetizar e/ou estocar grandes quantidades deste metabólito [26]. A capacidade neurótóxica do ácido quinolínico *in vivo* está associada a algumas doenças neurodegenerativas e com o aparecimento de demência na AIDS [27]. O aumento nas concentrações plasmáticas de KYN também pode ser observado nos pacientes com doenças cardiovasculares e na vigência de infecções [28,29].

Apesar dos trabalhos mais recentes, estudos sobre os efeitos desencadeados por KYN no sistema imune e em outros tipos celulares são escassos. Isto é especialmente importante se considerarmos que em alguns tipos celulares a oxidação de triptofano resulta em KYN como produto final.

4.2 Melatonina e seus produtos de oxidação

Dentre os vários hormônios secretados e liberados na circulação sanguínea está o hormônio produzido pela glândula pineal, a melatonina (*N*¹-acetil-5-metoxitriptamina). A glândula pineal exerce influências regulatórias importantes em vertebrados devido à secreção deste hormônio. Melatonina, como todos os hormônios, exerce sua ação em concentrações séricas extremamente baixas. A concentração de melatonina no plasma é baixa durante o dia (1-6 pg/mL) e alta à noite (10 - 200pg/mL), o que define um ritmo diário para melatonina [30].

Como mencionado anteriormente, a síntese de melatonina tem como precursor o L-triptofano que é transformado em serotonina através de duas reações catalisadas pelas enzimas triptofano hidroxilase e 5-hidroxitriptofano descarboxilase, respectivamente presentes na glândula pineal. A seguir, *N*-acetilação, catalisada pela enzima *N*-acetiltransferase e a posterior metilação pela hidroxindol-o-metiltransferase produzem melatonina. Durante muito tempo se considerou que o hormônio melatonina era exclusivamente sintetizado pela glândula pineal. Estudos mais recentes suportam a síntese extrapineal de melatonina [31,32, 33] e células de linhagens monocíticas têm toda a bateria enzimática necessária para a síntese deste hormônio [34]. Carillo-Vicco e colaboradores (2004) demonstraram a síntese e a liberação de grandes quantidades de melatonina por leucócitos mononucleares de sangue periférico (PBMC) [35]. Assim sendo, pode-se imaginar que além de uma função hormonal clássica, isto é, ligação com receptores e desencadeamento de sinalização celular para respostas específicas, a melatonina possa apresentar atividades adicionais.

Além de controlar o ritmo circadiano e sazonal, atuar no controle da fisiologia da reprodução [36] e ter atividade antioxidante como sequestrador de radicais livres [37, 38], são relatados vários efeitos de melatonina sobre o sistema imune [39]. A presença de receptores específicos para melatonina em neutrófilos [40], monócitos [41] e principalmente em linfócitos humanos [42] suporta a hipótese que melatonina poderia participar dos processos inflamatórios como um imunomodulador. Neste sentido, vários estudos *in vitro* demonstram que melatonina age nestas células modulando a produção de citocinas e a proliferação celular [43,44, 44]. Além destes, vários efeitos sobre ativação de leucócitos foram observados [45].

Melatonina também pode influenciar a apoptose de vários tecidos. Estudos mostram que melatonina atua como inibidor de apoptose em células imunes e como um indutor da apoptose em células cancerígenas [46,47], entretanto o mecanismo pelo qual melatonina exerce estes efeitos não é totalmente conhecido. De qualquer forma, melatonina poderia ser usada no tratamento de doenças neurodegenerativas [48] e adicionalmente no tratamento do câncer [49]. Na verdade, vários estudos já mostraram que a melatonina pode influenciar de diversas maneiras os tumores [50]. A atividade anti-tumoral da melatonina está relacionada a efeitos imunomodulatórios, antiproliferativos e antioxidantes [51, 52]. Estudos recentes sugerem também que a melatonina pode, pelo menos em parte, controlar o crescimento tumoral agindo como uma substância anti-angiogênica natural [53]. Em estudos clínicos, Lissoni e colaboradores (2002) analisaram os efeitos terapêuticos de melatonina em diversas neoplasias humanas. Esses dados mostram a eficácia de melatonina no tratamento em termos de estabilização da doença, principalmente em carcinomas de pulmão, colorectal, gástrico e de próstata [54,55]. Adicionalmente, vários trabalhos demonstram o uso de melatonina para o tratamento dos distúrbios do sono [56,57,58].

A metabolização de melatonina ocorre principalmente no fígado, onde é convertida a 6-hidroximelatonina, seguida de conjugação com sulfato ou glucoronato, sendo excretada na urina. Outras vias metabólicas, que ocorrem em alguns tipos celulares, levam a formação de *N*-acetilserotonina e de 3-hidroximelatonina cíclica [59]. Além destas vias, uma parte da melatonina pode ser metabolizada através da via das quinureninas. No sistema nervoso central uma parte da melatonina pode ser oxidada a *N*¹-acetil-*N*²-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) possivelmente através de clivagem oxidativa do anel indólico catalisada por IDO, seguida de deformilação formando *N*¹-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK), por ação da enzima formamidase, assim como ocorre no metabolismo do triptofano [60] (figura 2).

Figura 2. Vias de metabolização de melatonina

Alguns aspectos se sobressaem quando consideramos a possibilidade de que melatonina possa ser oxidada *in vivo* a AFMK. Um dos aspectos é que pode existir uma rota alternativa de metabolização de melatonina em processos inflamatórios (as mesmas que levam ao aumento na expressão de IDO) e a formação *in vivo* de uma gama de compostos análogos a quinurenina e seus produtos. Nosso grupo foi o primeiro a mostrar que melatonina pode ser oxidada a AFMK pela ação da mieloperoxidase (MPO), enzima presente em neutrófilos e monócitos/macrófagos [61]. Se considerarmos a alta eficiência da reação de oxidação de melatonina por MPO quando comparada à oxidação de triptofano pela mesma enzima poderíamos supor que duas rotas são ativas na produção de quinureninas e análogos, especialmente na

vigência de um processo inflamatório. Uma delas dependente de IDO e que atuaria preferencialmente sobre triptofano e outra dependente de MPO com atuação preferencial na melatonina. A dominância de uma rota sobre outra dependeria do tipo celular dominante num sítio específico, uma vez que IDO e MPO tem localizações celulares distintas. Cabe ainda uma consideração adicional quanto à possibilidade de que células do próprio sítio inflamatório sejam capazes de sintetizar melatonina.

Trabalhos mais recentes apontam para a possibilidade de que os compostos do tipo quinurenina originados da clivagem do anel indólico de melatonina, tenham por si mesmos, efeitos biológicos. AFMK e AMK parecem atuar como potentes antioxidantes [62,63]. Adicionalmente, estes compostos também são capazes de inibir a ativação das enzimas ciclooxigenase-2 e iNOs em macrófagos indicando assim, ações anti-inflamatórias para AFMK e AMK [64]. Trabalhos do grupo também demonstraram um efeito inibitório de AFMK e AMK sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-8 e TNF- α) em neutrófilos, sugerindo que parte dos efeitos biológicos descritos para melatonina podem ser mediados pelos seus produtos de oxidação [65]. No entanto, os efeitos biológicos de AFMK e AMK em linfócitos ainda não são conhecidos.

4.3 Linfócitos T

Os linfócitos T são leucócitos mononucleares derivados da medula óssea a partir de uma célula-tronco hematopoiética pluripotente que se diferencia no progenitor linfóide. Estas células são submetidas à maturação no timo e, em seguida são liberadas para a corrente sanguínea constituindo 60 a 70% de todos os linfócitos circulantes. Os linfócitos T têm diversas funções e todas são de extrema importância para o sistema imune, incluindo o reconhecimento específico de antígenos estranhos e a elaboração de mecanismos efetores para eliminá-los do organismo [66].

Para que os linfócitos T sejam ativados, proliferem e tornem-se células efetoras, eles precisam reconhecer o antígeno em associação a molécula do MHC (“major histocompatibility complex”- complexo principal de histocompatibilidade), expressas na superfície das células apresentadoras de antígenos. Uma vez ativado pelas interações de suas moléculas de membrana com as moléculas da membrana da célula apresentadora de antígeno, os linfócitos T apresentam uma série de alterações fenotípicas e funcionais que vão permitir que ele se multiplique, o que é denominado expansão clonal, e influencie a função de outras células [66]. Uma das principais alterações funcionais dos linfócitos T ativados é a secreção de uma série de proteínas chamadas citocinas. Estas proteínas são, na verdade, transmissores solúveis capazes de transmitir informações a outras células que lhes induzem modificações funcionais, proliferação ou até mesmo a morte por apoptose [67].

Dentre as citocinas produzidas pelos linfócitos T, destaca-se a IL-2 que funciona como um fator de crescimento e diferenciação destas células. Assim sendo, ao mesmo tempo em que os linfócitos T secretam IL-2 ocorre o aumento da expressão dos receptores de membrana para este fator de crescimento, tornando assim possível à proliferação celular [68]. Adicionalmente, outras citocinas também são produzidas pelos linfócitos T, tais como o IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-13. Na verdade, o padrão de citocinas produzido pelos linfócitos T ativados é que vai distinguir o fenótipo destas células em subpopulações de linfócitos T_H1 ou T_H2 [69].

Os linfócitos T_H1 produzem citocinas que geralmente estão associadas com a ativação de macrófagos e outros fagócitos, principalmente IFN- γ . Em macrófagos, o

IFN- γ aumenta a expressão das moléculas de MHC classe II e a produção de espécies reativas de oxigênio e de outras citocinas como, por exemplo, IL-1 [70]. Vale ressaltar que estas ações do IFN- γ são reguladas positivamente pela citocinas IL-12 e IL-18 [71] e negativamente pelas citocinas IL-10 e IL-4 [72]. Além disto, IFN- γ também pode ser produzido por outras células, entre elas, células NK e pelos próprios macrófagos [74].

Em relação aos linfócitos T_H2, estas células produzem as citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Como mencionado acima, IL-10 e IL-4 apresentam efeitos inibidores sobre a produção de citocinas de células do padrão T_H1. Adicionalmente, IL-10 é um potente modulador das funções monocíticas e macrofágicas uma vez que inibe a capacidade destas células de apresentar os antígenos [74]. De uma forma geral, todas estas citocinas produzidas pelas células T efetoras exercem vários efeitos que promovem e regulam as respostas imunes e a inflamação, cujo principal objetivo é eliminar os antígenos.

Após a resposta efetora dos linfócitos T ativados contra o antígeno, o próprio sistema imune utiliza uma série de moléculas e vias de sinalização para eliminar estas células por apoptose. Este processo é conhecido como morte celular induzida por ativação (AICD), no qual o linfócito T periférico ativado é induzido a executar sua própria maquinaria apoptótica, a fim de ser eliminado ao final de uma resposta imune. Assim sendo, este mecanismo é parte do processo fisiológico de manutenção da homeostase dos tecidos. A AICD também funciona como um mecanismo de tolerância periférica, ou seja, as células T auto-reativas que escaparam da seleção negativa no timo podem ser eliminadas na periferia por apoptose [75].

O processo de apoptose de células T ativadas primeiramente foi observado em hibridomas de linfócitos T e posteriormente em linfócitos T maduros pré-ativados [76]. A partir de então, os mecanismos intracelulares da morte celular têm sido descritos. Estudos demonstram que a principal via de AICD dos linfócitos T é controlada pelo sistema receptor/ligante Fas [77, 78] (figura 3). O receptor Fas, ou CD95, é o mais conhecido e estudado membro da família dos receptores de TNF e é considerado o protótipo dos receptores de morte [80]. Inserido na membrana citoplasmática, possui um domínio extracelular de interação com seu ligante, o FasL, e, intracelularmente, possui um domínio chamado de DD (*death domain*) [81]. A ativação do receptor ocorre

pela trimerização de moléculas de Fas, induzida pelo ligante, aproximando as porções intracitoplasmáticas. Com isso, há o recrutamento de moléculas adaptadoras FADD, que se ligam ao Fas por uma interação homodimérica (DD-DD) [82]. A molécula FADD possui um outro domínio, o DED (*death effector domain*), que interage com os mesmos domínios DED presentes na caspase-8 e caspase-10, recrutando-as. Este complexo multimolecular recebe o nome DISC (*death inducing signalling complex*). As caspases 8 e 10, encontram-se no citosol sob uma conformação de zimógenos os quais possuem baixa atividade catalítica, embora suficiente para que, ao associar-se ao complexo Fas/FADD, se transativem gerando uma molécula heterodimérica completamente ativa. Estas moléculas se desligam do DISC e iniciam uma cascata de sinalização mediada pelas caspases, que culmina na morte destas células por apoptose [83].

O FasL, ou CD154, foi identificada em 1993 como uma proteína de membrana de 40KDa, ligante do receptor Fas e pertencente à família de TNF [84]. Sintetizado como trímeros, podem se localizar na membrana celular ou serem secretados na forma solúvel [85]. Sua expressão é indutível e ocorre não somente em células imunes, mas também em tecidos não-linfóides [86].

Figura 3. Morte dos linfócitos induzida pela ativação mediada por Fas

Camundongos MRL/lpr e MRL/gld, que possuem uma deficiência na expressão de Fas e FasL, respectivamente, apresentam um fenótipo bastante semelhante, com linfadenopatia e esplenomegalia causada pelo acúmulo de linfócitos ativados [87]. A incidência de doenças autoimunes nestes camundongos é bastante aumentada e ocorre em múltiplos órgãos, indicando que o acúmulo de células ativadas que deveriam estar morrendo por AICD via Fas/FasL não é só um problema de aumento dos órgãos linfóides, mas também um distúrbio grave nos processos de tolerância periférica [88.] Em humanos, a ALPS (*autoimmune lymphoproliferative syndrome*) é uma doença linfoproliferativa, com hepatoesplenomegalia e linfadenopatia, como alta incidência de linfomas, causada por deficiências na expressão de Fas e/ou FasL [89] A existência destas deficiências em humano destaca a importância da AICD e do aprofundamento dos estudos sobre estes mecanismos.

Além das moléculas Fas e FasL, outras moléculas podem interferir na regulação da AICD, entre elas uma proteína chamada FLIP (FLICE- inhibitory protein). FLIP é considerada uma molécula anti-apoptótica devido a sua alta homologia com a caspase 8, ou seja, FLIP é capaz de inibir competitivamente a ligação da caspase-8 ao complexo protéico associado ao Fas, bloqueando assim o sinal apoptótico. A resistência de células T ativadas durante os primeiros dias pós-ativação parece estar relacionada com uma alta expressão de FLIP e a queda dos níveis desta molécula coincide com o período em que ocorre a AICD [90]. A desregulação de uma destas três moléculas pode interferir no processo de AICD e, conseqüentemente gerar doenças auto-imunidade. Sendo assim, compostos endógenos ou exógenos que modulem aspectos da regulação ou indução da AICD estão sendo avaliados para se desenvolver melhores terapêuticas e também para a melhor elucidação das moléculas, mecanismos e vias bioquímicas envolvidas.

Objetivos

5 Objetivos

O objetivo geral deste estudo foi investigar o efeito de triptofano, melatonina e seus produtos de oxidação KYN, AFMK e AMK sobre as funções de linfócitos T ativados. Para tanto, dois objetivos específicos foram estabelecidos:

1. Verificar o efeito de KYN, melatonina, AFMK e AMK sobre a proliferação celular e produção de IL-2, IFN- γ , IL-10 e IL-12 por células mononucleares ativadas com fitohemaglutinina (PHA).
2. Verificar o efeito de melatonina e AFMK na morte celular de linfócitos T induzida por ativação com anticorpos anti-CD3 e os possíveis mecanismos de ação.

Materias e Métodos

6 Materiais e Métodos

6.1 Materiais

6.1.1 Células

- Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram obtidas a partir de sangue venoso de indivíduos aparentemente saudáveis recrutados entre alunos, funcionários e professores do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo (comitê de ética FCF-USP número 157);
- Hibridoma de linfócitos T (linhagem DO11.10), células resultante da fusão de blastos de linfócitos T CD4⁺ de camundongo Balb/c (específicos para um peptídeo de ovoalbumina) com células tumorais da linhagem BW5147, foram gentilmente fornecidas pelo Prof. Dr. Gustavo Amarantes-Mendes (Instituto de Ciências de Biomédicas - Universidade de São Paulo/USP);

6.1.2 Reagentes

DL-quinurenina, melatonina, Histopaque^R (d = 1,077), L-glutamina, meio de cultura RPMI 1640 suplementado com Hepes, estreptomicina, penicilina, lipopolissacarídeos (LPS - *Escherichia coli* O26:B6), IFN- γ recombinante humano, soro fetal bovino, glicose, luminol, lucigenina, iodeto de propídeo (PI), ciclosporina (Csa) e o azul de tripan foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). AFMK e AMK foram sintetizados no laboratório de Bioquímica Clínica (FCF-USP). Bicarbonato de sódio, fosfato de sódio dibásico, fosfato de potássio monobásico, diclorometano, acetonitrila, etanol, metanol foram obtidos da empresa Merk (Darmstadt, Alemanha). Peróxido de hidrogênio (H₂O₂ - 30%) foi obtido da empresa Intec. Fitohemaglutinina (PHA) foi adquirida da empresa GIBCO BRL - Life Technologies. [³H]-timidina e Triton-X foram adquiridos da empresa Amersham Bioscience. Os “kits” DuoSet para determinação por ELISA das citocinas IL-2, IL-10, IL-12 e IFN- γ foram adquiridos da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Os reagentes utilizados para as reações de PCR, para a extração de RNA e conversão para cDNA bem como os oligonucleotídeos

foram adquiridos da Invitrogen Co. (Carlsbad, CA, EUA). Os anticorpos anti-CD3 (clone 2C11), anti-Fas (anti-Jo2) e anti-FasL-PE e os materiais para transformação bacteriana, eletroporação e ensaios de Luciferase foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Gustavo Amarante Mendes (ICB-USP). Os anticorpos anti-NFAT1 e anti-fosfo-NFAT utilizados para a marcação de western blots foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. João Viola (INCA-RJ). Os reagentes para o ensaio de retardamento de bandas foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Regina Markus (Instituto de Biociências-USP).

6.2 Métodos

6.2.1 Síntese de AFMK e AMK

AFMK e AMK foram sintetizados a partir da oxidação química de melatonina [90]. Melatonina (1 mM) foi dissolvida em 100 mL de H₂O₂ (30%), esta reação foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente sob forte agitação. Após este período, foi realizada uma extração (1:1) com 100 mL de diclorometano. Em seguida, o solvente foi evaporado e o produto bruto foi ressuspensionado em H₂O milliQ [90]. 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 (500µL) em uma coluna preparativa C18 shimadzu Shim-pack, usando acetonitrila: H₂O (25:75) como fase móvel e com fluxo de 10 mL/min. Os picos correspondentes ao AFMK e AMK foram coletados, concentrados, redissolvidos em um pequeno volume de água e metanol (1:1) e submetidos à identificação por espectrometria de massa ([M+H⁺] m/z = 265 (AFMK) e [M+H⁺] m/z = 237 (AMK)) usando eletrospray (ES/MS) Spectômetro de Massa Quattro II (micromass, Manchester, UK) (figura 4) e espectrofotometria UV-visível (AFMK λ_{max} = 340, AMK λ_{max} = 380) (figura 5). As concentrações de AFMK e AMK foram determinadas usando absorção em 340 nm (ϵ_{340} = 3600 M⁻¹cm⁻¹) e 380nm (ϵ_{380} = 4500 M⁻¹cm⁻¹), respectivamente [60].

Figura 4. Espectro de massa de AFMK (protonado com H^+) e AMK (protonado com H^+) resultantes da oxidação da melatonina.

Figura 5. Espectro UV-VIS de AFMK $\lambda_{\max} = 340$ nm e AMK $\lambda_{\max} = 380$ nm.

6.2.2 Cultura de Células

6.2.2.1 Células Mononucleares (PBMC)

PBMC foram isolados através do gradiente Ficoll-Hypaque (Histopaque^R; d=1.077), como descrito por Boyum, A (1968) [91] e cultivados em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com Hepes 10 mM, L-glutamina 2 mM, soro fetal bovino 10%, estreptomicina 100µg/mL e penicilina 100UI/mL. As células (1×10^7 /mL) na presença de 2% de PHA foram incubadas com KYN, MEL, AFMK ou AMK (10^{-9} a 10^{-3} M) por diferentes tempos em placas de 96-poços na estufa (37°C com 5% de CO₂). A viabilidade celular foi determinada com Azul de Tripán (0,2%). O material submetido à cultura foi recolhido: o sobrenadante utilizado para os ensaios de ELISA e as células livres do sobrenadante foram recuperadas para os ensaios de linfoproliferação e apoptose.

6.2.2.2 Cultivo de Células DO11.10

O cultivo do hibridoma de célula T foi feito em meio RPMI-1640 suplementado com Hepes 10 mM, L-glutamina 2 mM, soro fetal bovino 10%, estreptomicina 100µg/mL e penicilina 100UI/mL em garrefas horizontais de 25 cm² mantidas em estufa (37°C com 5 % de CO₂). O repique foi realizado, em média, três vezes por semana. O uso das células para os experimentos foi condicionado ao mínimo de 95% de viabilidade verificada por exclusão ao Azul de Tripán 0,2%. A contagem do número de células tanto para repique como para a execução dos experimentos foi feita com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

6.2.3 Ensaio de Proliferação Celular

A proliferação celular foi avaliada através do método de incorporação de [³H]-timidina. PBMC (1×10^7 /mL) foram incubados na presença de KYN, MEL, AFMK ou AMK por 72 horas de cultura em placas de 96 poços em estufa (37°C com 5% CO₂).

Após este período, 1 $\mu\text{Ci/mL}$ de [^3H]-timidina foi adicionado ao meio de cultura por 18 horas. Em seguida, as células foram coletadas em um papel filtro por um coletador automático (Cell Harvester) e a radioatividade foi mensurada em contador de emissões beta.

6.2.4 Determinação de Citocinas

As citocinas foram mensuradas por ensaio imunoenzimático quantitativo. As determinações de IL-2, IL-10, IL-12, IFN- γ foram realizadas em placas de ELISA utilizando os Kits DuoSet da R&D System (Minneapolis, MN, USA) e de acordo com as especificações do fabricante.

6.2.5 Ensaio de Morte Celular Induzida por ativação (AICD)

Primeiramente, o anticorpo anti-CD3 (1 $\mu\text{g/mL}$) em tampão Tris 50 mM pH 9,0 foi imobilizado em placas de 96 poços por duas horas na estufa (a 37°C com 5 % de CO_2). O controle foi feito apenas com tampão nos poços da placa. O volume referente à solução de anticorpos anti-CD3 (100 $\mu\text{l/poço}$) foi retirado das placas para que as células DO11.10 (1,5 $\times 10^5/\text{poço}$) fossem plaqueadas. Então, foi adicionada a suspensão celular diferentes doses dos compostos a serem estudados (melatonina, AFMK ou AMK). As placas, por sua vez, foram incubadas por 18 horas na estufa (37°C com 5 % de CO_2). Após o período de incubação, as células foram recuperadas das placas, centrifugadas (210g, 4°C, 5 min) e ressuspensas em tampão HFS (solução fluorescente hipotônica - “hypotonic fluorescent solution”) contendo 0,1% de citrato de sódio; 0,1% de Triton X-100; 50 $\mu\text{g/ml}$ de iodeto de propídeo (PI) para posterior análise do conteúdo de DNA através de citometria de fluxo.

6.2.6 Quantificação de morte celular por apoptose através da citometria de fluxo

Para a quantificação da apoptose foi utilizada a técnica de citometria de fluxo, baseada na análise do conteúdo de DNA genômico.

6.2.6.1 Fragmentação de DNA

As células ressuspensas na solução de HFS foram incubadas (2-8 °C) no escuro por 2 horas. Em seguida, o índice de fragmentação de DNA foi quantificado em FACScalibur (Becton & Dickinson) utilizando o canal de fluorescência 2 (FL-2) para iodeto de propídeo (PI). As análises foram quantificadas usando o software “Cell Quest” (Becton & Dickinson), o qual permite analisar todas as células adquiridas (5.000/amostra) ou apenas determinadas populações, individualizadas por janelas (ou “gates”) estabelecidas com base em parâmetros de tamanho (FCS) e granulosidade (SSC) ou fluorescência (FL).

6.2.6.2 Técnica de Exclusão de Iodeto de propídeo

Além da solução de HFS, as células também foram ressuspensas em PBS 1X contendo 5µg/ml de iodeto de propídeo. As células positivas para iodeto de propídeo foram consideradas necróticas quando analisadas por citometria de fluxo.

Na técnica anterior (Fragmentação do DNA), utiliza-se solução hipotônica fazendo com a membrana plasmática seja arrebentada sobrando somente os núcleos. Como os núcleos são permissivos à entrada de iodeto de propídeo, todos são marcados e a análise é feita a partir da intensidade de fluorescência.

Na técnica de exclusão de iodeto de propídeo, como se utiliza solução isotônica, a integridade das membranas é preservada. Assim, somente as células necróticas, que possuem desestabilização da membrana plasmática, permitem a entrada do iodeto de propídeo, sendo as únicas, portanto, marcadas com este corante.

6.2.7 Extração de RNA total

As células DO11.10 (5×10^5) foram transferidas para um tubo eppendorf 1,5mL e centrifugadas a 420g por 3min. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 0,5mL de TRIzol agitando em vortex. Após 5 minutos de incubação em temperatura ambiente, adicionou-se 0,1 mL de clorofórmio seguida de nova incubação por 2min. Centrifugou-se a 12.000g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo.

Foi então adicionado isopropanol (0,25 mL) seguido por uma incubação a -20°C por 2h. Centrifugou-se novamente e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 1mL de Etanol 75% e posteriormente centrifugou-se a 7500g por 5min a 4°C. Secou-se o precipitado e ressuspendeu-se em 30µl de água destilada, livre de RNase e DNase. A quantificação foi feita utilizando-se um espectrofotômetro (*SpectraMax 190 – Molecular Devices*) com comprimento de onda de 260/280nm.

6.2.8 Conversão de RNA para cDNA

O RNA (1 a 3 µg) foi diluído em 11µL de água livre de RNases e colocado em tubos de 0,5mL. Foi adicionado 1,0µL de 500µg/ml de oligo dT, seguido de aquecimento a 70°C por 10min e rápido resfriamento em gelo. Acrescentou-se 8µL do mix Superscript (4µL de Tampão 5x; 1µL de dNTP 10mM; 2µL de DTT 0,1M e 1,0µL Superscript R/T II 200U/µl) e incubou-se a 42°C por 50min. A enzima foi inativada incubando-se a 90°C por 5min seguidos por 5min a 4°C. Foi acrescentado 1µL de RNase H e deixou-se em incubação por mais 20min a 37°C para remover as fitas de RNA. O volume final foi acertado para 100uL com água livre de RNases.

6.2.9 Reação em cadeia da Polimerase por Transcrição Reversa (RT-PCR)

Cada reação foi composta por 5µL de tampão 10X, 1µL de 10mM DNTPs, 1,5µL de MgCl₂, 1µL de cada *primer* (15pmoles/µL), 0,5µL de Taq DNA polimerase e 1, 5 ou 10µL da amostra de cDNA, em um volume final de 50µl. O ciclo básico de amplificação utilizado foi: 95°C/300s + **N**(95°C/45s, **TA**/60s, 72°C/45s) + 72°C/120s, sendo N o número de ciclos e TA a temperatura de anelamento estimada para cada par de oligonucleotídeos. As amostras foram armazenadas a -20°C. Os pares de primers utilizados para a amplificação dos genes de interesse estão discriminados na Tabela 01, que ainda inclui o tamanho esperado para os produtos de PCR.

Tabela 01. Seqüência dos pares de oligonucleotídeos utilizados, o fragmento gênico amplificado correspondente e o tamanho esperado do produto da reação.

Fragmento Gênico	Primer Forward	Primer Reverse	Tamanho esperado amplificação (pb)
Actina	TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C	TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G	349
Fas	GAG GAC TGC AAA ATG AAT GGG G	ACA ACC ATA GGC GAT TTC TGG G	319
FasL	CAG CAG TGC CAC TTC ATC TTG G	TTC ACT CCA GAG ATC AGA GCG G	471
FLIP	TGT TCC ACG CAT ACA CTT TGT CC	CAT GAC ATA ACC CAG ATT GTT CGC	501

As amostras resultantes deste processo foram aplicadas em gel de agarose 1,5% e visualizadas através de um transiluminador de UV para que, em comparação com o marcador molecular, fosse analisado se os tamanhos de amplificação obtidos correspondiam aos esperados. Estas imagens foram digitalizadas com a ajuda do software *Adobe PhotoShop* versão 7.0 (*Adobe Systems Incorporated*) e as análises densitométricas foram feitas através do software *Alpha Easy* versão 5.5 (*Alpha Inotech Cooperation*).

6.2.10 Imunofluorescência para proteínas de superfície

Células DO11.10 ($2,5 \times 10^5$ cel.) foram centrifugadas a 240g por 5min a 4°C e ressuspendidas em 200µl de DBSS enriquecido com 5% de Soro Fetal Bovino e 0,1% de azida sódica. Após nova centrifugação, o *pellet* foi ressuspendido em 20µL da mesma solução contendo os anticorpos desejados. Após 30min de incubação a 4°C no escuro, as células foram lavadas duas vezes em 200µL de DBSS contendo 0,1% de azida. Em seguida, foram ressuspendidas em 300µL de DBSS com 0,1% de azida e 1% de paraformaldeído. A leitura no citômetro de fluxo foi feita até 1h após este tratamento. O DBSS é composto de 8g NaCl, 0,4g KCl, 0,36g Na₂HPO₄.7H₂O, 0,06g KH₂PO₄ e 1g glicose em 1L de água milliQ.

6.2.11 Western-blot

Para a preparação das amostras (lisado total), uma alíquota da ordem de 10^6 células de cada suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 210 g e o sedimento celular solubilizado em 80-100 μ l de tampão de amostra contendo SDS (50mM Tris-HCl, pH 6,8; 2% SDS, 10% glicerol e 2,5% de β -mercaptoetanol). A amostra foi, então, aquecida a 100°C por 5 minutos e estocada no freezer -20°C.

As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida contendo SDS e foram submetidas à carga elétrica para a realização da eletroforese. A presença de detergente (SDS) desnatura as proteínas das amostras e neutraliza suas cargas, fazendo com que elas migrem no gel de acordo com sua massa molecular.

Após a eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de PVDF e marcadas com a incubação com os anticorpos específicos. A detecção dos imunocomplexos foi feita pelo método de quimioluminescência utilizando o kit ECL (Amershan) e a posterior exposição das membranas a um filme de auto-radiografia. Os filmes foram escaneados e digitalizados pelo *software HP PrecisionScan LTX* (Epson Co.).

6.2.12 Transformação das bactérias

As bactérias foram transformadas pelo método de choque térmico. Os plasmídeos foram adicionados a 50 μ L de bactérias competentes, em gelo por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram incubados a 42°C por 1min30s e rapidamente transferidos para gelo, incubando-se por mais 5 minutos. Adicionou-se na sequência, 450mL de LB e as bactérias foram incubadas por 1h a 37°C, sob agitação orbital para expressão do gene de resistência. Após este período, 50 μ L da suspensão de bactérias foram plaqueados em placas de Petri com meio sólido LB (1,5 g/L de ágar e o 50 μ g/mL de ampicilin), incubando-a na estufa a 37°C por um período de 14-16hs.

6.2.13 Extração de DNA plasmidial

Para a obtenção de plasmídeos em grande escala, utilizamos as colunas QIAGEN 100 ou 500mL, aplicando o protocolo de lise alcalina padrão, para midi e maxi-prep, respectivamente, descritos no manual do produto. Após a transformação bacteriana, uma colônia foi selecionada e cultivada em 3 mL de meio líquido LB contendo ampicilina na concentração descrita acima por 8h a 37°C sob agitação constante (300 rpm). A seguir, esta cultura foi diluída 1:1000 em meio LB com antibiótico. As bactérias foram então crescidas por 14-16h a 37°C em agitação de 300rpm e em seguida, centrifugadas a 6000g por 15min a 4°C. O precipitado foi ressuspensionado na solução P1 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA e 100 µg/ml de RNase A) e a lise celular ocorreu pela adição da solução P2 (200 mM NaOH, 1%SDS), por 5 minutos a 4°C. Após este período adicionamos a solução P3, de neutralização (3M acetato de potássio pH=5,5), mantendo a mistura por 15-20 minutos no gelo. Para a separação do DNA dos resíduos bacterianos, o lisado bacteriano foi centrifugado a 20.000g por 30minutos a 4°C (Himac C30B2, Hitachi) e o precipitado descartado. A solução contendo o DNA foi aplicada a colunas contendo resina de sílica para ligação do DNA. As colunas foram lavadas com uma solução de 1M NaCl, 50mM MOPS (pH=7,0) e 15% de isopropanol, e o DNA foi recuperado por eluição em uma solução de 1,6M NaCl, 50 mM Tris-Cl (pH=8,5) e 15% isopropanol. O DNA foi precipitado com 0,7vol de isopropanol, e centrifugado por a 15.000 por 30 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado duas vezes para remoção de sais e outros reagentes com 2mL de etanol 70% por centrifugação a 15.000 g por 10min. O precipitado de DNA plasmidial foi ressuspensionado em 50µL de tampão solução de TE pH=8,0 (10 mM Tris-Cl, 0,1 mM EDTA), ou 50% TE, 50% H₂O milli-Q.

6.2.14 Eletroporação

As células DO11.10 ou Jurkat foram ressuspensionadas em 600µl meio DMEM e transferidas para uma cubeta de 0,2mm próprias para eletroporação. A estas células

foram adicionadas diferentes concentrações de plasmídeos, que variaram de 10 a 40µg.

O pulso eletromagnético foi realizado na máquina GenePulser II (Biorad), utilizando-se diferentes combinações de voltagem e capacitância. Após a eletroporação, as células ficaram em repouso por 10min na cubeta, antes de serem transferidas para placas de 100mm² contendo 15ml de meio RPMI completo. Durante a transferência destas células foi descartado o precipitado que se forma na superfície, que é composto em sua grande maioria por células mortas durante o choque. As placas ficaram em repouso por mais 30 minutos em temperatura ambiente antes de serem levadas à estufa. Este procedimento foi adotado para maximizar o fechamento dos poros gerados pelo pulso eletromagnético reduzindo os níveis de morte causados por um possível excesso de gás carbônico da estufa permeando as células, acidificando-as. Em geral, as células foram incubadas por 24h antes de se prosseguir com os tratamentos desejados.

6.2.15 Ensaios de Luciferase

Vinte e quatro horas após a eletroporação das células com plasmídeos repórteres de luciferase, diferentes estímulos foram aplicados e 18h depois a leitura da expressão de luciferase foi realizada. Para tanto, 10⁵ a 10⁶ células foram transferidas para um eppendorf e centrifugadas a 420g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado celular foram adicionados 30µl de solução de lise 1X fornecida pelo fabricante do kit. Após 10minutos de incubação, a solução foi centrifugada a 12000g por 1minuto a 4°C e o sobrenadante (contendo a luciferase que foi expressa) transferido para um tubo novo. A quantificação foi feita adicionando-se 10ul de cada amostra a 50µl de luciferina. A luminescência foi captada por um luminômetro (microplate LB96V, EG&G Berthold) e transformadas em unidades relativas de luz (ULR).

6.2.16 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

A produção de ROS foi avaliada por citometria de fluxo, como descrito anteriormente [93]. Brevemente, células DO11.10 foram lavadas com PBS gelado e, em seguida tratadas com o diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH) ou dihidroetídeo (DHE) na concentração de 5 μ M por 30 minutos a 37⁰C. Após este período de incubação, as células foram estimuladas ou não com os anticorpos anti-CD3 no período de 15, 30, 45 e 60 minutos. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo utilizando os canais de fluorescência 2 (FL-2) para DCFH e o canal de fluorescência 3 (FL-3) para o DHE. As análises foram quantificadas utilizando o software “Cell Quest” (Becton & Dickinson), o qual permite analisar todas as células adquiridas (5.000/amostra) ou apenas determinadas populações.

6.2.17 Ensaio de retardo da mobilidade eletroforética (EMSA)

Para verificar a participação do fator de transcrição NF-kB na expressão gênica foi utilizada o Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética (EMSA). Esta técnica baseia-se no fato de que a mobilidade eletroforética de um ácido nucléico se altera quando uma proteína a ele se liga. A proteína de interesse, ou uma preparação de proteínas obtida de um determinado tipo celular sob estudo, é incubada com segmentos de DNA de fita dupla marcados radioativamente (sondas), para permitir a formação de um complexo. A mistura é, então, submetida à eletroforese sob condições não desnaturantes. O complexo DNA/proteína formado apresenta, em geral, uma mobilidade eletroforética mais lenta quando comparada àquela exibida pela sonda livre e as bandas correspondentes ao DNA ligado à proteína e ao DNA livre são visualizadas por autoradiografia. Para realização deste ensaio, o oligonucleotídeo de dupla-fita com consenso para NF-kB (5'AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') foi marcado nas extremidades com [γ -32P]ATP na presença da T4 polinucleotídeo quinase por 10 min a 37⁰C. Os nucleotídeos não incorporados foram removidos através da coluna de Sefadex G-25 (Amersham). Os extratos nucleares das células DO11.10 foram incubados com o tampão do ensaio (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 1 mM MgCl₂; 50

mM NaCl; 0,5 mM DTT; 0,5 mM EDTA; 4% glicerol e 1 μ g de poli(dIdC) por 20 minutos à temperatura ambiente em volume final de 20 μ L. Posteriormente, cada amostra foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente com 40.000 cpm dos oligonucleotídeos. Os complexos proteína-DNA foram avaliados em gel não-desnaturante 6% de acrilamida:bisacrilamida em 0,25 x de tampão Tris-borato/EDTA (TBE) a 150 V por 1h e 30 min. Após secagem, o gel foi exposto em um filme autoradiográfico por 20-24 hs a -70°C e analisados densitometricamente.

6.2.18 Análises Estatísticas

Foi realizada a análise de variância de uma via (ANOVA) e o teste de comparação múltipla de Dunnett quando $p \leq 0,05$ através do programa Instat. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão (EP) para pelo menos três experimentos independentes.

Resultados e Discussão

7 Resultados e Discussão

Visando o melhor entendimento, os resultados e discussões estão agrupados em duas partes:

- (I) Efeito de KYN, melatonina, AFMK e AMK na proliferação celular e na produção de IL-2, IFN- γ , IL-10 e IL-12 por células mononucleares ativadas com PHA.
- (II) Efeito de melatonina e AFMK na morte celular de linfócitos T induzida por ativação com anticorpos anti-CD3 e os possíveis mecanismos de ação.

Efeito de KYN, melatonina, AFMK e AMK na proliferação celular e na produção de IL-2, IFN- γ , IL-10 e IL-12 por células mononucleares ativadas com PHA.

7.1 Resultados

7.1.1 Efeito de KYN, melatonina, AFMK e AMK sobre as funções de células mononucleares ativadas com PHA.

Para estudar os efeitos de KYN, melatonina, AFMK e AMK sobre as funções de linfócitos T, utilizamos como modelo células mononucleares de sangue periférico ativadas com fitohemaglutinina (PHA). PHA é uma proteína de planta (lectina), que se liga especificamente a certos resíduos de açúcares das glicoproteínas de superfície dos linfócitos T, incluindo as proteínas dos receptores TCR e CD3, e deste modo estimulam as células. Portanto, PHA é comumente utilizada em ensaios imunológicos para ativação de células T.

Inicialmente, avaliamos o efeito de KYN, melatonina, AFMK e AMK na produção da citocina IL-2 e na proliferação das células mononucleares ativadas com PHA (figuras 6 e 7). KYN, na concentração de 10^{-3} M, inibiu a produção da citocina IL-2 após o período de incubação de 12 horas (figura 6 A), entretanto não afetou significativamente a proliferação dos PBMC após 72 horas de cultura (figura 7 A). Melatonina e seus produtos de oxidação, AFMK e AMK, inibiram a produção da IL-2 na mesma intensidade observada para KYN (figura 6 B-D) e com relação à proliferação celular, estes três compostos foram mais eficientes do que KYN. Na concentração de 10^{-3} M, melatonina, AFMK e AMK inibiram 20, 40 e 35% a proliferação dos PBMC, respectivamente (figura 7 B-D).

Figura 6. Efeito de KYN (A), melatonina(B), AFMK (C) e AMK(D) em diferentes concentrações (10^{-6} - 10^{-3} M) na produção da citocina IL-2 por PBMC. As células foram estimuladas com PHA e tratadas com os compostos. Após 12 horas, o sobrenadante da cultura foi recolhido e a citocina foi quantificada por ELISA. Estes dados representam a média $\pm$ EP de 3 experimentos (* equivale a $p \leq 0,05$).

Figura 7. Efeito de KYN (A), melatonina(B), AFMK (C) e AMK(D) em diferentes concentrações (0,5 - 1mM) na proliferação dos PBMC. As células foram estimuladas com PHA e tratadas com os compostos. Após 72 horas, a incorporação de [³H]-timidina foi utilizada para analisar a proliferação celular. Estes dados representam a média ± EP de 4 experimentos (*equivale a p≤ 0,05).

Em seguida, avaliamos o efeito destes compostos na produção da citocina IFN- γ nas mesmas condições experimentais e tempo de cultura utilizado no ensaio de proliferação celular. Como observado na figura 8, KYN foi capaz de inibir a produção de

IFN- γ . O efeito inibitório de KYN foi observado a partir de 10^{-5} M e a máxima inibição foi $\geq 60\%$ na concentração de 10^{-3} M (figura 8 A). Da mesma forma que KYN, melatonina, AFMK e AMK também inibiram a produção de IFN- γ . Comparando todos os compostos, AFMK foi o mais eficiente na inibição já que a partir da dose de 10^{-6} M foi observado um efeito inibitório (figura 8 B-D).

Figura 8. Efeito de KYN (A), melatonina (B), AFMK (C) e AMK(D) em diferentes concentrações (10^{-9} - 10^{-3} M) na produção da citocina IFN- γ por PBMC. As células foram estimuladas com PHA e tratadas com os compostos. Após 72 horas, o sobrenadante da cultura foi recolhido e a citocina foi quantificada por ELISA. Estes dados representam a média $\pm$ EP de 4 experimentos (* equivale a $p \leq 0,05$).

Vale ressaltar que o efeito de melatonina, AFMK e AMK na proliferação celular não é suficiente para explicar a inibição de IFN- γ , uma vez que as concentrações nas quais estes compostos inibem a produção de IFN- γ foram bem menores e não afetam a proliferação celular.

Adicionalmente, verificamos se KYN, melatonina, AFMK e AMK afetavam a viabilidade celular. Para isso, as células foram cultivadas por 72 horas na presença destes compostos (10^{-3} M) e analisado a fragmentação do DNA por citometria de fluxo. Como pode ser visualizado na figura 9, nenhum dos compostos alterou a viabilidade celular na concentração avaliada.

Figura 9. Efeito de KYN, melatonina, AFMK e AMK na concentração de 10^{-3} M na apoptose. Após 72 horas, as células foram recolhidas e a apoptose foi analisada por fragmentação de DNA através da incorporação de iodeto de propídeo (PI) e citometria de fluxo.

A partir deste resultado, passamos a investigar de que forma estes compostos poderiam modular a produção de IFN- γ . Tendo em vista que a citocina IL-12 é o principal estimulador da produção de IFN- γ nos linfócitos T e a citocina IL-10 é um importante inibidor desta síntese [72], analisamos o efeito de KYN, melatonina, AFMK e AMK na produção destas citocinas. Sabendo que PHA não é um bom indutor da síntese de IL-12, utilizamos como estímulo o LPS ($1\mu\text{g/mL}$) associado ao IFN- γ (1000 ng/mL) [72]. Nenhum dos compostos foi capaz de inibir significativamente a produção de IL-12 nas concentrações em que inibem a produção de IFN- γ (figura 10).

Da mesma forma, a produção de IL-10 não foi alterada por KYN, melatonina, AFMK ou AMK (figure 11).

Figura 10. Efeito de KYN (A), melatonina(B), AFMK (C) e AMK(D) em diferentes concentrações (10^{-5} - 10^{-3} M) na produção da citocina IL-2 por PBMC. As células foram estimuladas com LPS ($1\mu\text{g/mL}$) e IFN- γ (1000 ng/mL) e tratadas com os compostos. Após 72 horas, o sobrenadante da cultura foi recolhido e a citocina foi quantificada por ELISA. Estes dados representam a média $\pm$ EP de 3 experimentos.

Figura 11. Efeito de KYN (A), melatonina(B), AFMK (C) e AMK(D) em diferentes concentrações (10^{-9} - 10^{-3} M) na produção da citocina IL-10 por PBMC. As células foram estimuladas com PHA e tratadas com os compostos. Após 72 horas, o sobrenadante da cultura foi recolhido e a citocina foi quantificada por ELISA. Estes dados representam a média $\pm$ EP de 3 experimentos.

Assim sendo, o efeito de KYN, melatonina, AFMK e AMK na inibição de IFN- γ , provavelmente, não está correlacionado à uma diminuição de IL-12 ou um aumento da síntese de IL-10.

7.2 Discussão

Embora a metabolização do triptofano seja um processo chave na inibição da proliferação dos linfócitos T [94], nós descrevemos aqui efeitos complementares que mostram que em condições nas quais KYN não afeta a proliferação ou apoptose dos PBMC, este composto é capaz de inibir a produção do IFN- γ (figura 8). Nas concentrações de 10^{-5} e 10^{-3} M, KYN inibiu 25% e 74% a produção de IFN- γ em PBMC, respectivamente. Este efeito inibitório de KYN não foi mediado pelo aumento de IL-10 ou uma diminuição de IL-12, uma vez que a síntese destas citocinas não foi afetada por KYN em altas concentrações (10^{-3} M).

Os efeitos biológicos desencadeados pelos produtos de oxidação do triptofano ganharam importância após a descoberta que a atividade de IDO protege o feto da imunidade celular mediada por células T maternas [15]. A partir disso, vários estudos estão sendo realizados para adicionar novos conhecimentos sobre o papel da IDO na resposta imune, tais como manutenção da homeostasia e tolerância imunológica [95-97]. Neste sentido, alguns trabalhos mostram que diferentes tipos celulares apresentam diferentes níveis de susceptibilidade à ação da KYN e dos outros metabólitos do triptofano. Por exemplo, os linfócitos B e as células NK são mais susceptíveis a apoptose do que os linfócitos T e as células dendríticas são as mais resistentes [1**Erro! Fonte de referência não encontrada.**]. A razão para tal susceptibilidade ainda não é completamente conhecida, mas um estudo sugere que o IFN- γ induz a enzima triptofanil-tRNA sintase na células resistentes às ações da IDO promovendo assim, um mecanismo de proteção contra a degradação e depleção do aminoácido triptofano [98].

A maioria dos efeitos tóxicos induzidos pela IDO estão relacionados aos produtos finais da via das quinureninas, tais como o 3HAA e o ácido quinolínico [1]. Embora KYN seja o primeiro e principal de metabolização do triptofano, estudos envolvendo os efeitos biológicos de KYN no sistema imune são limitados. O conhecimento das atividades biológicas de KYN é importante especialmente se considerarmos que: (i) a maioria das células do corpo não possuem a maquinaria bioquímica necessária para subseqüentes metabolizações a partir de KYN e (ii)

diferentes estímulos ou combinações dos mesmos podem diferentemente regular as enzimas envolvidas na via das quinureninas [25].

A oxidação do triptofano catalisada pela IDO pode ser considerada um mecanismo de controle da homeostasia através da morte dos linfócitos T [23]. Desta maneira, a tolerância e a auto-imunidade são reguladas por mecanismos de depleção (figura 12). Neste estudo, descrevemos uma característica adicional originada da reação catalisada por IDO na regulação do sistema imune e que não envolve depleção, mas sim anergia, isto é uma inativação funcional dos linfócitos sem morte celular. Este efeito poderia contribuir para um mecanismo de auto-limitação dos monócitos por células T ativadas produtoras de IFN- γ , promovendo um feedback negativo mantido por KYN.

Embora o eixo IFN- γ -IDO-oxidação de triptofano esteja amplamente considerado na imunossupressão, mostramos aqui que melatonina e seus produtos de oxidação também possuem atividade similar observada para KYN. Melatonina, AFMK e AMK também inibem a produção de IFN- γ em uma via que não é mediação por IL-12 ou IL-10 (figuras 10 e 11). Merece atenção o fato de que IFN- γ inibe a formação de melatonina por macrófagos peritoniais residentes [99] e a degradação de melatonina e a síntese de AFMK ocorrem em neutrófilos e monócitos/macrófagos em uma via independente de IFN- γ e, conseqüentemente independente de IDO [100]. Recentemente, foi demonstrado que melatonina, ao contrário do que previamente suposto não é um substrato de IDO [101]. Portanto, a inibição de IFN- γ pode, em muitos casos, ser desenvolvida em condições que não ativam a enzima IDO.

Figura 12. Atividades imunoregulatórias dos metabólitos de triptofano e melatonina nos processos de tolerância imunológica.

IFN- γ é produzido predominantemente por células T e NK após estimulação com antígenos ou mitógenos e os mecanismos regulatórios desta síntese cabem as citocinas IL-12 e IL-10 [72,102], neste trabalho sugerimos um controle independente destas duas citocinas. Um possível mecanismo de ação pelo qual KYN, melatonina e AMK inibem a produção de IFN- γ pode estar centrado nas propriedades antioxidantes destes compostos [103,104]. Antioxidantes modificam o estado redox da célula e levam consequentemente a um decréscimo na produção de citocinas. Esta proposta é consistente com a ativação, por espécies reativas de oxigênio (ROS), dos caminhos de sinalização importantes na inflamação, por exemplo, com o mecanismo geral de ativação de fatores de transcrição, tal como o Fator Nuclear kB (NF-kB, *nuclear factor-kB*) [105]. De fato, alguns trabalhos demonstram que melatonina inibe a ativação de fatores de transcrição, modulando assim a síntese de citocinas [106].

Embora estudos anteriores demonstraram um efeito estimulatório de melatonina nas células T e monócitos [107,108], neste trabalho observamos um efeito inibitório. As possíveis razões para esta contradição são: (i) baixas concentrações de melatonina utilizadas [109], (ii) as células não foram ativadas ou foram pouco ativadas [110], (iii)

diferentes tipos de estímulos foram usados [111] e (iv) a síntese endógena de melatonina foi inibida antes da adição da melatonina exógena [112]. No nosso estudo foram utilizadas altas doses de melatonina e as células estavam ativadas.

A concentração sérica de KYN e melatonina em humanos esta, respectivamente, ao redor de 1-3 μ m e 10-200 pg/mL [113, 30]. Embora estas concentrações de KYN e melatonina sejam baixas quando comparadas com as concentrações em que são ativas nos linfócitos, isto não exclui a existência de altas concentrações destes compostos em locais específicos no corpo e no compartimento intracelular, assim como em condições patológicas. Na infecção por HIV, por exemplo, a concentração sérica de KYN pode duplicar [29]. Além disto, é descrito na literatura, que macrófagos e células dendríticas são capazes de sintetizar grandes quantidades de KYN [7]. O mesmo fato ocorre para melatonina [99]. Embora em mamíferos, melatonina seja produzida predominantemente na glândula pineal, a síntese extrapineal de melatonina foi demonstrada em vários tecidos e tipos celulares [31,32]. Por exemplo, PBMC são muito eficientes na síntese de melatonina e AFMK foi encontrado em altas concentrações em líquido cefaloraquidiano (CSF) em condições inflamatórias [115].

IFN- γ tem um papel central na defesa do organismo tanto na imunidade inata quanto na imunidade adquirida e em geral, estimula o desenvolvimento e funções das células efectoras do sistema imune [116]. Por outro lado, IFN- γ está intimamente envolvido na patogênese de várias doenças tais como o choque séptico ou alguns tipos de doenças autoimunes [117-118]. Assim, a produção de KYN, melatonina e seus produtos de oxidação poderiam contribuir para evitar um descontrole na produção de IFN- γ (figura 13).

Em conclusão, consideramos que a habilidade dos PBMC converterem triptofano em melatonina tem sido negligenciada na discussão sobre os mecanismos de imunoregulação. Aqui, mostramos que KYN tem efeitos importantes no controle da produção de IFN- γ e que melatonina e seus produtos de oxidação possuem atividades imunomodulatórias similares a de KYN. Isto é importante uma vez que infecções dependentes ou não de IFN- γ tem a possibilidade de controlar os linfócitos através de KYN ou compostos semelhantes às quinureninas. Adicionalmente, este estudo complementa dados anteriores do nosso grupo que demonstram o efeito de melatonina, AFMK e AMK na produção de citocinas por neutrófilos [65].

Figura 13. Alça comum de regulação de IFN- γ via IL-12 e mútua regulação entre macrófagos e linfócitos (A). Quando a produção de IDO (ativada por IFN- γ ou por outros estímulos) é estimulada ocorre à síntese de KYN que age em linfócitos inibindo a produção de IFN γ . Desta forma dá-se uma retroalimentação negativa (B). Há ainda a possibilidade de conversão de triptofano à melatonina numa seqüência promovida por alguns ativadores tais como LPS, mas não IFN- γ (C). Desta forma há a possibilidade de inibição de IFN- γ numa via independente de IDO.

Efeito de melatonina e AFMK na morte celular de linfócitos
T induzida por ativação com anticorpos anti-CD3 e os
possíveis mecanismos de ação.

7.3 RESULTADOS

7.3.1 Efeito de melatonina e AFMK sobre a AICD de células T DO11.10

O modelo experimental de AICD utilizado neste estudo foi o hibridoma de linfócito T DO11.10, estimulados à morte pelo anticorpo anti-CD3 (clone 145-2C11) adsorvidos em placa de cultura na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ [118]. Inicialmente, analisamos o efeito de melatonina e AFMK na morte das células DO11.10 estimuladas com o anticorpo anti-CD3. Para tanto, concentrações crescentes de melatonina ou AFMK (0,125 - 1 mM) foram administradas às células DO11.10 concomitantemente ao estímulo por anticorpos anti-CD3. Após 18h, as células foram recolhidas e analisadas por citometria de fluxo através da técnica de quantificação da fragmentação de DNA. Como pode ser observado na figura 14, tanto melatonina (figura 14A) quanto AFMK (figura 14B) inibiu a apoptose destas células de forma dose-dependente e a intensidade da inibição foi similar para ambos os compostos. Na concentração de 1 mM, melatonina e AFMK reduziram a apoptose destas células em aproximadamente 50 e 55%, respectivamente.

Figura 14. Efeito de melatonina (A) e AFMK (B) na apoptose de células DO11.10 induzida por anticorpos anti-CD3. As células foram incubadas com diferentes concentrações de melatonina e AFMK na presença ou não de 1 $\mu\text{g/mL}$ de anticorpos anti-CD3. Após 18 horas de cultura, as células foram recolhidas e a apoptose foi estimada pela análise de conteúdo de DNA através de citometria de fluxo (HFS). Estes dados representam a média das triplicadas realizadas para cada tratamento, com os respectivos desvios-padrão. (*equivale a $p \leq 0,01$).

A técnica de fragmentação de DNA empregada neste experimento, apesar de evidenciar as células em apoptose, não é capaz de diferenciar células viáveis de células necróticas, pois na grande maioria das vezes, as células necróticas não apresentam ativação das endonucleases, exibindo um perfil que coincide com as células viáveis nos histogramas gerados pela análise via citometria de fluxo. Portanto, estes resultados podem ser alternativamente explicados como um efeito necrótico da melatonina/AFMK. Se este fosse o caso, a redução na fragmentação do DNA por estes compostos seria decorrente de um efeito necrótico tão acelerado que não permitiria sequer a fragmentação do DNA. Para resolver esta questão e avaliar a necrose, foi utilizada a técnica de exclusão de iodeto de propídeo em solução isotônica. Neste ensaio, as células necróticas ou apoptóticas tardias são positivas para iodeto de propídeo. Em ambos os tratamentos e concentrações testadas houve uma redução nas células positivas para o iodeto de propídeo, demonstrando que o efeito observado foi uma inibição da AICD e, não um processo necrótico. (figuras 15 A e B).

Figura 15. Efeito de melatonina (A) e AFMK (B) na apoptose de células DO11.10 induzida por anticorpos anti-CD3. As células foram incubadas com diferentes concentrações de melatonina e AFMK na presença ou não de 1 µg/mL de anticorpos anti-CD3. Após 18 horas de cultura, as células foram recolhidas e tratadas com iodeto de propídeo em solução isotônica (PBS). A marcação por PI foi analisada por citometria de fluxo e foram consideradas necróticas as células positivas para o PI. Estes dados representam à média das triplicadas realizadas para cada tratamento, com os respectivos desvios-padrão. (*equivalente a $p \leq 0,01$).

Descartada a possibilidade de um efeito necrótico de melatonina e AFMK sobre as células DO11.10, os próximos experimentos foram realizados com a concentração de 1 mM para cada composto uma vez que nesta dose o efeito inibitório de melatonina e AFMK é bastante acentuado.

Além de melatonina e AFMK, avaliamos também se o AMK possui efeito similar na AICD. Do mesmo modo que na proliferação e produção de citocinas em PBMC, o AMK mostrou-se tão eficiente quanto melatonina ou AFMK na proteção das células DO11.10 contra apoptose induzida por anticorpos anti-CD3 (figura 16). Desta forma, pode-se supor que o AMK age através dos mesmos mecanismos de ação de melatonina e AFMK.

Figura 16. Efeito de melatonina, AFMK e AMK na apoptose de células DO11.10 induzida por anticorpos anti-CD3. As células foram incubadas com melatonina, AFMK ou AMK (1 mM) na presença ou não de 1 µg/mL de anticorpos anti-CD3. Após 18 horas de cultura, as células foram recolhidas e a apoptose foi estimada pela análise de conteúdo de DNA através de citometria de fluxo (HFS). Estes dados representam a média das triplicadas realizadas para cada tratamento, com os respectivos desvios-padrão. (*equivale a $p \leq 0,01$).

Assim sendo, os próximos experimentos foram realizados apenas com melatonina e AFMK devido à semelhança no perfil de resposta do AMK quando comparado aos outros dois compostos.

Tendo observado uma inibição da AICD exercida por melatonina e AFMK, passamos a investigar os mecanismos pelos quais estes compostos protegeram as células T DO11.10 da morte. Neste sentido, avaliamos se o efeito protetor de melatonina e AFMK na AICD estaria relacionado aos eventos bioquímicos iniciais, que se seguem após a ligação ao complexo TCR/CD3, nas células T. Para tanto, realizamos uma cinética de ativação das células DO11.10 com os anticorpos anti-CD3 e após 15, 30, 60, 120 e 240 minutos de ativação adicionamos 1mM de melatonina ao meio de cultura. Após 18 horas, todas células foram recolhidas e analisadas por citometria de fluxo através da técnica de quantificação da fragmentação de DNA. Como mostra a figura 17, melatonina foi capaz de proteger as células da apoptose mesmo quando adicionada até 120 minutos de ativação. No entanto, após 240 minutos a adição de melatonina não altera o fenômeno da AICD. Este resultado sugere que a ação da melatonina/AFMK, provavelmente, é no controle molecular da AICD que acontece nos eventos iniciais com a ativação de fatores de transcrição e expressão gênica.

Figura 17. Cinética do efeito protetor de melatonina contra a apoptose de células DO11.10 induzida por anticorpos anti-CD3. As células foram estimuladas ou não com 1ug/ml de anticorpos anti-CD3 e, após 15, 30, 60, 120 e 240 minutos de ativação foi adicionado 1 mM de melatonina ao meio de cultura. Após 18 horas de cultura, todas as células foram recolhidas e a apoptose foi estimada pela análise de conteúdo de DNA através de citometria de fluxo (HFS). Estes dados representam à média das triplicadas realizadas para cada tratamento, com os respectivos desvios-padrão. (*equivale a $p \leq 0,01$).

7.3.2 Efeito de melatonina e AFMK sobre a expressão de FAS, FASL e FLIP

Uma vez que a principal via de AICD nos hibridomas de linfócitos T é dependente da expressão de FasL (CD95L) e da interação desta molécula com receptor Fas (CD95) na superfície da célula [77], avaliamos o efeito de melatonina e do AFMK na expressão do RNA mensageiro de Fas e FasL em células DO11.10 ativadas com os anticorpos anti-CD3. A expressão do RNAm foi detectada pela reação de RT-PCR utilizando *primers* específicos para cada gene. Primeiramente, analisou-se o padrão de expressão de RNAm da molécula Fas. Como observado na figura 18, foi detectada uma expressão basal de Fas nas células DO11.10 não-estimuladas o que não foi alterado na presença de melatonina ou AFMK. Adicionalmente, verificou-se um aumento na expressão do RNAm de Fas após a ativação das células com os anticorpos anti-CD3, o que também não sofreu alterações significativas pela adição de melatonina ou AFMK.

Figura 18. Efeito de melatonina e AFMK na expressão gênica de Fas em células DO11.10 estimuladas (barras escuras) ou não com anticorpos anti-CD3 (barra claras). As células foram incubadas na presença de melatonina ou AFMK (1mM) por 2 horas e, em seguida o RNAm foi isolado, convertido para cDNA e amplificado utilizando *primers* específicos para o gene Fas. A amplificação do gene da actina foi utilizado como controle para padronizar a quantidade de RNAm das amostras, já que este gene não tem sua expressão alterada pelos estímulos utilizados neste trabalho. Após a amplificação, as amostras foram quantificadas por densitometria.

Com relação ao padrão de expressão do RNAm de FasL, esta molécula não foi detectada nas células não-estimuladas. Este fato já era esperado, pois se houvesse a expressão concomitante de Fas e FasL a célula entraria em apoptose. A ativação das células DO11.10 pelos anticorpos anti-CD3 induziu fortemente a expressão do FasL, o que se correlaciona com os altos índices de apoptose provocados pelo tratamento com anti-CD3 após um período de incubação de 18h (figura 19).

A adição tanto de melatonina como de AFMK bloqueou significativamente a expressão de FasL. Este resultado se correlaciona claramente com a atividade anti-apoptótica observada na presença de melatonina e AFMK.

Figura 19. Efeito de melatonina e AFMK na expressão gênica de FasL em células DO11.10 estimuladas (barras escuras) ou não com anticorpos anti-CD3 (barras claras). As células foram incubadas na presença de melatonina ou AFMK (1mM) por 2 horas e, em seguida o RNAm foi isolado, convertido para cDNA e amplificado utilizando *primers* específicos para o gene FasL. A amplificação do gene da actina (housekeeping gene) foi utilizado como controle para padronizar a quantidade de RNAm das amostras. Após a amplificação, as amostras foram quantificadas por densitometria.

No intuito de ampliar este estudo, decidimos avaliar também se melatonina ou AFMK aumentaria a expressão do RNAm da molécula FLIP. Esta proteína é considerada um inibidor da sinalização pró-apoptótica iniciada pelos receptores Fas (CD95) e uma diminuição dos níveis de FLIP torna os linfócitos mais sensíveis a AICD. Desta forma, investigamos se melatonina e AFMK, além de inibir FasL, aumentariam os níveis de FLIP.

Como observado na figura 20, não houve diferença significativa no padrão de expressão de FLIP, independente da presença de anti-CD3, melatonina ou AFMK.

Figura 20. Efeito de melatonina e AFMK na expressão gênica de FLIP em células DO11.10 estimuladas (barras escuras) ou não com anticorpos anti-CD3 (barras claras). As células foram incubadas na presença de melatonina ou AFMK (1mM) por 2 horas e, em seguida o RNAm foi isolado, convertido para cDNA e amplificado utilizando *primers* específicos para o gene FLIP. A amplificação do gene da actina foi utilizado como controle para padronizar a quantidade de RNAm das amostras. Após a amplificação, as amostras foram quantificadas por densitometria.

Estes resultados sugerem que o principal mecanismo efector de melatonina e AFMK na inibição da morte por AICD, neste modelo experimental, é através do bloqueio da expressão gênica da molécula FasL.

Ainda para avaliar a eficácia destes compostos na transcrição gênica do *fasl*, utilizamos o sistema de gene “repórter” para a enzima luciferase que é amplamente utilizado nos estudos de expressão gênica de mamíferos. Para este estudo, linfócitos T humanos Jurkat foram transfectados com o plasmídeo repórter de luciferase contendo o promotor do gene *fasl* acoplado ao gene de luciferase. Sendo assim, as células que forem induzidas a expressar FasL expressarão também o gene de luciferase. As células foram estimuladas com acetato de forbol miristato (PMA, 1µg/mL) e ionomicina (1µM) que são

sabidamente potentes estímulos para a expressão do FasL em linfócitos T Jurkat [119]. Assim sendo, o efeito da melatonina (1mM) foi avaliado neste ensaio. Após 18 horas de cultura, as células foram lisadas e o produto do gene "repórter" expresso, a enzima luciferase, foi quantificado por ensaio de luminescência. Os valores obtidos são diretamente proporcionais à habilidade das células Jurkat de promover a transcrição do gene *fasl*, sendo então possível quantificar indiretamente a ativação deste gene. As células não estimuladas produziram uma quantidade mínima de luciferase quando comparada às células ativadas com PMA/ionomicina (1µg/mL) e na presença de melatonina, a produção de luciferase pelos linfócitos T foi parcialmente inibida (figura 21).

Figura 21. Efeito de melatonina na produção da enzima luciferase utilizada como plasmídeo repórter. Células Jurkat foram estimuladas com PMA/ionomicina (1µg/mL) e incubadas na presença de melatonina (1mM). Após 18 horas, as células foram lisadas com tampão de lise e a leitura de luminescência realizada na presença de 50 µL de luciferina. A emissão de luz foi captada por um luminômetro e transformadas em unidades relativas de luz (URL).

Neste contexto, investigamos também se melatonina e AFMK inibem a expressão da proteína FasL na superfície das células DO11.10 através de imunofluorescência e análises de citometria de fluxo. Como mostra o histograma da figura 22, a estimulação das células com os anticorpos anti-CD3 induz um aumento significativo na expressão protéica do FasL que foi não observado nas células não-estimuladas (controle). Na

presença de melatonina ou AFMK, como esperado, a expressão protéica do FasL é significativamente reduzida.

Figura 22. Efeito de melatonina (verde) e AFMK (amarelo) na expressão de FasL na superfície das células DO11.10 na presença (vermelho) ou não (preto) de anticorpos anti-CD3. As células foram incubadas com melatonina ou AFMK (1mM) por 2 horas e, em seguida houve a marcação das células com anticorpos anti-FasL ligados ao fluorocromo ficoeritrina (PE). A intensidade de fluorescência foi analisada por citometria de fluxo.

O efeito inibitório destes compostos na proteína FasL corresponde, provavelmente, à inibição transcriptional do RNAm de FasL observada nos experimentos acima (figura 19).

7.3.3 Efeito de melatonina e AFMK na apoptose induzidas por anti-Fas

Baseados nos resultados anteriores, melatonina e AFMK suprimem a expressão de FasL e bloqueiam, portanto, a morte dos linfócitos T DO11.10 induzidas por anticorpos anti-CD3. Se esta hipótese for verdadeira, a ação da melatonina e do AFMK na AICD ocorre previamente à ativação do receptor Fas. Sendo assim, estes compostos não seriam capazes de impedir a morte causada pela estimulação direta dos receptores, seja por FasL solúvel, por anticorpos anti-Fas agonistas ou drogas agonistas deste receptor.

Para validar esta hipótese, analisamos o efeito de melatonina e AFMK na apoptose das células DO11.10 induzidas por anticorpos agonistas anti-Fas (Clone Jo2 -1 μ g/mL), uma vez que estes anticorpos agem posteriormente à indução de FasL. Como pode ser observado na figura 23, a estimulação com anticorpos anti-Fas induziu a morte das

células DO11.10 em aproximadamente 45% e nem melatonina nem AFMK foram capazes de inibir este processo.

Figura 23. Efeito de melatonina e AFMK na apoptose de células DO11.10 induzida por anticorpos agonistas anti-Fas (clone Jo2 - 1µg/mL). As células não-estimuladas correspondem ao controle e as células estimuladas foram incubadas na presença ou não de melatonina e/ou AFMK (1mM). Após 18 horas de cultura, as células foram recolhidas e a apoptose foi estimada pela análise de conteúdo de DNA através de citometria de fluxo (HFS). Estes dados representam a média das triplicadas realizadas para cada tratamento, com os respectivos desvios-padrão.

Estes dados corroboram com a hipótese de que o efeito de melatonina e AFMK na sinalização de morte é anterior ao estímulo do receptor Fas, já que a ativação direta deste receptor por anticorpos anti-Fas não foi bloqueada por melatonina ou AFMK. Portanto, neste modelo experimental o principal ponto de regulação na AICD é realmente a regulação da expressão gênica da molécula FasL.

Desta forma, o próximo passo foi investigar qual é o mecanismo de ação envolvido na inibição da expressão de FasL por melatonina e AFMK.

7.3.4 Efeito de melatonina e AFMK na AICD: ação antioxidante?

Alguns estudos relatam que a expressão de FasL induzida por ativação está associada, pelo menos parcialmente, com a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) [119-121]. Estes radicais livres, em pequenas quantidades, ativam importantes fatores de transcrição envolvidos na regulação transcricional da molécula FasL, tais como NF- κ B e AP-1. De uma forma geral, ROS induzem a produção de moléculas FasL e, conseqüentemente, a apoptose destas células. Estas evidências são baseadas, principalmente, no fato de que compostos antioxidantes são capazes de inibir a expressão de FasL suprimindo a ativação do NF- κ B [119].

Sabendo que melatonina e AFMK são potentes agentes antioxidantes e que a maioria dos efeitos biológicos descritos para estes compostos estão associados à capacidade dos mesmos de seqüestrar ROS [38], avaliamos se os mecanismos de ação de melatonina e AFMK na inibição da expressão de FasL estariam associados às suas propriedades antioxidantes. Inicialmente, comparamos o efeito de melatonina e AFMK na AICD com um conhecido agente antioxidante, o N-acetil-L-cisteína (NAC). Em comparação com melatonina e AFMK, NAC mimetizou o efeito protetor na apoptose das células DO11.10, e esta inibição foi dose-dependente (figura 24). Surpreendentemente, melatonina e AFMK mostraram-se mais potentes do que NAC na inibição da AICD. Na concentração de 1 mM, melatonina e AFMK inibiram aproximadamente 40% a apoptose enquanto a inibição por NAC na mesma concentração foi somente de 20% (figura 24).

Figura 24. Efeito de melatonina, AFMK e NAC na apoptose de células DO11.10 induzida por anticorpos anti-CD3. As células foram incubadas com melatonina e AFMK (1mM) e diferentes concentrações de NAC (0,4 - 10 mM) na presença ou não de 1µg/mL de anticorpos anti-CD3. Após 18 horas de cultura, as células foram recolhidas e a apoptose foi estimada pela análise de conteúdo de DNA através de citometria de fluxo (HFS). Estes dados representam a média das triplicadas realizadas para cada tratamento, com os respectivos desvios-padrão. (*equivale a $p \leq 0,01$).

Apesar destes experimentos não demonstrarem que melatonina e AFMK agem realmente por processos antioxidantes, a similaridade de efeitos com o NAC indicam que, pelo menos, existe a possibilidade de que estes compostos ajam de tal maneira.

Em seguida, para confirmar a nossa suspeita das atividades antioxidantes de melatonina e AFMK na AICD, investigamos os efeitos destes compostos na apoptose dos linfócitos T DO11.10 induzidas por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) já que este agente oxidante, além de ser um exemplo clássico de ROS, é um mediador de várias processos apoptóticos [122]. Neste experimento novamente incluímos o antioxidante NAC para fins de comparação (figura 25). Ao contrário do que imaginávamos, melatonina teve pouco efeito protetor na morte das células tratadas com H_2O_2 e o AFMK também não foi capaz de inibir a apoptose. No entanto, foi observado um efeito protetor de NAC nas concentrações utilizadas (1 - 10mM), sendo este efeito dose-dependente (figura 25).

Figura 25. Efeito de melatonina, AFMK e NAC na apoptose de células DO11.10 induzida por H₂O₂ anticorpos anti-CD3. As células foram incubadas com melatonina e AFMK (1mM) e diferentes concentrações de NAC (1, 2 e 10 mM) na presença ou não 0,5 mM de H₂O₂. Após 12 horas de cultura, as células foram recolhidas e a apoptose foi estimada pela análise de conteúdo de DNA através de citometria de fluxo (HFS). Estes dados representam a média das triplicadas realizadas para cada tratamento, com os respectivos desvios-padrão. (*equivale a $p \leq 0,01$).

Para aprofundar o entendimento da participação de ROS e das ações antioxidantes da melatonina e AFMK neste modelo experimental, examinamos a produção de ROS durante a ativação das células DO11.10 com os anticorpos anti-CD3. Para tanto, as células foram tratadas com diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH) ou dihidroetídeo (DHE), como descrito previamente [93]. Estes corantes somente fluorescem após serem oxidados por espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio. O aumento da fluorescência do DCFH indica a oxidação por peróxido de hidrogênio ou por outras espécies reativas, enquanto DHE é oxidado, seletivamente, pelo ânion superóxido. Como pode ser visualizado na figura 26, as células foram estimuladas com os anticorpos anti-CD3 e a cinética de produção de ROS foi acompanhada durante 1 hora por citometria de fluxo. Os histogramas da figura 26 mostram que não houve alteração da fluorescência nos tempos avaliados (15, 30 e 45 minutos) tanto para o DCFH (figura 26) quanto para o DHE (figura 27) indicando que não houve produção de ROS, pelo menos, até o período

avaliado. Como controle positivo da reação do DCFH utilizou-se o H_2O_2 que resultou no aumento significativo da intensidade de fluorescência.

Figura 26. Produção de espécies reativas de oxigênio pelas células DO11.10. As células foram estimuladas com anticorpos anti-CD3 imobilizados em placa por 15 a 45 minutos e, em seguida foram coradas com DCFH. Histogramas representativos do perfil de fluorescência para oxidação de DCFH nas células não estimuladas (controle) e estimuladas com anti-CD3. A fluorescência foi analisada por citometria de fluxo. Aos sessenta minutos, foi feito o controle positivo para a reação com H_2O_2 . Células não-estimuladas (preto), anti-CD3 (azul) e 0,5 mM H_2O_2 (vermelho).

Figura 27. Produção de espécies reativas de oxigênio pelas células DO11.10. As células foram estimuladas com anticorpos anti-CD3 imobilizados em placa por 15 a 60 minutos e, em seguida foram coradas com DHE. Histogramas representativos do perfil de fluorescência para oxidação de DHE nas células não estimuladas (controle) e estimuladas com anti-CD3. A fluorescência foi analisada por citometria de fluxo.

Para validação dos resultados obtidos acima, analisamos também a produção de ROS por quimioluminescência e amplificada por luminol (oxidado por peróxido de hidrogênio ou por outras espécies reativas) e lucigenina (oxidada, seletivamente, pelo ânion superóxido). Neste ensaio, da mesma forma que na técnica utilizada anteriormente, não houve qualquer produção de ROS (dados não mostrados).

7.3.5 Efeito de melatonina e AFMK na ativação do fator NF- κ B

Até o presente momento, as evidências de que as células DO11.10 não produzem espécies reativas de oxigênio enfraquecem a possibilidade da via de indução de FasL, neste modelo experimental, ser mediada pela ativação do NF- κ B. Entretanto, este dado não exclui um possível efeito inibitório de melatonina e/ou AFMK na ativação do NF- κ B uma vez que outros estímulos são capazes de ativar este fator de transcrição, independente do status redox celular [123]. Além disto, o NF- κ B é descrito como um dos principais reguladores da expressão gênica de FasL em outros modelos experimentais de AICD [120]. Sendo assim, investigamos se melatonina seria capaz de inibir diretamente esta ativação na tentativa de justificar o bloqueio na expressão de FasL. Para avaliar a ativação do NF- κ B, as células DO11.10 foram estimuladas com anticorpos anti-CD3 e tratadas com melatonina por duas horas, os extratos nucleares foram preparados e analisados por ensaio de retardo da mobilidade eletroforética (EMSA). Como observado na figura 28, foi possível notar a formação de dois complexos DNA/proteína nos extratos nucleares das células DO11.10 em todas as condições experimentais testadas: um complexo de lenta migração (primeiro) e outro de rápida migração (segundo). Apesar de não realizado o ensaio de SuperShift, que revela a identidade da proteína com o uso de anticorpos específicos, o segundo complexo formado corresponde, provavelmente, ao homodímero p50-p50 [124]. Acredita-se que este complexo seja expresso de forma constitutiva em linhagens linfocitárias e demais células [125]. Com relação ao primeiro complexo visualizado, provavelmente, corresponde ao heterodímero p65-p50 [126]. Ao contrário do complexo p50-p50, este complexo é transcrito após estimulação e está fortemente associado à indução de FasL [127,128].

Interessantemente, melatonina não foi capaz de inibir a atividade do NF- κ B, ou seja, a translocação do heterodímero p65-p50 para o núcleo independentemente das células estarem estimuladas ou não com os anticorpos anti-CD3. Os mesmos resultados foram obtidos para o composto AFMK (dados não-mostrados). Vale ressaltar que nestas condições experimentais, melatonina e AFMK bloqueiam a expressão de FasL e a morte dos linfócitos T DO11.10. Portanto, mesmo com o NF- κ B ativo e presente no núcleo a expressão do FasL não ocorre na presença de melatonina ou AFMK.

Figura 28 Efeito de melatonina na ativação do fator de transcrição NF- κ B. As células DO11.10 foram estimuladas com anticorpos anti-CD3 e, concomitantemente, tratadas com melatonina (1mM). Após duas horas, os extratos nucleares foram preparado das células não-estimuladas (1); não-estimuladas com melatonina (2); sonda livre, ou seja, sem amostra (S); estimuladas por anti-CD3 (4) e estimuladas e tratadas com melatonina (5). Em seguida, os extratos foram analisados por ensaio de retardo da mobilidade eletroforética utilizando um oligonucleotídeo de dupla-fita com região consenso para NF- κ B marcados com o radioativo fósforo-32. As flechas com inscrições p65-p50 apontam para a banda que provavelmente contém o homodímero p50-p50 do NF- κ B. O mesmo ocorre para a flecha p65-p50 que indica o heterodímero p65-p50.

Nestas circunstâncias, podemos imaginar que outros fatores de transcrição devem ser responsáveis pela modulação da expressão de FasL nas células DO11.10, tais como: c-Jun, NFAT, AP-1 e c-Myc [129].

7.3.6 Efeito de melatonina e AFMK na ativação do fator de transcrição NFAT

Como mencionado anteriormente, outros fatores de transcrição participam da regulação da expressão de FasL e da indução da apoptose de linfócitos T. Dentre estes fatores de transcrição, o Fator Nuclear de Células T ativadas (NFAT) é um dos principais reguladores da expressão gênica nas células T ativadas. A importância do NFAT como uma proteína reguladora da transcrição do FasL é ilustrada pelos efeitos dos inibidores do NFAT como por exemplo, Ciclosporina A (CsA) na proteção da AICD [130]. Ciclosporina A inibe a enzima fosfatase responsável pela desfosforilação do NFAT, calcineurina, prevenindo a formação do NFAT ativo e, conseqüentemente, a translocação nuclear e a atividade deste fator de transcrição na expressão do FasL [131]. Vale ressaltar que calcineurina é ativada quando o cálcio intracelular se liga à proteína ligadora de cálcio, calmodulina. A ativação desta via ocorre quando há o aumento de cálcio intracelular que acompanha normalmente a ativação dos linfócitos, principalmente quando há a estimulação do complexo TCR/CD3. Desta forma, o complexo cálcio-calmodulina regula a atividade da enzima calcineurina e torna-se um ponto importante de controle na ativação do fator de transcrição NFAT [132].

Interessantemente, alguns trabalhos demonstram que melatonina atua como um antagonista fisiológico da calmodulina em certos tipos celulares [133-135]. Na verdade, melatonina possui sítios de alta afinidade para esta proteína e a interação entre elas promove alterações conformacionais na calmodulina que a impede de ligar-se a outras proteínas, entre elas a calcineurina [136]. Tais evidências nos direcionaram a pesquisar se melatonina e ou AFMK impedem a expressão do FasL através do bloqueio da via de sinalização do fator de transcrição NFAT.

O primeiro ensaio para testar esta hipótese teve como objetivo confirmar a participação efetiva do NFAT na AICD das células DO11.10, já que existem diferenças na participação dos fatores de transcrição entre os diversos tipos e linhagens celulares. Para tanto, utilizamos a CsA como um inibidor específico de calcineurina e da atividade do

NFAT (figura 29). Conforme esperávamos, a ciclosporina A foi capaz de bloquear totalmente a morte das células T DO11.10 induzida por anti-CD3 (figura 29).

Figura 29 Efeito de Ciclosporina A (CsA) na apoptose de células DO11.10 induzida por anticorpos anti-CD3. As células foram pré-incubadas com CsA (0,1;1 e 10 μM) por 30 minutos e, em seguida estimuladas ou não com 1 μg/mL de anticorpos anti-CD3. Após 18 horas de cultura, as células foram recolhidas e a apoptose foi estimada pela análise de conteúdo de DNA através de citometria de fluxo (HFS). Estes dados representam a média das triplicadas realizadas para cada tratamento, com os respectivos desvios-padrão. (*equivale a $p \leq 0,01$).

Baseando-se nos resultados obtidos com ciclosporina A, o próximo passo desta investigação foi analisar profundamente os efeitos de melatonina e AFMK na via de ativação do NFAT. Com este intuito, avaliamos a expressão da proteína NFAT nas formas ativa (desfosforiladas) e inativa (fosforiladas) nos extratos celulares antes e após estimulação por anticorpos anti-CD3 e/ou tratamento com melatonina ou AFMK por meio de análises de western blot. Inicialmente, realizamos uma cinética (15, 30, 60, 120 e 240 minutos) de ativação do NFAT nas células DO11.10 estimuladas com 1 μg/mL de anticorpos anti-CD3 (dados não-mostrados). Assim, avaliamos o melhor tempo de incubação para ser utilizado nos ensaios subseqüentes. A partir de 15 minutos de ativação com os anticorpos anti-CD3 as células DO11.10 passam a expressar as formas ativadas das proteínas do NFAT.

Em seguida, passamos aos ensaios da ativação do NFAT nas células DO11.10 tratadas com melatonina ou AFMK (figura 30). Nos extratos das células não-estimuladas houve o predomínio da forma fosforilada do NFAT que correspondem a forma inativa. A ativação das células DO11.10 pelos anticorpos anti-CD3 induziu a desfosforilação das proteínas que pode ser visualizado pela expressão da forma ativa (desfosforilada). No entanto, na presença de concentrações crescentes de melatonina e AFMK o perfil das proteínas modificou-se e prevaleceram novamente as formas inativas (fosforiladas). Na concentração de 0,25mM, melatonina e AFMK inibem parcialmente a desfosforilação do NFAT e a partir da dose de 1 mM estes compostos bloqueiam à ativação deste fator de transcrição, o que foi comprovado pela ausência das proteínas na forma fosforilada (ativa).

Figura 30. Efeito de melatonina e AFMK na ativação do fator de transcrição NFAT. As células foram incubadas com melatonina e AFMK em diferentes concentrações (0,25, 1 e 4 mM) e estimuladas com 1 μ g/mL de anticorpos anti-CD3. Após 1 hora, os extratos celulares foram preparados e analisados por western blot utilizando anticorpos primários anti-NFAT₁ para as proteínas nas formas fosforiladas (acima) ou não fosforiladas (abaixo).

Este resultado se correlacionou claramente com os níveis apoptóticos dos tratamentos correspondentes (figura 14) e sugere a possibilidade de que a atividade anti-apoptótica de melatonina e AFMK está centrada no bloqueio da via de sinalização do NFAT. Este bloqueio justificaria, então, a inibição da expressão do FasL por melatonina e AFMK e, conseqüentemente a proteção das células DO11.10 contra a AICD.

7.4 Discussão

Apesar do crescente número de estudos sobre a ação biológica da melatonina no sistema imune, ainda não se tem informações diretas que evidenciem a influência da melatonina na apoptose dos linfócitos T. Isto torna-se particularmente relevante no contexto da morte celular induzida por ativação (AICD) uma vez que: (i) os linfócitos T ativados são capazes de sintetizar e utilizar melatonina e (ii) no final de uma resposta imune, a AICD é o mecanismo fisiológico de morte que acomete os linfócitos T ativados e, portanto, essencial para a manutenção da homeostase do sistema imune [35,78].

Neste trabalho, investigamos o efeito de melatonina e, ainda, dos seus produtos de oxidação AFMK e AMK na AICD e os possíveis mecanismos de ação. Para tanto, utilizamos como modelo experimental de AICD o de hibridoma de linfócitos T DO11.10. Estas células são derivadas de linfócitos T CD4⁺ extraídos de camundongos Balb/c TgN (DO11.10)10Loh fundidos com células BW5147 TCR $\beta^{-/-}$ [137]. É conhecido que a ativação *in vitro* das células DO11.10, através da estimulação do complexo TCR/CD3 pelos anticorpos anti-CD3, inicia uma seqüência de sinais bioquímicos que resultam na ativação transcricional de genes específicos, dentre eles o FasL [126]. A ligação do FasL ao seu receptor de morte Fas induz a ativação de uma cascata de proteases, predominantemente as caspases 8 e 10, que culmina na ativação de outras caspases e endonucleases promovendo a fragmentação de DNA e morte destas células por apoptose [86].

De acordo com os dados obtidos na análise do conteúdo de DNA genômico por citometria de fluxo, tanto melatonina quanto AFMK inibiram a fragmentação do DNA das células DO11.10, o que caracteriza uma atividade anti-apoptótica destes compostos durante a indução da morte pelos anticorpos anti-CD3 (figura 14). Estes resultados se confirmaram após o uso da técnica de exclusão de iodeto de propídeo uma vez que eliminou a possibilidade dos efeitos de melatonina e AFMK serem citotóxicos nas concentrações avaliadas (0,125 - 1 mM) (figura 15). De fato, melatonina e AFMK mostraram-se potentes inibidores da apoptose protegendo, assim, as células DO11.10 da AICD. Este efeito protetor de melatonina e AFMK na AICD não se restringiu somente as células T DO11.10 tendo em vista que melatonina e AFMK também foram capazes de inibir a AICD do hibridoma murino de células T BY155.6 (dados não-mostrados). Esta informação sugere que a capacidade citoprotetora de melatonina e AFMK na AICD não é

específica de uma única linhagem celular e, conseqüentemente excluí a possibilidade de ser uma característica intrínseca do hibridoma de células DO11.10. Deste modo, existe a possibilidade destes compostos modularem também a apoptose de linfócitos T humanos.

O mesmo efeito protetor de melatonina na AICD das células DO11.10 estendeu-se também para o seu segundo produto de oxidação da via das quinureninas, o AMK (figura 16). Este resultado já era esperado tendo em vista que a maioria das ações biológicas do AFMK e AMK, até então estudadas, foram semelhantes aos efeitos descritos para melatonina [138]. No entanto, alguns trabalhos sugerem que a potência do AFMK e AMK é superior a da melatonina, como por exemplo, a capacidade antioxidante [139]. Estudos prévios do nosso grupo também demonstram que AFMK e AMK são mais potentes do que melatonina na inibição da síntese das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-8 por neutrófilos [66]. Adicionalmente, nesta tese mostramos que o AFMK é mais eficiente na redução dos índices de linfoproliferação e na produção da citocina IFN- γ por PBMC ativados quando comparado com melatonina. Como o composto AMK é de difícil obtenção e seu resultado foi semelhante aos obtidos com os outros dois compostos (figura 16), fez-se a opção de se continuar os estudos de AICD somente com a melatonina e o AFMK.

A concentração de escolha de melatonina/AFMK para os experimentos subseqüentes foi a de 1mM, por apresentar a máxima porcentagem de proteção ($\geq 50\%$) na AICD. À primeira vista, a dose utilizada parece bastante alta se comparada aos níveis séricos de melatonina (10 - 200pg/mL) resultante da produção da glândula pineal [30]. Porém, duas observações são importantes. A primeira é que a síntese de melatonina também ocorre em outras células e tecidos, incluindo retina [140], células da medula óssea [32], plaquetas [141], trato gastrointestinal [142] e nos próprios linfócitos humanos [35]. Ademais, melatonina é uma molécula bastante lipofílica, conseqüentemente de fácil acesso a alguns fluídos corporais, outras células e compartimentos celulares. Desta forma, supõe-se que a concentração de melatonina em um microambiente específico pode atingir valores muito mais elevados que os circulantes [143]. Outro ponto importante é que vários estudos descrevem a administração exógena de altas doses de melatonina em pacientes com doenças neurodegenerativas, insônia, câncer e dano oxidativo [144-147]. Todas estas evidências suportam, portanto, a idéia de que doses farmacológicas de melatonina (μ M e mM) utilizadas em ensaios *in vitro* podem ser proporcionais as concentrações “reais” de melatonina *in vivo*.

Reiter e Tan levantaram esta questão sobre o qual poderia ser considerada a concentração fisiológica de melatonina nos organismos [148]. Os autores argumentam que a concentração tecidual de melatonina não depende exclusivamente da concentração plasmática. As concentrações de melatonina nas células e nos fluídos corporais, tais como bile e líquido, [149] estão levemente acima ou muito acima (de cinco a mil vezes, em ordem de grandeza) daquela observada normalmente na circulação. Assim sendo, é possível que a concentração final de melatonina tenha a contribuição de outras fontes como, por exemplo, da síntese local originada pelas células. Nestas condições, altas concentrações de melatonina/AFMK podem ser importantes para a correta ação destes compostos sobre as outras células presentes no microambiente, especialmente as células do sistema imune e em condições inflamatórias. Desta maneira, o conceito da concentração fisiológica de melatonina vem sendo repensado e definido em termos de compartimentos celulares, pois as concentrações de melatonina diferem nos diferentes fluídos corpóreos, em diferentes células e organelas celulares. Por fim, além da definição clássica de hormônio produzido pela glândula pineal, atualmente melatonina tem sido identificada com uma molécula (composto) com diversas ações fisiológicas, sinalizando não somente o ritmo circadiano, mas também promovendo várias atividades imunomodulatórias e de citoproteção [150].

O próximo passo deste estudo foi investigar os mecanismos pelos quais estes compostos evitam a morte de células DO11.10 induzidas por ativação com os anti-CD3. Inicialmente, realizamos uma cinética de ativação das células DO11.10 com os anticorpos anti-CD3 e adicionamos melatonina e AFMK no meio de cultura após determinados períodos de ativação. Este ensaio teve o objetivo de avaliar se o efeito protetor de melatonina e AFMK na AICD estaria associado aos eventos iniciais de sinalização ou aos eventos mais tardios. Verificamos que melatonina foi eficaz no bloqueio da apoptose mesmo quando adicionada na cultura até duas horas depois da ativação (figura 17). No entanto, se adicionada após este período não foi capaz de evitar a AICD. Este resultado trouxe informações sobre o efeito temporal de melatonina na AICD e nos direcionou a investigar quais seriam os controles moleculares da AICD que poderiam estar comprometidos na presença destes compostos durante as primeiras duas horas de ativação pelos anticorpos anti-CD3.

A morte dos linfócitos T por AICD pode ser controlada em dois pontos principais. O primeiro deles é a via de sinalização iniciada pelo complexo TCR/CD3, que leva à ativação de fatores de transcrição envolvidos na modulação da expressão de Fas, FasL e do FLIP (fase de ativação da AICD). O segundo é a via de sinalização iniciada pela ligação Fas/FasL, cujo principal controle é sobre a ativação das caspases desencadeando a apoptose da célula (fase de execução da AICD) [151]. Sabendo que a interação dos anticorpos anti-CD3 com o complexo TCR/CD3 na superfície dos linfócitos T DO11.10 promove um aumento da expressão da molécula FasL e diminuição da expressão de FLIP foi investigado a possibilidade de melatonina e AFMK agir alterando a expressão gênica/protéica de alguma destas moléculas. Como a expressão tanto das moléculas FasL e Fas, assim como a de FLIP é regulada principalmente a nível transcricional [151], avaliou-se primeiramente o efeito de melatonina e AFMK na expressão do RNA mensageiro através da técnica de RT-PCR.

Os nossos resultados mostram claramente que nem Fas nem tampouco a molécula FLIP sofreram alterações significativas na sua expressão na presença de melatonina ou AFMK, independentemente das células estarem estimuladas ou não (figuras 18 e 20). Desta forma, a regulação da expressão das moléculas Fas e FLIP, pelo menos a nível transcricional, não foi capaz de explicar a inibição da morte por melatonina e AFMK nas células DO11.10. Por outro lado, o padrão de expressão gênica encontrado para a molécula FasL se correlaciona com os resultados de taxa de morte deste hibridoma (figura 19). Esta molécula, pouco expressa na condição controle, foi fortemente induzida por anticorpos anti-CD3. Porém, na presença de melatonina ou AFMK a expressão de FasL foi reduzida de forma diretamente proporcional à taxa de morte encontrada no tratamento correspondente (figura 14). Diante deste dado, supõe-se que o efeito modulador de melatonina e AFMK na regulação transcricional da molécula FasL foi fundamental na proteção destes compostos contra a AICD.

Verificamos, ainda, o efeito de melatonina na expressão de FasL através dos ensaios de gene repórter. Neste ensaio, utilizamos o plasmídeo repórter de luciferase contendo o promotor do gene *fasl* acoplado ao gene da luciferase. De acordo com os princípios da técnica, a quantidade da enzima luciferase sintetizada sob várias condições ou tratamentos a que as células foram submetidas correlaciona-se de forma diretamente proporcional à transcrição gênica do *fasl*. Os resultados obtidos neste estudo mostraram

que os linfócitos T humanos Jurkat transfectados com este plasmídeo repórter e ativados com PMA/ionomicina foram capazes de sintetizar a enzima luciferase e, conseqüentemente de transcrever o *fasl*. Por outro lado, houve uma diminuição da produção de luciferase quando estas células foram tratadas com melatonina (figura 21). O efeito inibitório deste composto na síntese de luciferase refletiu, portanto, a capacidade de melatonina reduzir parcialmente a transcrição do gene *fasl* nas células T Jurkat. Vale salientar que os linfócitos T humanos Jurkat, na ocasião deste experimento, mostraram-se o tipo celular mais apropriado para os ensaios de gene repórter quando comparado as células T DO11.10 em termos de eficiência de transfecção. Ainda é importante lembrar que os linfócitos Jurkat também expressam eficientemente o FasL após estimulação com PMA/ionomicina e promovem a AICD mediada pelo sistema Fas/FasL mimetizando, assim, o modelo experimental de AICD de células T DO11.10 com anticorpos anti-CD3 (dados não-mostrados). Deste modo, torna-se possível avaliar e comparar o potencial de inibição de melatonina na expressão de FasL e na AICD de linfócitos T Jurkat e DO11.10. Este resultado amplia o espectro do estudo do efeito de melatonina na expressão do FasL para células humanas, mostrando assim que o efeito inibitório de melatonina sobre a indução de FasL não se restringe apenas as células de camundongo.

Adicionalmente a este resultado e à busca da confirmação da ação de melatonina/AFMK na expressão gênica do FasL em células DO11.10, foi investigada também a expressão da proteína FasL na superfície destas células quando tratadas com melatonina e AFMK. A proteína FasL é uma proteína de membrana de 40KDa que se localiza na membrana celular. A expressão desta proteína é indutível e pode ocorrer não somente em células imunes, mas também em tecidos não-linfóides [86]. Semelhantemente ao resultado do RNAm (figura 20) houve uma diminuição significativa da síntese protéica de FasL nas células DO11.10 estimuladas com anticorpos anti-CD3 e cultivadas na presença de melatonina e AFMK (figura 22). Como já era esperado, as quantidades de proteína foram proporcionais as quantidades de RNAm, o que sugeriu mais uma vez uma regulação transcricional da expressão do FasL por melatonina e AFMK. Em conjunto, os resultados por três técnicas distintas e em tipos celulares diferentes demonstraram o potencial de melatonina na inibição da expressão de FasL e reforçam que, provavelmente, o ponto de modulação da AICD pela melatonina/AFMK foi o bloqueio da expressão gênica da molécula FasL.

Em concordância com estes resultados, está o fato de que melatonina e AFMK não protegem as células DO11.10 contra a apoptose induzida pelos anticorpos anti-Fas (figura 23). Neste processo de morte, não há a necessidade da indução e ativação do FasL para que as células entrem em apoptose. A interação dos anticorpos anti-Fas aos receptores Fas ativam diretamente a fase executora da AICD, ou seja, posteriormente a expressão e indução do FasL. Se nestas condições estes compostos não conseguiram impedir a fase de execução da apoptose, que consiste principalmente na ativação das caspases, podemos afirmar que a ação da melatonina e do AFMK na AICD das células DO11.10 foi num ponto anterior à estimulação do receptor Fas, portanto, muito provavelmente na expressão do FasL.

Por ser um evento central na regulação de vida e morte de diversos tipos celulares, inclusive linfócitos T maduros, a modulação da expressão do FasL foi extensamente estudada. Com o seqüenciamento da região 5' do gene do FasL e seu promotor, vários sítios de ligação consenso para diferentes fatores de transcrição foram descritos e posteriormente validados. Entre eles, vale destacar a presença de três dois domínios de interação com o NF- κ B. Este fator de transcrição parece mediar diversas estímulos apoptóticos que utilizam a via do Fas/FasL, como o etoposídeo [152], a deprivação de timina [153], além da própria AICD [154].

Outro fator de transcrição bastante descrito na indução de FasL é o NFAT que é ativado pela estimulação do complexo TCR/CD3. Experimentos com plasmídeos repórteres mostraram que o NFAT quando se liga ao sítio de ligação consenso do promotor de FasL é capaz de induzir a transcrição gênica [155]. Em 1998, foi descrito um domínio no promotor de FasL necessário, em conjunto com o sítio de ligação com o NFAT, para a correta expressão de FasL em células T ativadas [156]. O fator de transcrição que se liga nesta região é o Egr, sendo que tanto Egr2 (expresso em timócitos) como o Egr3 (expresso em linfócitos T ativados) tem capacidade de interagir com esta sequência [157].

No promotor do FasL ainda existem sítios de ligação consenso para AP-1 (dois), c-myc e FKHRL1. A expressão ectópica do dominante-negativo de AP1 diminui drasticamente a expressão de FasL durante o estímulo de AICD [158]. Seqüências anti-senso para o gene do c-myc abolem a expressão deste fator de transcrição, bloqueando a AICD em diversos hibridomas de linfócitos T [159]. FKHRL1 é mantido inativo pela ação

da quinase AKT, sendo que quando há a ausência de fosforilação, o FKHRL1 se ativa contribuindo para o aumento da transcrição do FasL [160].

Portanto, a expressão do FasL é um mecanismo extremamente regulado e complexo, onde diversos fatores de transcrição agem de forma aditiva, antagônica e/ou sinérgica, fazendo com que a somatória de todas estas influências seja realmente importante para o resultado final.

Apesar de diversos inibidores desta expressão de FasL terem sido descritos, como agentes antioxidantes, hormônios glicocorticóides [161,162] e prostaglandinas (Weinlich R. comunicação oral), isto não diminui o interesse de se conhecer mais detalhadamente os mecanismos pelos quais a melatonina e AFMK inibiram a expressão de FasL e, conseqüentemente a AICD. Este assunto é especialmente interessante se considerarmos a multiplicidade de fatores de transcrição envolvidos na indução da expressão gênica de FasL e a possibilidade de que diferentes compostos atuem em vias distintas.

Como mencionado anteriormente, existem diversas vias de indução de FasL, entre elas, a ativação do fator de transcrição NF- κ B em resposta a um aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) após sinalização via TCR/CD3 [119]. Dentre os diversos mecanismos de ação de melatonina, está a capacidade de neutralizar diretamente espécies reativas de oxigênio, incluindo peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e oxigênio singlet [163]. Assim sendo, por ser um potente antioxidante e também por já haver relatos do seu efeito protetor contra a apoptose induzida pelo stress oxidativo [164,165], a melatonina possivelmente poderia agir modulando a AICD, impedindo a transcrição do FasL através do bloqueio da geração de ROS e, conseqüentemente à ativação do NF- κ B.

Para investigar a propriedade antioxidante de melatonina/AFMK na AICD das células DO11.10, uma série de experimentos foram realizados. Primeiramente, comparamos o efeito de melatonina e AFMK na AICD com outro agente antioxidante que foi o *N*-acetil-cisteína. O intuito da utilização especificamente de NAC se baseou no fato de que o potencial antioxidante deste composto foi testado anteriormente em outros modelos de apoptose induzida por stress-oxidativo [166] e na AICD de hibridomas de linfócitos T [167]. Os resultados da análise comparativa de melatonina/AFMK com o NAC mostraram que todos os compostos avaliados inibiram a AICD. No entanto, melatonina e AFMK foram bem mais eficientes do que NAC nesta inibição. Apesar deste experimento

de comparação não demonstrar que melatonina e AFMK agiram realmente por processos antioxidantes, a similaridade dos efeitos com o NAC indicaram que, pelo menos, existe a possibilidade de que estes compostos ajam de forma similar.

Para demonstrar que a melatonina e o AFMK agem através deste mecanismo, era necessário provar que estes compostos eram capazes de bloquear um estímulo apoptótico mediado intrinsecamente por ROS. Para testar esta hipótese, foi utilizado como estímulo o H_2O_2 em substituição aos anticorpos anti-CD3, já que este agente oxidante é amplamente utilizado nos ensaios de apoptose [168]. A dose ideal (0,5 mM) para indução de apoptose em células DO11.10 foi encontrada através de uma curva dose-resposta (dados não mostrados). Diferentemente do que era esperado, nem melatonina nem AFMK protegeram da morte por H_2O_2 , resultado distinto do encontrado para o NAC, que apresentou um efeito dose-dependente (figura 25).

Ainda a fim de testar a hipótese de que ROS seriam os intermediários na expressão de FasL e na AICD neste modelo experimental, avaliou-se também a capacidade dos linfócitos T DO11.10 efetivamente produzirem ROS após a estimulação por anticorpos anti-CD3. De acordo com as duas metodologias usadas, não houve a geração de ânion superóxido nem de H_2O_2 por estas células no período de 15 até 60 minutos (figuras 26 e 27). Não foram utilizados tempos maiores na avaliação da produção de ROS já que a indução da expressão de FasL está fortemente aumentada em duas horas de estímulo.

Apesar dos ensaios de comparação com o NAC sugerir uma ação antioxidante da melatonina/AFMK na inibição da morte por anticorpos anti-CD3, este último conjunto de dados apontou na direção oposta, ou seja, que nem melatonina nem AFMK são capazes de seqüestrar H_2O_2 e exercer uma ação antioxidante relevante nestas condições do ensaio. Além disto, as células DO11.10 não foram capazes de produzir ROS para a ativação do NF- κ B e, conseqüentemente para a expressão de FasL.

De fato, vários trabalhos têm documentado que a AICD é bloqueada por agentes antioxidantes [169-171]. O efeito inibitório destes compostos na apoptose de linfócitos T suportaria a idéia de que ROS são os mediadores da indução de FasL, após a estimulação do complexo TCR/CD3. Por exemplo, Schulze-Osthoff e colaboradores mostraram que os antioxidantes ditioneitol (DTT) e ditiocarbamato pirrolidino (PDTC) bloqueiam potencialmente a indução do RNAm de FasL em células T Jurkat estimuladas

tanto com anticorpos anti-CD3 quanto por PMA/ionomicina e que esta inibição estaria associada a uma diminuição da atividade do fator de transcrição NF- κ B [119]. Os mesmos autores também mostraram que, na ausência da estimulação do complexo TCR/CD3, a adição exógena de H₂O₂ poderia induzir o RNAm de FasL e que foi modestamente reduzido por inibidores do NF- κ B. Desta forma, estes resultados sugerem que, pelo menos para os linfócitos T humano Jurkat, a ativação do NF- κ B por ROS pode ser um dos responsáveis pela indução do RNAm de FasL e, conseqüentemente da AICD.

Similarmente, Williams e colaboradores reforçam a participação de ROS na apoptose mediada por Fas/FasL de linfócitos T maduros e de hibridomas murino de células T. Este grupo mostrou a produção do ânion superóxido e do H₂O₂ pelas células T 9C127 após a estimulação do complexo TCR-CD3 pelos anticorpos anti-CD3 e a inibição desta síntese por meio da superexpressão nestas células das principais enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase e catalase, respectivamente. Neste mesmo trabalho os autores discutem também o envolvimento específico do ânion superóxido na expressão do FasL na indução da morte celular. Outros estudos também sugerem a possibilidade de que a expressão e indução de FasL seja controlada por ROS e, deste modo, inibida por agentes antioxidantes [170].

Apesar das evidências favoráveis da participação de ROS como um mediador da apoptose, alguns estudos têm questionado esta hipótese: (i) porque vários agentes como dexametasona, anti-Fas e estaurosporina induzem a apoptose mesmo em condições anaeróbicas, ou seja onde não há a geração de ROS [171,172] e (ii) porque o tratamento de algumas células com antioxidantes não inibem ou muito fracamente reduzem a apoptose induzida pela via de sinalização do Fas [173]. Estes estudos indicam que ROS pode ser importante, mas não é um mediador comum e obrigatório de todas as formas de apoptose. Além disto, levanta a questão que ROS pode exercer um papel específico em determinadas linhagens celulares.

Diante destes fatos, tentamos compreender o efeito de NAC na AICD no nosso modelo experimental já que não houve a produção de ROS pela células DO11.10. Para tanto, avaliamos a ação deste composto sobre a indução da expressão gênica de FasL. Diferentemente dos resultados obtidos com melatonina e AFMK, que suprimiram a expressão de FasL (figura 21), NAC não foi capaz de impedir a expressão desta molécula, pelo menos a nível transcricional (dados não mostrados). Este dado sublinha novamente

que os mecanismos de proteção de melatonina/AFMK na AICD de células DO11.10 são distintos dos de NAC.

É descrito na literatura que a atividade antioxidante de NAC na apoptose, além de neutralizar diretamente radicais livres, está associada a sua habilidade de aumentar os níveis intracelulares de glutathione peroxidase, que é um sistema antioxidante intracelular responsável pela remoção de H_2O_2 [175]. No entanto, este mecanismo de ação de NAC ainda não explicaria o efeito deste composto na apoptose de células DO11.10, já que independente da presença de ROS. Alternativamente, Henkart e colaboradores sugerem que o efeito de NAC na morte celular induzida por ativação é independente das suas propriedades antioxidantes [171]. Neste estudo foi demonstrado que NAC impede a AICD do hibridoma murino de células T 2b4, porém não inibe a expressão e a atividade funcional do FasL. Além disto, este trabalho descreve que o efeito de NAC nas células T 2b4 foi posterior à estimulação dos receptores Fas uma vez que este composto foi capaz de inibir a apoptose induzida por anticorpos anti-Fas, num ponto independente de ROS. No entanto, como NAC atuaria na fase de execução, seja na inibição de caspases ou no aumento da expressão de moléculas anti-apoptóticas, ainda não está bem esclarecido. Assim sendo, é provável que a atividade anti-apoptótica de NAC no hibridoma de células T DO11.10 seja a mesma descrita para as células T 2b4.

Por fim, Philippa Marrack e colaboradores observaram que antioxidantes não previnem a morte das células DO11.10 induzidas pelos anticorpos anti-CD3 [176]. Porém, não descrevem quais seriam os possíveis mecanismos moleculares pelos quais a AICD seria controlada nas células DO11.10, deixando esta questão em aberto.

Apesar do nosso modelo experimental não produzir ROS, verificamos se outros estímulos poderiam promover a ativação do NF- κ B, como por exemplo, citocinas pró-inflamatórias [123] e se melatonina e AFMK poderiam inibir esta possível ativação. Interessantemente, nem melatonina nem AFMK foi capaz de bloquear a translocação do NF- κ B para o núcleo, ou seja, não suprimiram a ativação deste fator de transcrição (figura 28). Vale ressaltar que nestas condições experimentais, melatonina e AFMK bloqueiam a expressão de FasL e a morte dos linfócitos T DO11.10 (figura 14). Portanto, mesmo com o NF- κ B ativo e presente no núcleo a expressão do FasL não ocorre na presença de melatonina ou AFMK.

Há duas possíveis explicações para este fenômeno. A primeira é que apesar da translocação não ser inibida por melatonina, a interação deste fator de transcrição com os respectivos sítios de interação no DNA esteja prejudicada. Este tipo de bloqueio da interação entre o NF- κ B e os elementos responsáveis a NF- κ B no DNA já foi descrito em outros modelos [177]. A segunda é que a participação do NF- κ B na expressão do FasL, em determinados tipo celulares, não seja fundamental. Rivera-Walsh e colaboradores, relatam que tanto a indução da atividade promotora quanto a expressão do FasL não foram afetados nas células T Jurkat deficientes para I κ B quinase γ , componente essencial para a ativação do NF- κ B [178]. Esta segunda possibilidade é sustentada pelos dados que mostram que em células DO11.10 transfectadas com I κ B dominante negativo, que não permite a translocação do NF- κ B para o núcleo, expressam FasL normalmente quando estimuladas [126]. Deste modo, estudos em diferentes tipos celulares fornecem evidências claras de que a ativação do NF κ B pode é importante para a expressão gênica do *fasl*.

De uma forma geral, a participação do fator de transcrição NF- κ B na apoptose é controversa uma vez que o NF- κ B é considerado tanto como um fator pro-apóptotico na AICD de algumas linhagens celulares quanto como um fator anti-apóptotico em células tratadas com TNF- α e com certos compostos quimioterápicos [179]. Se o fator NF- κ B promove ou inibe ou até mesmo não interfere na morte celular programada são processos extremamente dependentes do tipo celular e do tipo do indutor. Nossos resultados sugerem que, provavelmente, o NF- κ B não participa da regulação transcricional do FasL nas células DO11.10.

Finalmente, nossos dados fornecem evidências que o principal mecanismo efetor de melatonina e AFMK na AICD é independente da ação antioxidante e da via do fator de transcrição NF- κ B, ao contrário dos diversos estudos de apoptose induzida por ROS nos quais melatonina faz uso da sua capacidade antioxidante para inibir a ativação do NF- κ B e a morte celular [180-182].

Além da via de ativação do NF- κ B, a expressão de FasL também está associada à ativação do fator de transcrição NFAT [155]. Desta forma, passamos a investigar a participação do NFAT na regulação transcricional do FasL nas células DO11.10 e se melatonina ou AFMK poderiam interferir nesta regulação. Inicialmente, avaliamos o efeito

de ciclosporina, que é uma droga imunossupressora, na apoptose destas células. O mecanismo de ação da ciclosporina é bem compreendido e consiste na inibição da desfosforilação do NFAT dependente de calcineurina e tem como objetivo diminuir a transcrição de vários genes incluindo IL-2 e FasL [183]. Neste trabalho, este experimento foi necessário para validar a participação efetiva do NFAT na AICD de células DO11.10, já que existem diferenças na participação dos fatores de transcrição envolvidos na expressão de FasL entre os diversos tipos e linhagens celulares. De acordo com as análises de fragmentação de DNA, constatamos que ciclosporina inibiu significativamente a AICD destas células em concentrações da ordem de micromolar (figura 29). Este resultado sugeriu, portanto, que um bloqueio específico da via de sinalização do NFAT protege as células DO11.10 da apoptose, provavelmente através da inibição da expressão de FasL. Isto não exclui, obviamente, a participação de outros fatores de transcrição, mas aponta uma modulação central do NFAT neste processo.

A importância do NFAT na regulação do FasL pode ser evidenciada pelos estudos com camundongos knockout para o fator de transcrição NFATp e NFAT4 [184]. Interessantemente, os linfócitos destes animais exibem uma diminuição na expressão de FasL e desordens linfoproliferativas semelhantes aos camundongos MRL/*gld* que são deficientes para FasL [87]. Embora a importância do NFAT na regulação transcricional do FasL esteja clara, alguns trabalhos sugerem que a expressão do FasL mediada por NFAT requer a cooperação de outros fatores de transcrição, dentre eles AP-1 e Egr [185,186.]. Entretanto, a maioria dos estudos demonstram que NFAT, dentre os fatores de transcrição, é o mediador chave na expressão do FasL induzida após a estimulação do complexo TCR/CD3 nos linfócitos T [187-189]. Similarmente, o NFAT também está envolvido na expressão de FasL em linfócitos T Jurkat induzidos à morte por drogas que causam o stress oxidativo [190]. A indução do FasL mediada por NFAT também foi observada em células NK ativadas [191]. Vale ressaltar que estes estudos mostram a calcineurina como principal ativadora do NFAT independentemente do estímulo e em diferentes tipos celulares.

Como mencionado anteriormente, o bloqueio da via da calcineurina inibe a AICD de células DO11.10 (figura 29). Sabe-se que a ativação da calcineurina é dependente do influxo de cálcio intracelular e da ligação à proteína citoplasmática calmodulina. Várias evidências sugerem que a melatonina, sendo uma molécula lipofílica, pode se ligar a

certos sítios intracelulares e a algumas proteínas citosólicas mediando, assim, efeitos celulares até em tecidos que não possuem seus receptores de membrana [192]. Um exemplo dessas proteínas citosólicas é a calmodulina [133]. Na verdade, a ligação de melatonina com calmodulina impede a ativação das enzimas que são dependentes da ligação ao complexo cálcio/calmodulina, dentre elas a calcineurina e a óxido nítrico sintase [193]. Assim sendo, é provável que a ligação de calmodulina por melatonina no nosso modelo experimental prejudique a ativação de calcineurina e, conseqüentemente a desfosforilação, translocação do NFAT e a expressão do FasL.

Para testar esta hipótese, avaliamos o perfil da expressão das proteínas do NFAT nas células estimuladas com os anticorpos anti-CD3 e quando tratadas com melatonina e AFMK por western blot. Neste ensaio, verificamos que os extratos celulares provenientes das células ativadas com anti-CD3 apresentaram as proteínas do NFAT desfosforiladas (forma ativa), enquanto o tratamento com melatonina e AFMK promoveu a predominância das proteínas na forma fosforiladas (forma inativa) (figura 30). Estes dados se correlacionaram com os níveis apoptóticos dos tratamentos correspondentes tanto para melatonina quanto para o AFMK, ou seja, em baixas concentrações (0,25 mM) melatonina e AFMK inibem parcialmente a ativação do NFAT e protegem razoavelmente as células da morte (figura 14 e 30). Na concentração de 1 mM, melatonina e AFMK inibem significativamente a ativação do NFAT e promovem uma proteção efetiva contra a apoptose (figura 14 e 30). Este último resultado propõe, portanto, que o mecanismo de ação de melatonina e AFMK na AICD, provavelmente, está centrado na capacidade de ligação à calmodulina.

As implicações biológicas da ligação de melatonina com calmodulina têm sido descritas com relação à inibição das enzimas fosfodiesterases [194], proteínas quinases [195], adenil ciclase [196] e, principalmente óxido nítrico sintase (NOS) [197]. Por exemplo, Pozo e colaboradores observaram que melatonina inibe a atividade da isoforma constitutiva da NOS em cerebelo de ratos, sendo este efeito atribuído a sua capacidade de ligação à calmodulina [198]. Resultados semelhantes foram obtidos por Leon e colaboradores, nos quais a atividade da isoforma neuronal (nNOS) de ratos foi inibida por diferentes concentrações de melatonina (1n a 1mM) e o efeito inibitório deste composto foi revertido na presença de altas concentrações de calmodulina [199]. Este mesmo trabalho sugere que os metabólitos de melatonina do tipo quinureninas também poderiam inibir a

atividade da nNOS. Outros trabalhos reforçam a idéia de que as quinureninas, por si só, sejam potentes inibidores de nNOS [200-201].

Recentemente, Leon e colaboradores demonstraram que, além de melatonina, o AMK também inibe a atividade da nNOS de ratos através da interação com o complexo cálcio/calmodulina [202]. Este estudo mostra a habilidade do AMK de ligar-se a calmodulina e sugere que as alterações conformacionais provenientes desta ligação impeçam, portanto, a interação da calmodulina com a nNOS. Além disto, os autores supõem que o AMK utilize os mesmo sítios de ligação que a melatonina e mostram que o metabólito é mais potente do que a própria melatonina na inibição de nNOS de ratos.

Apesar dos nossos resultados não demonstrarem a ligação estrutural de melatonina e AFMK com calmodulina no modelo experimental de AICD, existem evidências sólidas que suportam a idéia de que a ligação de calmodulina por melatonina e seu produtos de oxidação tem relevância tanto fisiológica quanto farmacológica e pode controlar diversos processos biológicos. Acoplado ao fato de que a ativação do NFAT e a AICD das células DO11.10 foi regulada intrinsecamente por calcineurina (figura 29), nós sugerimos que melatonina e AMK inibem indiretamente a atividade de calcineurina através da interação com o complexo cálcio/calmodulina. O bloqueio da via de calcineurina por melatonina e AFMK foi visualizado pela inibição da desfosforilação das proteínas do NFAT (figura 30). Uma vez que a desfosforilação do NFAT é um evento essencial para a translocação nuclear e transcrição gênica, a supressão desta via por melatonina e AFMK justificaria também a inibição da expressão do FasL e, desta forma, a proteção destes composto na AICD de células DO11.10.

A formação do complexo cálcio-calmodulina-melatonina no meio biológico irá depender das concentrações de ambas as espécies em diferentes microambientes fisiológicos e em diferentes tipos celulares [203]. Isto se torna especialmente interessante se imaginarmos que os próprios linfócitos são capazes de sintetizar grandes quantidades de melatonina e que a transcrição dos principais genes nestas células é mediada por calcineurina, que por sua vez é dependente da ligação a calmodulina. Desta forma, esta intereação pode mediar alguns dos efeitos de melatonina nos linfócitos independente da sua ação antioxidante ou de receptores. Adicionalmente, a interação de melatonina com calmodulina é um dos mecanismos propostos para explicar o efeito terapêutico e inibitório de melatonina na proliferação de células cancerosas [204].

A regulação da expressão do FasL é um dos principais pontos de controle na AICD e, conseqüentemente na manutenção da homeostase dos linfócitos T e dos tecidos [129]. Esta molécula participa ativamente do processo de apoptose dos linfócitos que acontece no final da resposta imune, após a eliminação do antígeno. Este mecanismo de morte celular é importante para a contração/redução das populações linfocitárias que foram expandidas durante a resposta imune eliminando as células T efetoras que poderiam causar dano ao tecido. Vale ressaltar que a AICD mediada por FasL é responsável também pela depleção periférica de células T auto-reativas evitando, assim, algumas doenças auto-imunes. Assim sendo, o impedimento da sinalização associada ao sistema Fas/FasL e, do mesmo modo, da apoptose, parece contribuir para uma variedade de sérias desordens relacionadas com a proliferação celular, processos inflamatórios e auto-imunidade [129]. Desta forma, compostos endógenos ou exógenos que regulam a expressão de FasL poderia controlar a susceptibilidade dos linfócitos para a AICD.

É possível que a inibição da AICD por melatonina e AFMK observada neste estudo refira-se a um mecanismo específico existente para conservar as células T efectoras vivas por um tempo maior, mantendo assim a resposta imune. Merece atenção o fato de que os próprios linfócitos produzem melatonina e, deste modo poderiam utilizar este composto para evitar a morte prematura das células que resultaria na eliminação prejudicada do patógeno. Por outro lado, o efeito inibitório de melatonina e AFMK na expressão de FasL poderia resultar no acúmulo e na expansão de linfócitos auto-reativos, principalmente nos indivíduos que fazem o uso terapêutico de melatonina, tais como no tratamento de insônia [205].

O interesse sobre o composto melatonina tem aumentado profundamente devido a influência deste nos processos de apoptose de células do sistema imune e no câncer. No entanto, os mecanismos de ação pelos quais a melatonina atua nestes processos de morte celular ainda não estão totalmente esclarecidos. O presente estudo fornece evidências de que melatonina e seus produtos de oxidação AFMK e AMK inibem a expressão de FasL, através do bloqueio da via de sinalização do NFAT, e protegem, portanto, os linfócitos T da morte celular induzida por anticorpos anti-CD3. Estes resultados encorajam para maiores investigações sobre o efeito de melatonina na AICD de linfócitos humanos de sangue periférico e se a suplementação de melatonina poderia ter efeitos importantes na sobrevivência dos linfócitos T. Sem um estudo aprofundado

sobre os efeitos da melatonina no sistema imune, principalmente em linfócitos T, não é possível prever os efeitos colaterais e/ou nocivos da ingestão continuada deste composto, fazendo com que as pessoas consumam este produto/medicamento sem estarem devidamente informadas sobre seus potenciais riscos.

Conclusões

8 Conclusões

Neste trabalho mostramos que:

1. KYN, AFMK e AMK inibem processos chaves na ativação dos linfócitos T, dentre eles, a proliferação celular e a síntese da citocina IL-2.
2. KYN, AFMK e AMK inibem também a produção de IFN- γ , uma típica citocina pró-inflamatória.
3. KYN, AFMK e AMK não alteram a síntese das citocinas IL-10 e IL-12.
4. Melatonina e seus produtos de oxidação inibem a morte celular de linfócitos T induzida por anticorpos anti-CD3.
5. Melatonina e AFMK inibem a expressão da molécula de FasL, fato que, aparentemente, independe da via de sinalização mediada por NF- κ B e possivelmente é dependente da inibição de NFAT.

Considerações Finais

9 Considerações Finais

A proteção do hospedeiro contra microrganismos patogênicos e células tumorais é conferida pelo sistema imune. Células do sistema imune, tais como neutrófilos, monócitos, linfócitos, células NK e células dendríticas são ativadas quando os microorganismos conseguem romper as barreiras naturais de proteção. Estima-se que na maior parte das vezes, a ativação de neutrófilos e monócitos sejam suficientes para conter a invasão e eliminar os patógenos. No entanto, a persistência dos microrganismos no hospedeiro faz com que o sistema imune elabore uma resposta específica. Esta, usualmente, envolve a participação e a ativação de linfócitos T.

A ativação dos linfócitos T, via receptores TCR, inicia uma seqüência de sinais bioquímicos que resultam na ativação transcricional de genes específicos envolvidos na proliferação e na diferenciação dos linfócitos em células efetoras, dentre eles os genes que promovem a síntese de citocinas. Adicionalmente, o programa de ativação dos linfócitos T envolve a indução de genes que participam da morte destas células, especialmente o *fasl*. Assim sendo, os linfócitos T sofrem rígida regulação homeostática desde o reconhecimento do antígeno até a sua eliminação. Estes eventos são extremamente importantes para o bom funcionamento do sistema imune, garantindo respostas imunes efetivas, porém controladas e com o mínimo possível de dano ao organismo. Deste modo, compostos endógenos ou exógenos que alterem as funções biológicas dos linfócitos T podem modular passos importantes na resposta imune. Dentre os compostos que tem mostrado atividade biológica sobre os linfócitos T encontram-se os compostos indólicos como o triptofano e a melatonina.

A depleção do triptofano no microambiente inflamatório prejudica os processos de proliferação celular, afetando à ativação dos linfócitos T. Atualmente sabe-se que os produtos gerados a partir da oxidação do triptofano possuem atividades imunoregulatórias importantes sobre os linfócitos e outras células do sistema imune. Entretanto, a maioria dos estudos dá ênfase apenas aos efeitos biológicos promovidos pelos produtos finais do metabolismo, tais como 3-hidroxi-quinurenina e o ácido quinolínico. Estudos sobre as ações fisiológicas desencadeadas pelos primeiros produtos formados na via de metabolização do triptofano no sistema imune como, por

exemplo, KYN são escassos. Isto é especialmente interessante se considerarmos que em alguns tipos celulares do sistema imune a oxidação de triptofano resulta em KYN como produto final.

Além dos metabólitos do tipo quinureninas, o triptofano também dá origem a outros produtos incluindo serotonina e melatonina. Vários trabalhos já demonstraram os efeitos modulatórios de melatonina sobre as células do sistema imune. Estes estudos têm como base a presença de receptores de melatonina em neutrófilos, monócitos e, principalmente nos linfócitos. A identificação de que linfócitos, além da glândula pineal, sintetizam grandes quantidades de melatonina elevou ainda mais o interesse de se entender as interações entre este composto e a sua influência no sistema imune. Embora o significado fisiológico desta melatonina endógena não esteja totalmente esclarecido, acreditamos na possibilidade de que sua oxidação por células do sistema imune represente uma via alternativa de metabolização deste composto, especialmente importante na inflamação. Em trabalhos anteriores, demonstramos a rota de metabolização de melatonina, com a formação dos compostos biologicamente ativos, AFMK e AMK, cujas estruturas são semelhantes às quinureninas originadas da oxidação de triptofano. Algumas atividades biológicas de AFMK e AMK sobre os neutrófilos e monócitos já foram descritas. No entanto, os efeitos de AFMK e AMK sobre a função dos linfócitos ainda permanecem desconhecidos.

Assim sendo, este trabalho foi proposto para verificar se os produtos de oxidação tanto de triptofano quanto de melatonina, por si só, possuem efeitos imunomodulatórios em linfócitos T. Para tanto, avaliamos os principais processos de ativação e desativação dos linfócitos T na presença de KYN, AFMK e AMK.

Na primeira parte da tese, traçamos um paralelo entre os efeitos desencadeados por KYN com os efeitos promovidos pelos produtos de oxidação de melatonina (AFMK e AMK) sobre os eventos iniciais após a ativação dos linfócitos, ou seja, na síntese de IL-2 e na linfoproliferação. Verificamos, ainda, o potencial destes compostos na produção das citocinas pró e antiinflamatórias, tais como IFN- γ , IL-10 e IL-12. Observamos que KYN, AFMK e AMK inibem a liberação de IFN- γ e que esta inibição não está associada a variações na produção das duas citocinas mais importantes na regulação de IFN- γ , ou seja, IL-10 e IL-12. A inibição de IFN- γ não foi

decorrente do efeito inibitório destes compostos na proliferação celular e na produção de IL-2, pois as concentrações de KYN, AFMK e AMK são muito superiores às que causam inibição de IFN- γ .

Na segunda parte deste trabalho, investigamos a ação da melatonina e seus produtos de oxidação sobre a morte celular induzida por ativação de hibridomas de linfócitos T considerando que este processo de apoptose é um mecanismo de desativação destas células, já que acontece após a eliminação do antígeno e é essencial para evitar que os linfócitos ativados causem danos aos tecidos. Nossos resultados demonstram que tanto melatonina quanto AFMK e AMK são potentes inibidores da apoptose dos linfócitos T via inibição da expressão gênica de FasL. O mecanismo de ação envolvendo a atividade antioxidantes de melatonina e AFMK foi excluído, assim como o envolvimento do fator de transcrição NF- κ B no processo de inibição da apoptose. Os resultados apontaram para a interferência da melatonina e AFMK na via de sinalização do fator de transcrição NFAT, que é um dos principais responsáveis pela expressão do FasL. Uma vez que a ativação do NFAT é regulada pelas proteínas calmodulina e calcineurina, a inibição da função de calmodulina por melatonina pode ser um dos mecanismos pelos quais estes compostos impedem a ativação do NFAT e, conseqüentemente inibem a expressão do FasL protegendo, assim, às células T da morte.

Em conjunto, estes dados demonstram que os produtos formados tanto a partir da oxidação de triptofano quanto de melatonina são potenciais reguladores da resposta imune e podem participar dos efeitos imunossupressores nos qual a depleção de triptofano tem sido sugerida como principal mecanismo de regulação dos linfócitos T. Da mesma forma, sugere-se que parte dos efeitos biológicos descritos para melatonina podem ser intermediado também pelos seus produtos de oxidação. Nossos achados têm implicações clínicas importantes especialmente nos casos em que melatonina é administrada farmacologicamente. É possível que a inibição da morte celular dos linfócitos T por melatonina e AFMK observada neste estudo resulte no acúmulo e na expansão de linfócitos auto-reativos em indivíduos que fazem o uso terapêutico de melatonina, tais como no tratamento de insônia, e possa promover no futuro reações de auto-imunidade. Por outro lado, o efeito inibitório destes compostos na morte celular

pode ser um mecanismo fisiológico existente para conservar os linfócitos T efetores vivos por um tempo maior, tendo em vista que os próprios linfócitos são capazes de sintetizar e utilizar grandes quantidades de melatonina.

Referências bibliográficas

10 Referências bibliográficas

1. STONE, T.W. (2001). "Endogenous neurotoxins from tryptophan." **Toxicon**, **39**(1): p. 61-73.
2. [WIDNER B](#), [LEBLHUBER F](#), [WALLI J](#), [TILZ GP](#), [DEMEL U](#), [FUCHS D](#). (2000). "Tryptophan degradation and immune activation in Alzheimer's disease." **J Neural Transm.** **107**(3): p. 343-53.
3. TAYLOR MW, FENG GS. (1991). "Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2, 3-dioxygenase, and tryptophan catabolism." **Faseb J**, **5**(11): p. 2516-22.
4. SALTER M POGSON CI. (1985). "The role of tryptophan 2, 3-dioxygenase in the hormonal control of tryptophan metabolism in isolated rat liver cells. Effects of glucocorticoids and experimental diabetes". **Biochem J**, **229**(2): p. 499-504.
5. YOSHIDA, R., IMANISHI J, OKU T, KISHIDA T, HAYAISHI O. (1981). "Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by interferon." **Proc Natl Acad Sci**, **78**(1): p. 129-32.
6. WERNER ER, BITTERLICH G, FUCHS D. (1987). "Human macrophages degrade tryptophan upon induction by interferon gamma." **Life Sci**, **41**: p.273-80.
7. HWU P, DU MX, LAPOINTE R, DO M, TAYLOR MW, YOUNG HA. (2000). "Indoleamine 2, 3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation." **J Immunol**, **164**: p.3596-699.
8. BYRNE GI, LEHMANN LK, KIRCHBAUM, JG, BORDEN EC, LEE CM, BROWN RR. (1986) "Induction of tryptophan degradation in vitro and in vivo: a gamma-interferon-stimulated activity. **J Interferon Res**, **6**(4): p. 389-96.

9. WERNER-FELMAYER G., WENER ER, FUCHS D, HAUSEN A, WACHTER H. (1991). "Induction of indoleamine 2, 3-dioxygenase in human cells in vitro." **Adv Exp Med Biol**, **294**: p. 505-9.
10. FUJIGAKI, S. (2001). "Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2,3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN-gamma-independent mechanism." **Eur J Immunol**, **31(8)**: p. 2313-8.
11. ESPEY MG, NAMBOODIRI MA. (2000) Selective metabolism of kynurenine in the spleen in the absence of indoleamine 2,3-dioxygenase induction. **Immunol Lett**, **71(1)**: p. 67-72.
12. PFEFFERKORN ER, ECKEL M, REBHUN S. (1986). "Interferon-gamma suppresses the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts through starvation for tryptophan." **Mol Biochem Parasitol**, **20(3)**: p. 215-24.
13. BYRNE GI, LEHMANN LK, LANDRY GJ. (1986) Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* replication in T24 cells. **Infect Immun**, **53(2)**: p. 347-51.
14. OZAKI Y, EDELSTEIN MP, DUCH MS. (1988). « Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase: a mechanism of the antitumor activity of interferon gamma." **Proc Natl Acad Sci**, **85(4)**: p. 1242-6.
15. MUNN DH, ZHOU M, ATTWOOD JT, BONDAREV I, CONWAY SJ, MARSHALL B, BROWN C, MELLOR AL. (1998). "Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism." **Science**, **281(5380)**: p. 1191-3.

16. KUDO, Y. (2001). "Tryptophan degradation by human placental indoleamine 2,3-dioxygenase regulates lymphocyte proliferation." **J Physiol**, **535** (Pt 1): p. 207-15.
17. MUNN, DH, SHAFIZADEH E, ATTWOOD JT, BONDAREV I, PASHINE A, MELLOR AL. (1999). "Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism." **J Exp Med**, **189**(9): p. 1363-72.
18. TERNESS P, BAUER TM, ROSE L, DUFTER C, WATZLIK A, SIMON H, OPELZ G. (2002). "Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites." **J Exp Med**, **196**(4): p. 447-57.
19. GROHMANN UF, FALLARINO, PUCETTI P. TOLERANCE. (2003). "DCs and tryptophan: much ado about IDO." **Trends Immunol.** **24**(5): p. 242-8.
20. UYTENHOVE, C, PILOTTE L, THÉATE I, STROOBANT V, COLAU D, PARMENTIER N, BOON T, VAN DEN EYNDE B. (2003). "Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase." **Nat Med**, **9**(10): p. 1269-74.
21. FRIBERG, M, JENNINGS R, ALSARRAJ M, DESSUREAULT S, CANTOR A, EXTERMANN M, MELLOR AL, MUNN DH, ANTONIA SJ. (2002). "Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection." **Int J Cancer**, **101**(2): p. 151-5.
22. FRUMENTO G, ROTONDO R, TONETTI M, DAMONTE G, BENATTI U, FERRARA GB. (2002). "Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase." **J Exp Med**, **196**(4): p. 459-68.

23. FALLARINO F, GROHMANN U, VACCA C, BIANCHI R, ORABONA C, SPRECA A, FIORETTI MC, PUC CETTI P. (2002). "T cell apoptosis by tryptophan catabolism." **Cell Death Differ**, **9** (10): p. 1069-77.
24. SEKKAI D, GUITTET O, LEMAIRE G, TENU JP, LEPOIVRE M. (1997). "Inhibition of nitric oxide synthase expression and activity in macrophages by 3-hydroxyanthranilic acid, a tryptophan metabolite." **Arch Biochem Biophys**, **340**(1): p. 117-23.
25. MOFFETT JR, NAMBOODIRI MA. (2003). "Tryptophan and the immune response." **Immunol Cell Biol**, **81**(4):247-65.
26. MOFFETT J.R, ESPEY MG, GAUDET SJ, NAMBOODIRI MA. (1993). "Antibodies to quinolinic acid reveal localization in select immune cells rather than neurons or astroglia." **Brain Res**, **623**(2): p. 337-40.
27. HEYES MP, BREW BJ, MARTIN A, PRICE RW, SALAZAR AM, SIDTIS JJ, YERGEY JA, MOURADIAN MM, SADLER AE, KEILP J. (1991). "Quinolinic acid in cerebrospinal fluid and serum in HIV-1 infection: relationship to clinical and neurological status." **Ann Neurol**, **29** (2):202-9.
28. WIRLEITNER B, RUDZITE V, NEURAUTER G, MURR C, KALNINS U, ERGLIS A, TRUSINSKIS K, FUCHS D.(2003). "Immune activation and degradation of tryptophan in coronary heart disease." **Eur J Clin Invest**, **33**(7):550-4.
29. HUENGESBERG M, WINER JB, GOMPELS M, ROUND R, ROSS J, SHAHMANESH M. (1998). "Serum kynurenine-to-tryptophan ratio increases with progressive disease in HIV-infected patients." **Clinical Chemistry**, **44**(4): p.858-862.

30. ZHDANOVA IV, LYNCH HJ, WURTMAN RJ. (1997). "Melatonin: a sleep-promoting hormone." **Sleep**, **20**(10): p. 899-907.
31. REITER RJ. (1991). "Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions." *Endocr Rev*, **12**(2): p. 151-80.
32. CONTI A, CONCONI S, HERTENS E, SKWARLO-SONTA K, MARKOWSKA M, MAESTRONI JM. (2000). "Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells." **J Pineal Res**, **28**(4): p. 193-202.
33. TAN D.X. (1999). 'Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance." **Biochim Biophys Acta**, **1472**(1-2): p. 206-14.
34. FINOCCHIARO LM, NAHMOD VE, LAUNAY JM. (1991). "Melatonin biosynthesis and metabolism in peripheral blood mononuclear leucocytes." **Biochem J**, **280** (Pt 3): p. 727-31.
35. CARRILLO-VICO A, CALVO JR, ABREU P, LARDONE PJ, GARCIA-MAURINO S, REITER RJ, GUERRERO JM. (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): p. 537-9.
36. REITER RJ. (1980). "The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals." **Endocr Rev**, **1**(2): p. 109-31.
37. REITER RJ, TAN DX, OSUNA C, GITTO E. (2000). "Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress." A review. **J Biomed Sci**, **7**(6): p. 444-58.

38. KARBOWNIK M, REITER RJ. (2000.) "Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation." **Proc Soc Exp Biol Med**, **225**(1): p. 9-22.
39. GUERRERO JM, REITER RJ. (2002). "Melatonin-immune system relationships." **Curr Top Med Chem**, **2**(2): p. 167-79.
40. LOPEZ-GONZALEZ MA, CALVO JR, SEGURA JJ, GUERRERO JM. (1993). "Characterization of melatonin binding sites in human peripheral blood neutrophils." **Biotechnol Ther**, **4**(3-4): p. 253-62.
41. BARJAVEL MJ, MAMDOUH Z, RAGHBATE N, BAKOUCHE O. (1998) "Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes." **J Immunol**, **160**(3): p. 1191-7.
42. LOPEZ-GONZALEZ MA, CALVO JR, OSUNA C, GUERRERO JM. (1992). "Interaction of melatonin with human lymphocytes: evidence for binding sites coupled to potentiation of cyclic AMP stimulated by vasoactive intestinal peptide and activation of cyclic GMP." **J Pineal Res**, **12**(3): p. 97-104.
43. DI STEFANO A, PAULESU L. (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): p. 164-9.
44. PERSENGIEV SP, KYURKCHIEV S. (1993). "Selective effect of melatonin on the proliferation of lymphoid cells." **Int J Biochem**, **25**(3): p. 441-4
- SANCHEZ-MARGALET V, GOBERNA R, GUERRERO JM. (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): p. 574-81.
45. VIJAYALAXMI, REITER RJ, LEAL BZ, MELTZ ML. (1996). "Effect of melatonin on mitotic and proliferation indices, and sister chromatid exchange in human blood lymphocytes." **Mutat Res**, **351**(2): p. 187-92.
46. LOTUFO CM LOPES C, DUBOCOVICH ML, FARSKY SH, MARKUS RP. (2001). "Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation." **Eur J Pharmacol**, **430**(2-3): p. 351-7.
47. SAINZ RM, MAYO JC, RODRIGUEZ C, TAN DX, LOPEZ-BURILLO S, REITER RJ. (2001). "Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells." **Cell Mol Life Sci**, **60**(7): p. 1407-26.
48. SAINZ RM, MAYO JC, URIA H, KOTLER M, ANTOLIN I, RODRIGUEZ C, MENENDEZ-PELAEZ. (1995). "The pineal neurohormone melatonin prevents in vivo and in vitro apoptosis in thymocytes." **J Pineal Res**, **19**(4): p. 178-88.
49. COS S, MEDIAVILLA MD, FERNANDEZ R, GONZALEZ-LAMUNO D, SANCHEZ-BARCELO EJ. (2002). "Does melatonin induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells in vitro?" **J Pineal Res**, **32**(2): p. 90-6.
50. CARDINALI DP, BRUSCO LI, LLORET SP, FURIO AM. (2002). "Melatonin in sleep disorders and jet-lag." **Neuro Endocrinol Lett**, **23** Suppl 1: p. 9-13.
51. BARTSCH C, BARTSCH H, KARASEK M. (2002). "Melatonin in clinical oncology." **Neuro Endocrinol Lett**, **23** Suppl 1: p. 30-8.

52. VIJAYALAXMI, THOMAS CR JR, REITER RJ, HERMAN TS. (2002). "Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics." **J Clin Oncol**, 20(10): p. 2575-601.
53. LISSONI P, ROVELLI F, FRASSINETI A, FUMAGALLI L, MALYSHEVA O, CONTI A, MAESTRONI G. (2000). "Oncostatic activity of pineal neuroendocrine treatment with the pineal indoles melatonin and 5-methoxytryptamine in untreatable metastatic cancer patients progressing on melatonin alone." **Neuroendocrinol Lett**, 21(4): p. 319-323.
54. LISSONI P. (2002). "Is there a role for melatonin in supportive care?" **Support Care Cancer**, 10(2): p. 110-6.
55. LISSONI P, ROVELLI F, MALUGANI F, BUCOVEC R, CONTI A, MAESTRONI GJ. (2001). "Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients." **Neuro Endocrinol Lett**, 22(1): p. 45-7.
56. LISSONI P, CHILELLI M, VILLA S, CERIZZA L, TANCINI G. (2003). "Five years survival in metastatic non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy alone or chemotherapy and melatonin: a randomized trial." **J Pineal Res**, 35(1): p. 12-5.
57. JAN MM. (2000). "Melatonin for the treatment of handicapped children with severe sleep disorders." **Pediatr Neurol**, 23(3):229-32.
58. ZHDANOVA IV, WURTMAN RJ, MORABITO C, PIOTROVSKA VR, LYNCH HJ. (1996). "Effects of low oral doses of melatonin, given 2-4 hours before habitual bedtime, on sleep in normal young humans." **Sleep**, 19(5):423-31.

59. TAN DX, MANCHESTER LC, REITER RJ, PLUMMER BF. (1999). "Cyclic 3-hydroxymelatonin: a melatonin metabolite generated as a result of hydroxyl radical scavenging." **Biol Signals Recept**, 8(1-2):70-4.
60. HIRATA F, HAYAISHI O, TOKUYAMA T, SENO, S. (1974). "In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin." **J Biol Chem**, 249(4): p. 1311-3.
61. SILVA SO, XIMENES VF, CATALANI LH, CAMPA A. (2000). "Myeloperoxidase-catalyzed oxidation of melatonin by activated neutrophils." **Biochem Biophys Res Commun**, 279(2): p. 657-62.
62. TAN DX. (2001). "N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant." **Faseb J**, 15(12): p. 2294-6.
63. RESSMEYER A.R. (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): p. 205-13.
64. MAYO JC, SAINZ RM, TAN DX, HARDELAND R, LEON J, RODRIGUEZ C, REITER RJ. (2005). "Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages." **J Neuroimmunol**, 165: p. 139-149.
65. SILVA SO, RODRIGUES MR, XIMENES VF, BUENO-DA-SILVA AE, AMARANTE-MENDES GP, CAMPA A. (2004). "Neutrophils as a specific target for melatonin and kynuramines: effects on cytokine release." **J Neuroimmunol**, 156(1-2):146-52.

66. VALLEJO AB, DAVILA E, WEYAND CM, GORONZY JJ. (2004). "Biology of T lymphocytes." **Rheum Dis Clin N Am**, 30: p. 135-157.
67. BELARDELLI, F. AND FERRANTINI, M. (2002). "Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity." **Trends Immunol**, 23(4): 201-8.
68. BORISH, L. C. AND J. W. STEINKE. (2000). "Cytokines and chemokines." **J Allergy Clin Immunol**, 111(2 Suppl): S460-75.
69. KIDD P. (2003). "Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease." **Altern Med Ver**, 8(3):223-46.
70. FUJIWARA N, KOBAYASHI K. (2005). "Macrophages in inflammation." **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, 4(3):281-6.
71. OKAMURA H, KASHIWAMURA S, TSUTSUI H, YOSHIMOTO T, NAKANISHI K. (1998). "Regulation of interferon- γ production by IL-12 and IL-18." **Current Opinion in Immunology**, 10: 259-284.
72. SCHINDLER HM, LUTZ B. (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
73. FRUCHT DM., FUKAO T. (2001). "IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge." **Trends Immuno**, 22(10): 556-60.
74. MOCELLIN S, MARINCOLA FM, YOUNG HA. (2005). "Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint." **J Leukoc Biol**, 78(5):1043-51.
75. GREEN DR, DROIN N, PINKOSKI M. (2003). "Activation-induced cell death in T cell." **Immunological Reviews**, 193: p.70-81.

76. ASHWELL, J.D.; CUNNINGHAM, R.E.; NOGUHI, P.D.; HERNANDEZ, D. (1987).
 "Cell growth cycle block of T cell hybridomas upon activation with antigen." **J. Exp. Med**, 165: 173-194.
77. KRAMMER PH. (2000). "CD95's deadly mission in the immune system." **Nature**, 407: p.789-795.
78. CUI H, SHERR DH, EL-KHATIB M, MATSUI K, PANKA DJ, ROTHSTEIN AM, JU ST. (1996). "Regulation of T-cell death genes: selective inhibition of faL-but not fas-mediated function." **Cell Immunol**, 167:276-284.
79. ITOH, N., YONEHARA, S., ISHII, A., YONEHARA, M., MIZUSHIMA, S., SAMESHIMA, M., HASE, A., SETO, Y., NAGATA, S. (1991). "The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis." **Cell**, 66: 233-243.
80. ITOH, N. & NAGATA, S. (1993). "A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen." **J Biol Chem**, 268: 10932-10937.
81. CHINNAIYAN, A.M., O'ROURKE, K., TEWARI, M., DIXIT, V.M. (1995). "FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis." **Cell**, 81: 505-512.
82. PETER, M.E. & KRAMMER, P.H. (1998). "Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis." **Curr Opin Immunol**, 10: 545-551.
83. SUDA, T., TAKAHASHI, T., GOLSTEIN, P., NAGATA, S. (1993). "Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family." **Cell**, 75: 1169-1178.

84. PINKOSKI, M.J. & GREEN, D.R. (1999). "Fas ligand, death gene." **Cell Death Differ**, 6: 1174-1181.
85. GREEN, D.R., DROIN, N., PINKOSKI, M. (2003). "Activation-induced cell death in T cells." **Immunol Rev**, 193: 70-81.
86. WATSON, M.L., D'EUSTACHIO, P., MOCK, B.A., STEINBERG, A.D., MORSE, H.C., 3RD, OAKLEY, R.J., HOWARD, T.A., ROCHELLE, J.M., SELDIN, M.F. (1992). "A linkage map of mouse chromosome 1 using an interspecific cross segregating for the gld autoimmunity mutation." **Mamm Genome**, 2: 158-171.
87. NAGATA, S. & SUDA, T. (1995). "Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations." **Immunol Today**, 16: 39-43.
88. POPPEMA, S., MAGGIO, E., VAN DEN BERG, A. (2004). "Development of lymphoma in Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS) and its relationship to Fas gene mutations." **Leuk Lymphoma**, 45: 423-431.
89. IRMLER M.; THOME M.; HAHNE M.; SCHNEIDER P.; HOFMAN K.; STEINER V.; BODMER, J.L.; SCHRÖTER M.; BURNS K.; MATTMAN C. (1997). "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP." **Nature**, 388: 190-195.
90. TAN DX., MANCHESTER LC., REITER RJ., PLUMMER B., LIMSON JST, WEINTRAUB W QI. (2000). "Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: A potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation." **Free Radical Biol. Med**, 29, 1177–1185.B
91. BOYUM, A. (1968). "Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood." **Scand. J. Clin. Lab. Invest**, 21, 77-89.

- 92.DEVADAS S, HINSHAW JA, ZARITSKAYA L, WILLIAMS MS. (2003). "Fas-stimulated generation of reactive oxygen species or exogenous oxidative stress sensitize cells to fas- mediated apoptosis." **Free Rad Biol Med**, 35:648-661.
- 93.Devadas S, Hinshaw JA, Zaritskaya L. (2003) "Williams MS. Fas-stimulated generation of reactive oxygen species or exogenous oxidative stress sensitize cells to Fas-mediated apoptosis." **Free Radic Biol Med**. **15**;35(6):648-61.
- 94.MELLOR, A.L, MUNN, D.H. (2004). " IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism." [Nat Rev Immunol](#). **4**, 762-74.
- 95.[MUNN, D.H.](#), [SHARMA, M.D.](#), [BABAN, B.](#), [HARDING, H.P.](#), [ZHANG, Y.](#), [RON, D.](#), [MELLOR, A.L.](#) (2005). "GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2, 3-dioxygenase." [Immunity](#). **22**, p: 633-42.
- 96.[GROHMANN, U.](#), [FALLARINO, F.](#), [BIANCHI, R.](#), [ORABONA, C.](#), [FIORETTI, M.C.](#), [PUC CETTI, P.](#) (2003). "A defect in tryptophan catabolism impairs tolerance in nonobese diabetic mice." [J Exp Med](#). **198**, p: 153-60.
- 97.[MUNN, D.H.](#) (2006)." Indoleamine 2,3-dioxygenase, tumor-induced tolerance and counter-regulation." [Curr Opin Immunol](#). **18**, p: 220-5.
- 98.BOASSO, A., HERBEUVAL, J-P., HARDY, A.W., WINKLER, C., SHEARER GENE M. (2005). " Regulation of indoleamine 2, 3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4⁺ T cells." **Blood** **105**, p: 1574-1581.
- 99.[MARTINS, E. JR.](#), [FERREIRA, AC](#), [SKORUPA, AL](#), [AFECH E, SC](#), [CIPOLLA-NETO, J](#), [COSTA ROSA, LF](#). (2004). "Tryptophan consumption and indoleamines production by peritoneal cavity macrophages." **J. Leukocyte Biol** **75**, p: 1116-1121

100. [RODRIGUES, MR.](#), [RODRIGUEZ, D.](#), [HENRIQUE CATALANI, L.](#), [RUSSO, M.](#), [CAMPA, A.](#) (2003). "Interferon-gamma independent oxidation of melatonin by macrophages. **J Pineal Res.** **34**, 69-74.
101. FERRY, G, UBEAUD, C., LAMBERT, P.H., BERTI, S., COGE, F., CHOMARAT, P., DELAGRANGE, .P, SERKIZ, B., BOUCHET, J.P., TRUSCOTT, R.J., BOUTIN, J.A. (2005) Molecular evidence that melatonin is enzymatically oxidized in a different manner than tryptophan: investigations with both indoleamine 2,3-dioxygenase and myeloperoxidase. **Biochem J.** **388**, p: 205-15.
102. PESTKA, S., KRAUSE, C. D., SARKAR, D., WALTER, M. R., SHI, Y., FISHER, P.B. (2004). "Interleukin-10 and Related Cytokines and Receptors." **Annual Review of Immunology**, **22**, 929-979.
103. REITER, RJ, TAN, DX, CABRERA, J., D'ARPA, D. (1999). "Melatonin and tryptophan derivatives as free radical scavengers and antioxidants." **Adv Exp Med Biol.** **467**, 379-87
104. RESSMEYER, AR., MAYO, JC, ZELOSKO, V, SAINZ, RM, TAN, DX, POEGGELER, B, ANTOLIN, I, ZSIZSIK, BK, REITER, RJ, HARDELAND, R. (2003). "Antioxidant properties of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction." **Redox Rep.** **8**, p: 205-13.
105. MICHIELS, C, MINET, E, MOTTET, D, RAES, M. (2002). " Regulation of gene expression by oxygen: NF-kappaB and HIF-1, two extremes." **Free Radic Biol Med**, **33**,p:1231-42.

106. MOHAN N, SADEGHI K, REITER RJ, MELTZ ML. (1995). "The neurohormone melatonin inhibits cytokine, mitogen and ionizing radiation induced NF-kappa B." **Biochem Mol Biol Int.** **37**(6), p:1063-70.
107. KUHLEIN, E, IRWIN, M. (2001). "Melatonin modulation of lymphocyte proliferation and Th1/Th2 cytokine expression." **J Neuroimmunol.** **117**,p:51-7.
108. MORREY, KM, MCLACHLAN, JA, SERKIN, CD, BAKOUCHE, O. (1994) "Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin." **J. Immunol.** **153**, p: 2671-80.
109. ARIA, SJ, MELEAN, E, VALERO, N, PONS, H, CHACIN-BONILLA, L., LARREAL Y, BONILLA, E. (2003). "Effect of melatonin on lymphocyte proliferation and production of interleukin-2 (IL-2) and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in mice splenocytes." **Invest Clin.** **44**, p:41-50.
110. GARCIA-MAURINO, S, GONZALEZ-HABA, MG, CALVO, JR, RAFII-EL-IDRISSI, M, SANCHEZ-MARGALET, V, GOBERNA, R, GUERRERO, JM. (1997). "Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN- γ production by human circulating CD4⁺ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes." **J. Immunol** **159**, p: 574-581.
111. GARCIA-MAURINO, S, POZO, D, CARRILLO-VICO, A, CALVO, JR, GUERRERO, JM. (1999) "Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production." **Life Sci.** **65**, p: 2143-50.
112. CARRILLO-VICO, A, LARDONE, PJ, FERNANDEZ-SANTOS, JM, MARTIN-LACAVE, I, CALVO, JR, KARASEK, M, GUERRERO, JM. (2005) "Human

- lymphocyte-synthesized melatonin is involved in the regulation of the interleukin-2/interleukin-2 receptor system.” **J. Clin Endocrinol Metab.** **90**, p: 992-1000.
113. FUJIGAKI, S., SAITO, K, TAKEMURA, M, FUJII, H, WADA, H, NOMA, A, SEISHIMA, M. (1997). “ Species differences in L-tryptophan-kynurenine pathway metabolism: quantification of anthranilic acid and its related enzymes.” **Arch Biochem Biophys.** **358**, p: 329-35.
114. SILVA, S.O., XIMENES, VF, LIVRAMENTO, JA, CATALANI, LH, CAMPA, A. (2005) “High concentrations of the melatonin metabolite, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, in cerebrospinal fluid of patients with meningitis: a possible immunomodulatory mechanism.” **J Pineal Res**, **39**, p: 302-6.
115. SCHRODER, K, HERTZOG, PJ, RAVASI, T, HUME, DA. (2004) “Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions.” **J. Leukocyte Biology** **75**: p:163-189.
116. GOLDMANN, O, CHHATWAL, GS, MEDINA, E. (2005). “Contribution of natural killer cells to the pathogenesis of septic shock induced by *Streptococcus pyogenes* in mice.” **J Infect Dis.** **191**, p: 1280-6.
117. BALASA, B, DEN,G C, LEE, J, BRADLEY, LM, DALTON, DK, CHRISTADOSS, P, SARVETNICK, N. (1997). “Interferon gamma (IFN-gamma) is necessary for the genesis of acetylcholine receptor-induced clinical experimental autoimmune myasthenia gravis in mice.” **J Exp Med.** **186**, p: 385-91.
118. YAROVINSKY TO, HUNNINGHAKE GW. (2001) “*Lung fibroblasts inhibit activation-induced death of T cells through PGE(2)-dependent mechanisms.*” **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.**; **281**(5):L1248-56.

119. BAUER MKA, VOGT M, LOS M, SIEGEL J, WESSELBORG S, SCHULZE-OSTHOFF K.(1998). "Role of reactive oxygen intermediates in activation-induced CD95 (APo-1/FAS) ligand expression." **J Biol Chem**, **273**, p: 8048-8055.
120. HUG H, STRAND S, GRAMBIHLER A, GALLE J, HACK V, STREMMEL W, KRAMMER PH, GALLE PR. (1997). "Reactive oxygen intermediates are involved in the induction of CD95 ligand mRNA expression by cytostatic drugs in hepatoma cells." **Biol Chem**, 7;272(45):28191-3.
121. LI-WEBER M, WEIGAND MA, GIAISI M, SÜSS D, TREIBER MK, BAUMANN S, RITSOU E, BREITKREUTZ R, KRAMMER PH. (2002) "Vitamin E inhibits CD95 ligand expression and protects T cell from activation-induced cell death." **J Clin Invest**, 110: p.681-690.
122. TRIPATHI P, HILDEMAN D. (2004). "Sensitization of T cells to apoptosis – A role for ROS?" **Apoptosis**, 9: 515-523.
123. BONIZZI G, PIETTE J, MERVILLE MP, BOURS V. (2000). "Cell type-specific role for reactive oxygen species in nuclear factor-kappaB activation by interleukin-1." **Biochem Pharmacol**, 1;59(1):7-11.
124. UDALOVA, IA, RICHARDSON, A, DENYS, A, SMITH, C, ACKERMAN, H, FOXWELL, B, KWIATKOWSKI, D. (2000). "Functional consequences of a polymorphism affecting NF-kappaB p50-p50 binding to the TNF promoter region." **Mol Cell Biol**, 20: 9113-9119.
125. BRIGELIUS-FLOHE, R, BILGIN, B, EICKEMEIER, S, HIPSKIND, R, SINGH, M, SZAMEL, M, RESCH, K. (1995). "The NF kappa B heterodimer/homodimer balance

- p>and IL-1-stimulated IL-2 production in murine T lymphocytes.”
- Biofactors**
- , 5: 169-174.
126. MALEWICZ M, ZELLER N, YILMAZ ZB, WEIH F. (2003) “NF kappa B controls the balance between Fas and tumor necrosis factor cell death pathways during T cell receptor-induced apoptosis via the expression of its target gene A20.” **J Biol Chem**. **278**(35):32825-33.
127. HSU, SC, GAVRILIN, MA, LEE, HH, WU, CC, HAN, SH, LAI, MZ. (1999). “NF-kappa B-dependent Fas ligand expression.” **Eur J Immunol**, 29: 2948-2956.
128. KASIBHATLA, S, GENESTIER, L, GREEN, DR. (1999). “Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB.” **J Biol Chem**, 274: 987-992.
129. GREEN DR, DROIN N, PINKOSKI M. (2003). “Activation-induced cell death in T cells.” **Immunol Ver**, 193:70-81.
130. BRUNNER T, YOO NJ, LAFACE D, WARE CF, GREEN DR. (1996). “Activation-induced cell death in murine T cell hybridomas. Differential regulation of Fas (CD95) versus Fas ligand expression by cyclosporin A and FK506.” **Int Immunol**, 8(7):1017-26.
131. LATINIS KM, NORIAN LA, ELIASON SL, KORETZKY GA. (1997). “Two NFAT transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells.” **J Biol Chem**, 272(50):31427-34.
132. CLIPSTONE NA, CRABTREE GR. (1992). “Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation.” **Nature**, 357(6380):695-7.

133. BENITEZ-KING G, HUERTO-DELGADILLO L, ANTON-TAY F. (1991).
 "Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro." **Brain Res**, 23;557(1-2):289-92.
134. HUERTO-DELGADILLO L, ANTON-TAY F, BENITEZ-KING G. (1994). "Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: role of melatonin as a calmodulin antagonist." **Pineal Res**, 17(2):55-62.
135. SOTO-VEGA E, MEZA I, RAMIREZ-RODRIGUEZ G, BENITEZ-KING G. (2004).
 "Melatonin stimulates calmodulin phosphorylation by protein kinase C." **Pineal Res**, 37(2):98-106.
136. OUYANG H, VOGEL HJ. (1998). "Melatonin and serotonin interactions with calmodulin: NMR, spectroscopic and biochemical studies." **Biochim Biophys Acta**, 3;1383(1):37-47.
137. KAPPLER J, KUBO R, HASKINS K, HANNUM C, MARRACK P, PIGEON M, MCINTYRE B, ALLISON J, TROWBRIDGE I. (1983). "The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells in mouse and man: identification of constant and variable peptides." **Cell**, 35(1):295-302.
138. PANDI-PERUMAL SR, SRINIVASAN V, MAESTRONI GJ, CARDINALI DP, POEGGELER B, HARDELAND R. (2006). "Melatonin: Nature's most versatile biological signal?" **FEBS J**, 273(13):2813-38.
139. GUENTHER AL, SCHMIDT SI, LAATSCH H, FOTSO S, NESS H, RESSMEYER AR, POEGGELER B, HARDELAND R. (2005). "Reactions of the melatonin metabolite AMK (N1-acetyl-5-methoxykynuramine) with reactive nitrogen species:

- formation of novel compounds, 3-acetamidomethyl-6-methoxycinnolinone and 3-nitro-AMK.” **J Pineal Res**, 39(3):251-60.
140. LIU C, FUKUHARA C, WESSEL JH 3RD, IUVONE PM, TOSINI G. (2004). “Localization of Aa-nat mRNA in the rat retina by fluorescence in situ hybridization and laser capture microdissection.” **Cell Tissue Res**, 315(2):197-201.
141. CHAMPIER J, CLAUSTRAT B, BESANCON R, EYMIN C, KILLER C, JOUVET A, CHAMBA G. (1997). “Evidence for tryptophan hydroxylase and hydroxy-indol-O-methyl-transferase mRNAs in human blood platelets.” **Life Sci**, 60(24):2191-7.
142. BUBENIK GA. (2002). “Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance.” **Dig Dis Sci**, 47(10):2336-48.
143. MENENDEZ-PELAEZ A, POEGGELER B, REITER RJ, BARLOW-WALDEN L, PABLOS MI, TAN DX. (1993). “Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence.” **J Cell Biochem**, 53(4):373-82.
144. KARASEK M, REITER RJ, CARDINALI DP, PAWLIKOWSKI M. (2002). “Future of melatonin as a therapeutic agent.” **Neuro Endocrinol Lett**, 23 Suppl 1:118-21.
145. 145. PANDI-PERUMAL SR, ZISAPEL N, SRINIVASAN V, CARDINALI DP. (2005). “Melatonin and sleep in aging population.” **Gerontol**, 40(12):911-25.
146. SRINIVASAN V, PANDI-PERUMAL SR, MAESTRONI GJ, ESQUIFINO AI, HARDELAND R, CARDINALI DP. (2005). “Role of melatonin in neurodegenerative diseases.” **Neurotox Res**, 7(4):293-318.

147. SRINIVASAN V, MAESTRONI G, CARDINALI D, ESQUIFINO A, PERUMAL SP, MILLER S. (2005). "Melatonin, immune function and aging." **Immun Ageing**, 29;2:17.
148. REITER RJ, TAN DX. (2003). "What constitutes a physiological concentration of melatonin?" **J Pineal Res**, 34(1):79-80.
149. KONTUREK PC, KONTUREK SJ, MAJKA J, ZEMBALA M, HAHN EG. (1997). "Melatonin affords protection against gastric lesions induced by ischemia-reperfusion possibly due to its antioxidant and mucosal microcirculatory effects." **Eur J Pharmacol**, 12;322(1):73-7.
150. CARRILLO-VICO A, REITER RJ, LARDONE PJ, HERRERA JL, FERNANDEZ-MONTESINOS R, GUERRERO JM, POZO D. (2006). "The modulatory role of melatonin on immune responsiveness." **Curr Opin Investig Drugs**, 7(5):423-31.
151. ZHANG J, XU X, LIU Y. (2004). "Activation-induced cell death in T cells and autoimmunity." **Cell Mol Immunol**, 1(3):186-92.
152. BALDWIN, AS, JR. (1996). "The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights." **Annu Rev Immunol**, 14: 649-683.
153. HARWOOD, F,G, KASIBHATLA, S, PETAK, I, VERNES, R, GREEN, DR, HOUGHTON, J,A. (2000). "Regulation of FasL by NF-kappaB and AP-1 in Fas-dependent thymineless death of human colon carcinoma cells." **J Biol Chem**, 275: 10023-10029.
154. KASIBHATLA, S, GENESTIER, L, GREEN, DR. (1999). "Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB." **J Biol Chem**, 274: 987-992.

155. HOLTZ-HEPPELMANN, CJ, ALGECIRAS, A, BADLEY, A,D, PAYA, CV. (1998). "Transcriptional regulation of the human FasL promoter-enhancer region." **J Biol Chem**, 273: 4416-4423.
156. NORIAN, LA, LATINIS, K,M, KORETZKY, G,A, (1998). "A newly identified response element in the CD95 ligand promoter contributes to optimal inducibility in activated T lymphocytes." **J Immunol**, 161: 1078-1082.
157. MITTELSTADT, PR & ASHWELL, JD (1999). "Role of Egr-2 in up-regulation of Fas ligand in normal T cells and aberrant double-negative lpr and gld T cells." **J Biol Chem**, 274: 3222-3227.
158. BAUMANN, S, HESS, J, EICHHORST, S,T, KRUEGER, A, ANGEL, P, KRAMMER, PH, KIRCHHOFF, S (2003). „An unexpected role for FosB in activation-induced cell death of T cells." **Oncogene**, 22: 1333-1339.
159. SHI, Y, GLYNN, JM, GUILBERT, LJ, COTTER, TG, BISSONNETTE, RP, GREEN, DR (1992). "Role for c-myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas." **Science**, 257: 212-214.
160. RUNET, A, BONNI, A, ZIGMOND, MJ, LIN, MZ, JUO, P, HU, LS, ANDERSON, MJ, ARDEN, KC, BLENIS, J, GREENBERG, ME (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." **Cell**, 96: 857-868.
161. SANDSTROM PA, MANNIE MD, BUTTKE TM. (1994) "Inhibition of activation-induced death in T cell hybridomas by thiol antioxidants: oxidative stress as a mediator of apoptosi." **J Leukoc Biol.**, 163.;55(2):221-6.

162. CUI, H, SHERR, DH, EL-KHATIB, M, MATSUI, K, PANKA, DJ, MARSHAK-ROTHSTEIN, A, JU, ST. (1996). "Regulation of T-cell death genes: selective inhibition of FasL- but not Fas-mediated function." **Cell Immunol**, 167: 276-284.
163. POEGGELER B, THUERMANN S, DOSE A, SCHOENKE M, BURKHARDT S, HARDELAND R. (2002). "Melatonin's unique radical scavenging properties - roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs." **J Pineal Res**, 33(1):20-30.
164. JUKNAT AA, MENDEZ MDEL V, QUAGLINO A, FAMELI CI, MENA M, KOTLER ML. (2005). "Melatonin prevents hydrogen peroxide-induced Bax expression in cultured rat astrocytes." **J Pineal Res**, 38(2):84-92.
165. JANG MH, JUNG SB, LEE MH, KIM CJ, OH YT, KANG I, KIM J, KIM EH. (2005). "Melatonin attenuates amyloid beta25-35-induced apoptosis in mouse microglial BV2 cells." **Neurosci Lett**, 20-27;380(1-2):26-31. Epub 2005 Jan 25.
166. ZACHWIEJA J, ZANIEW M, BOBKOWSKI W, STEFANIAK E, WARZYWODA A, OSTALSKA-NOWICKA D, DOBROWOLSKA-ZACHWIEJA A, LEWANDOWSKA-STACHOWIAK M. (2005). "Beneficial in vitro effect of N-acetyl-cysteine on oxidative stress and apoptosis." **Pediatr Nephrol**, 20(6):725-31.
167. SANDSTROM, PA, MANNIE, MD, BUTTKE, TM. (1994). "Inhibition of activation-induced death in T cell hybridomas by thiol antioxidants: oxidative stress as a mediator of apoptosis." **J Leukoc Biol**, 55: 221-226.
168. ALLAN, IM, LUNEC, J, SALMON, M, BACON, PA. (1987). "Reactive oxygen species selectively deplete normal T lymphocytes via a hydroxyl radical dependent mechanism." **Scand J Immunol**, 26: 47-53.

169. SARIN A, ADAMS DH, HENKART PA, JONES DP, MAELLARO E, JIANG S, SLATER AF, ORRENIUS S. (1995). "Effects of N-acetyl-L-cysteine on T-cell apoptosis are not mediated by increased cellular glutathione." **Immunol Lett**, 45(3):205-9.
170. DEVADAS S, ZARITSKAYA L, RHEE SG, OBERLEY L, WILLIAMS MS. (2002). "Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation: selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression." **J Exp Med**, 195(1):59-70.
171. WILLIAMS MS, HENKART PA. (1996). "Role of reactive oxygen intermediates in TCR-induced death of T cell blasts and hybridomas." **J Immunol**, 157(6):2395-402.
172. MUSCHEL RJ, BERNHARD EJ, GARZA L, MCKENNA WG, KOCH CJ. (1995). "Induction of apoptosis at different oxygen tensions: evidence that oxygen radicals do not mediate apoptotic signaling." **Cancer Res**, 55(5):995-8.
173. JACOBSON MD, RAFF MC. (1995). "Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen." **Nature**, 374(6525):814-6.
174. HUG H, ENARI M, NAGATA S. (1994). "No requirement of reactive oxygen intermediates in Fas-mediated apoptosis." **FEBS Lett**, 351(3):311-3.
175. YAN CY, FERRARI G, GREENE LA. (1995). "N-acetylcysteine (D- and L-stereoisomers) prevents apoptotic death of neuronal cells." **J Neurosci**, 15(4):2857-66.
176. HILDEMAN DA, MITCHELL T, KAPPLER J, MARRACK P. (2003). "Cell apoptosis and reactive oxygen species." **J Clin Invest**, 111(5):575-81.

177. ROCHA, S, GARRETT, MD, CAMPBELL, KJ, SCHUMM, K, PERKINS, ND. (2005). "Regulation of NF-kappaB and p53 through activation of ATR and Chk1 by the ARF tumour suppressor." **Embo J**, 24: 1157-1169.
178. RIVERA-WALSH I, CVIJIC ME, XIAO G, SUN SC. (2000) "The NF-kappa B signaling pathway is not required for Fas ligand gene induction but mediates protection from activation-induced cell death." **J Biol Chem**, 18;275(33):25222-30.
179. BARKETT M, GILMORE TD. (1999). "Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors." **Oncogene**, 22;18(49):6910-24.
180. BENI SM, KOHEN R, REITER RJ, TAN DX, SHOHAMI E. (2004) "Melatonin-induced neuroprotection after closed head injury is associated with increased brain antioxidants and attenuated late-phase activation of NF-kappaB and AP-1." **FASEB J**. 18(1):149-51.
181. JANG MH, JUNG SB, LEE MH, KIM CJ, OH YT, KANG I, KIM J, KIM EH. (2005). "Melatonin attenuates amyloid beta25-35-induced apoptosis in mouse microglial BV2 cells." **Neurosci Lett**. 20-27;380(1-2).
182. CHETSAWANG B, PUTTHAPRASART C, PHANSUWAN-PUJITO P, GOVITRAPONG P. (2006) "Melatonin protects against hydrogen peroxide-induced cell death signaling in SH-SY5Y cultured cells: involvement of nuclear factor kappa B, Bax and Bcl-2." **J Pineal Res**. 41(2):116-23.
183. HOLTZ-HEPPELMANN CJ, ALGECIRAS A, BADLEY AD, PAYA CV. (1998) "Transcriptional regulation of the human FasL promoter-enhancer region." **J Biol Chem**. 273(8):4416-23.

184. HODGE MR, RANGER AM, CHARLES DE LA BROUSSE F, HOEY T, GRUSBY MJ, GLIMCHER LH. (1996). "Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice." **Immunity**. **4**(4):397-405.
185. MACIAN F, GARCIA-RODRIGUEZ C, RAO A. (2000) "Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun." **EMBO J**. **19**(17):4783-95.
186. RENGARAJAN J, MITTELSTADT PR, MAGES HW, GERTH AJ, KROCZEK RA, ASHWELL JD, GLIMCHER LH.(2000) "Sequential involvement of NFAT and Egr transcription factors in FasL regulation." **Immunity**. **12**(3):293-300.
187. LI-WEBER M, LAUR O, HEKELE A, COY J, WALCZAK H, KRAMMER PH.(1998) A regulatory element in the CD95 (APO-1/Fas) ligand promoter is essential for responsiveness to TCR-mediated activation. **Eur J Immunol**. **28**(8):2373-83.
188. LI-WEBER M, LAUR O, KRAMMER PH.(1999). Novel Egr/NF-AT composite sites mediate activation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand promoter in response to T cell stimulation. **Eur J Immunol**. **29**(9):3017-27.
189. DZIALO-HATTON R, MILBRANDT J, (2001) HOCKETT RD JR, WEAVER CT. Differential expression of Fas ligand in Th1 and Th2 cells is regulated by early growth response gene and NF-AT family members. **J Immunol**. **66**(7):4534-42. [Click here to read.](#)
190. SRIVASTAVA RK, SASAKI CY, HARDWICK JM, LONGO DL. (1999) "Bcl-2-mediated drug resistance: inhibition of apoptosis by blocking nuclear factor of

- activated T lymphocytes (NFAT)-induced Fas ligand transcription.” **J Exp Med.** **19**;190(2):253-65.
191. FURUKE K, SHIRAISHI M, MOSTOWSKI HS, BLOOM ET. (1999). “Fas ligand induction in human NK cells is regulated by redox through a calcineurin-nuclear factors of activated T cell-dependent pathway.” **J Immunol.** **15**;162(4):1988-93.
192. DAI J, INSCHO EW, YUAN L, HILL SM. (2002) “Modulation of intracellular calcium and calmodulin by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells.” **J Pineal Res.** **32**(2):112-9. Click here to read
193. KORTVELY E, GULYA K. (2004) “Calmodulin, and various ways to regulate its activity.” **Life Sci.** **16**;74(9):1065-70.
194. BENITEZ-KING G, HUERTO-DELGADILLO L, ANTON-TAY F. (1991) “Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro.” **Brain Res.** **23**;557(1-2).
195. BENITEZ-KING G, RIOS A, MARTINEZ A, ANTON-TAY F. (1996) “In vitro inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin”. **Biochim Biophys Acta.** **4**;1290(2):191-6.
196. DE ALMEIDA-PAULA LD, COSTA-LOTUFO LV, SILVA FERREIRA Z, MONTEIRO AE, ISOLDI MC, GODINHO RO, MARKUS RP. (2005) “Melatonin modulates rat myotube-acetylcholine receptors by inhibiting calmodulin.” **Eur J Pharmacol.** **21**;525(1-3).
197. POZO D, REITER RJ, CALVO JR, GUERRERO JM. (1994) “Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum.” **Life Sci.** **55**(24):PL455-60.

198. POZO D, REITER RJ, CALVO JR, GUERRERO JM. (1997) "Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin." **J Cell Biochem.** **65**(3):430-42.
199. LEON J, MACIAS M, ESCAMES G, CAMACHO E, KHALDY H, MARTIN M, ESPINOSA A, GALLO MA, ACUNA-CASTROVIEJO D.(2000) Structure-related inhibition of calmodulin-dependent neuronal nitric-oxide synthase activity by melatonin and synthetic kynurenines. **Mol Pharmacol.** **58**(5):967-75.
200. ENTRENA A, CAMACHO ME, CARRION MD, LOPEZ-CARA LC, VELASCO G, LEON J, ESCAMES G, ACUNA-CASTROVIEJO D, TAPIAS V, GALLO MA, VIVO A, ESPINOSA A. (2005) "Kynurenamines as neural nitric oxide synthase inhibitors." **J Med Chem.** **48**(26):8174-81.
201. LEON J, VIVES F, CRESPO E, CAMACHO E, ESPINOSA A, GALLO MA, ESCAMES G, ACUNA-CASTROVIEJO D.(1998) "Modification of nitric oxide synthase activity and neuronal response in rat striatum by melatonin and kynurenine derivatives." **J Neuroendocrinol.** **10**(4):297-302.
202. LEON J, ESCAMES G, RODRIGUEZ MI, LOPEZ LC, TAPIAS V, ENTRENA A, CAMACHO E, CARRION MD, GALLO MA, ESPINOSA A, TAN DX, REITER RJ, ACUNA-CASTROVIEJO D. (2006) "Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity by N1-acetyl-5-methoxykynuramine, a brain metabolite of melatonin." **J Neurochem.;** **98**(6):2023-33.
203. SAENZ DA, TURJANSKI AG, SACCA GB, MARTI M, DOCTOROVICH F, SARMIENTO MI, ESTRIN DA, ROSENSTEIN RE. (2002) "Physiological

concentrations of melatonin inhibit the nitridergic pathway in the Syrian hamster retina." **J Pineal Res.** **33**(1):31-6.

204. BLASK DE, SAUER LA, DAUCHY RT. (2002) "Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy." **Curr Top Med Chem.** **2**(2):113-32.
205. BRZEZINSKI A, VANGEL MG, WURTMAN RJ, NORRIE G, ZHDANOVA I, BENSHUSHAN A, FORD I. (2005) "Effects of exogenous melatonin on sleep: a meta-analysis." **Sleep Med Rev.** **9**(1):41-50.

Anexo

Lymphocyte anergy induced by tryptophan and melatonin metabolites

Alziana Pedrosa, Sandro R. Almeida, Gustavo P. Amarante-Mendes and Ana Campa.
(Trabalho científico em fase de revisão)

J. Leukocyte Biology

Lymphocyte anergy induced by tryptophan and melatonin metabolites

Alziana M.C. Pedrosa¹, Sandro R. Almeida¹, Gustavo P. Amarante-Mendes^{2,3} and Ana Campa¹

¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,

²Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brasil, and ³Instituto de Investigação em Imunologia, Instituto do Milênio, Brasil.

Running Title: Effect of tryptophan and melatonin on lymphocytes

Correspondence: Ana Campa
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Universidade de São Paulo
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 17
São Paulo – CEP 05508-900
SP – Brazil
Phone (55-11)3091-3741
Fax (55-11) 3813-2197
E-mail: anacampa@usp.br

KEY WORDS: indoleamine dioxygenase, interferon-gamma, kynurenines, myeloperoxidase

INTRODUCTION

Stimulation of human responsive cells by gamma inteferon (IFN- γ) leads to the induction or up-regulation of the enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in macrophages and dendritic cells [1,2]. IDO is the rate-limiting enzyme in the kynurenine pathway of tryptophan metabolism [3]. Tryptophan catabolism via the IDO pathway yields *N*-formylkynurenine (NFK), which is quickly deformylated to kynurenine (KYN) and depending on the cell type is further metabolized to various biological active and toxic derivatives, such as anthranilic and quinolinic acid [4]. *In vivo*, signs of increased IDO activity correlate with plasma tryptophan depletion and kynurenine formation or increased kynurenine/tryptophan ratios [5,6]. IDO can also be induced by LPS, IFN- α , or other agents [7-9] however IFN- γ has been recognized as the most prominent IDO inducer [10].

The effector mechanism of IFN- γ has been established to comprise IDO activity. In a general point of view, IDO activation is considered to be defense mechanism of macrophages, natural killer cells and other cell types against several intracellular and extracellular pathogens [11] and tumor cells [12]. Thus, presumably, IDO restrict the growth of pathogens by decreasing the availability of *L*-tryptophan, which is an essential amino acid for protein synthesis.

Besides tryptophan deprivation, the biologically active compounds formed by the IDO activity have been suggested to be involved in immunoregulation [13]. Metabolites of the indole degradation pathway regulated by IDO induction have been categorized as antioxidants [14], inhibitors of lymphocyte proliferation [15] and inducers of apoptosis [16]. That IDO serves immunoregulatory and tolerogenic functions is supported by the link between the expression of IDO in antigen presenting cells (APCs) [17] and the regulation of T-cell proliferation and other biological responses [18]. The IDO overexpression results in immunesuppression and reduced T-cell responses [19].

As IFN- γ is a key cytokine in controlling tryptophan metabolism, we wondered whether there is an immunoregulatory control of the tryptophan metabolite kynurenine on IFN- γ production. Therefore, we assessed the biological potential of kynurenine on controlling IFN- γ production, as well as other cytokines that contributes to IFN- γ production, such as IL-2, IL-10 and IL-12 in peripheral human blood mononuclear cells (PBMC).

Furthermore because tryptophan is also a precursor of the synthesis of biologically active indolic compounds, among them melatonin (MEL), and because recently we described that the analogous of NFK and KYN originated from myeloperoxidase-catalyzed melatonin oxidation, *N*¹-acetyl-*N*²-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and *N*¹-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), respectively, have a strong inhibitory effect on the neutrophil production of pro-inflammatory cytokines [20], we also analyze the effect of MEL, AFMK and AMK on lymphocyte proliferation and cytokines production in order to established a comparative effect with kynurenine (see structures in Figure 1). The biological consequences of tryptophan metabolism in immune regulation are discussed in this study.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Melatonin, DL-kynurenine, RPMI-1640 medium supplemented with HEPES and L-glutamine (R-4130), penicillin, streptomycin, Histopaque®, Lypopolysaccharide (*Escherichia coli* 026:B6), and propidium iodide were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Fetal bovine serum (FCS) and phytohemagglutinin (PHA) were obtained from Gibco (Rockville, MD, USA). Human recombinant IFN- γ was obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN). Hydrogen peroxide 30%, dichloromethane, acetonitrile and ethanol were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Triton X-100 was purchased from Amersham Pharmacia Biotech. Stock solutions (10mM) of KYN, AFMK and AMK were prepared in PBS and stock solution of MEL (10mM) was prepared in 10% ethanol.

AFMK and AMK synthesis and purification

AFMK and AMK were synthesized from the oxidation of melatonin by H₂O₂ as previously described [21]. The products were purified by HPLC SHIMADZU SCL-10A VP system coupled to FRC-10A fraction collector and UV-VIS detector (254nm). The chromatographic analyses were carried out on a C18 Shimadzu Shim-pack preparative column, using acetonitrile: H₂O (25:75) as the mobile phase in the isocratic mode at a flow rate of 10 mL/min. The purified products (AFMK and AMK) were dried under vacuum (Speed Vac – Savant- NY, USA) and redissolved in a small volume of water and analyzed by high performance liquid chromatograph (HPLC). The identity was confirmed by LC-MS.

Isolation and culture of PBMC

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from venous blood obtained from health volunteers by centrifugation over Ficoll-Hypaque gradient [22]. PBMCs (1.5×10^6 viable cells/mL) were suspended in RPMI 1640 medium supplemented with 10 mM HEPES, 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin and cultured in 96-

well microtiter plates in the presence of PHA plus KYN, MEL, AFMK or AMK (1nM - 1 mM) at 37 °C for 72 hours in 5% CO₂ humidified atmosphere.

PBMC were recovered for proliferation and apoptosis assays. The supernatants were collected and store immediately at -20 °C before uptaking assay. Cytokines were determined in the supernatants of 12 or 72 hours cultures.

Proliferation assay

PBMCs were cultured as described above and then pulsed for 16 hours with [³H]thymidine (1 µCi/well). Subsequently, the cells were harvested on glass fiber filters by an automated cell harvester (LKB Wallac 1295-001,Wallac, Finland), and radioactivity was measured by liquid scintillation counting. Data were expressed as individual mean counts per minute (cpm) divided by mean background cpm to give stimulation indices. Stimulation indices were then converted to a percentage response, relative to the response of purified PBMCs to PHA alone, which was defined as 100 percent.

Apoptosis assay

For the apoptosis analyses, the cells were collected, fixed and stained for 2 hours with propidium iodide (PI) staining solution (50 µg/mL PI), 0,1% Triton X-100 and 0,1% sodium citrate). The samples were analyzed by FACScalibur (Becton-Dickinson, San Jose, CA,USA). DNA fragmentation was quantified by cell cycle analysis of total DNA content as described by Nicoletti et al. [23]. Acquisition and analysis were performed with cell Quest software (Becton-Dickinson) and the results represents the percentage of the cells gates in the region correspond to sub-G1 phase (fractional DNA content).Samples were run in triplicate and the results expressed as mean ± s.d.

Cytokine Assay

IL-2, IFN- γ , IL-10 and IL-12 concentration in the cell free supernatants were determined by specific ELISA Kits according to the manufactures guidelines (Quantikine, R&D System, Minneapolis, MN).

Statistical Analysis

Comparisons were done by the one way analysis of variance (ANOVA) and the Dunnett Multiple Comparisons Test. Results are expressed as means $\pm$ standard errors (SE) of at least three independent experiments.

RESULTS

After 72 hours of culture, T-cell activation was obtained by addition of PHA. The mitogen agent PHA is a lectin that cross-links human T cells surface molecules and is frequently used in experimental immunology to study T cell activation. Here, PBMC cultures were stimulated with PHA (2 μ g/mL) the culture wells. This concentration of PHA is enough to achieve cell proliferation, IL-2, IL-10 and FN- γ production. KYN, at 10^{-3} M, inhibits PHA-induced IL-2 production measured in 12 h cultures (Figure 2 A), however it did not altered T-cell proliferation checked after 72 h cultures (Figure 3 A). MEL and its metabolites, AFMK and AMK, inhibited at the same intensity observed for KYN the PHA-induced IL-2 production (Figures 2 B-D). When we tested the effects of MEL, AFMK and AMK, we observed that all these three compounds seem to be more efficient than KYN in inhibit PBMC proliferation. At 10^{-3} M, MEL, AFMK and AMK inhibit 24, 46 and 38% of PBMC proliferation, respectively (Figures 3 B-D).

At the same experimental conditions and time of culture used to determine cell proliferation, KYN showed to inhibit IFN- γ production. This inhibition is observed from 10^{-5} M and reaches more than 60% inhibition at 10^{-3} M (Figure 4A). As well as occurred with KYN, the inhibition of IFN- γ production was also observed in the presence of MEL, AFMK and AMK (Figures 4 B-D). Comparing all the compounds, AFMK was the most effective inhibitor of IFN- γ once inhibition could be detected at 10^{-6} M. The effect of MEL, AFMK and AMK on cell proliferation (Figure 3B-D) was not enough to explain the inhibition of IFN- γ , given that the effect on IFN- γ

production was observed at lower concentrations than those needed to interfere with cell proliferation. For any of these compounds, we did not observe an inhibition in cell viability (Figure 5).

Because IL-12 is the major stimulator of IFN- γ production by T cells and IL-10 is an important inhibitor of IFN- γ production [24], we verified the effect of KYN, MEL, AFMK and AMK on the production of these two cytokines. Because PHA is not a good inducer of IL-12, for this cytokine we have LPS (1 μ g/mL) plus IFN- γ (1000 ng/mL) as stimulant. We did not observe a significant inhibition of IL-12 by all the compounds assayed in the range of concentration that inhibited IFN- γ (Figure 6). The production of interleukin-10 (IL-10) was followed in PHA-treated PBMC at 12, 24, 48 and 72 h. The production of IL-10 was not affected by any of the compounds (Figure 7). Thus, the effect of KYN, MEL, AFMK and AMK inhibiting IFN- γ production did correlate to the decreased production of IL-12 or increase in IL-10.

DISCUSSION

The metabolization of tryptophan is a key process in the inhibition of T-cell proliferation [25] and we described here complementary effects that shown that in conditions in which kynurenine - the first metabolite originated from tryptophan metabolism - does not affect proliferation and apoptosis of PBMC, it inhibits IFN- γ production (see figures 2-4). At 10 μ M and 1000 μ M, kynurenine inhibits 25% and 74% of the IFN- γ production in PBMC, respectively. The inhibition of IFN- γ induced by kynurenine is not mediated by increasing in IL-10 or decreasing of IL-12, because none of these two cytokines are affected by kynurenine even at the higher concentration assayed (1000 μ M).

Biological effects deriving from tryptophan oxidized products have gained increasing attention after the discovery that IDO activity protects fetal allografts from maternal T cell-mediated immunity [26]. Thereafter several studies added new insights on the IDO role in immune responses such as maintenance of T-cell homeostasis and tolerance [27-29]. Different cellular types shown different grades of susceptibility to kynurenines pathway metabolites, for instance, B lymphocyte and NK cells are more susceptible to apoptosis than mononuclear cells [15]. The reasons for the diversity in responses to IDO up-regulation are not completely understood but a recent study suggested that the IFN- γ induced tryptophanyl-tRNA- synthase in IDO resistant cells would provide a mechanism to protect tryptophan degradation and depletion [30].

Most of the toxic effects induced by IDO seem to be related to advance end products from tryptophan metabolism, such as 3HAA and QUIN [31]. Although kynurenine is the first and main product of tryptophan metabolization, studies involving the biological effects of kynurenine are limited. The knowledge of biological activities of Kynurenine are important specially if one consider that: (i) most of the cells in the body do not have the biochemical machinery need for further kynurenine metabolization [19] and and (ii) different stimuli or combination of them, may differently regulate the enzymes involved in the kynurenines pathway. The tryptophan oxidation catalyzed by IDO is considered to be a mechanism of homeostasis control though the death of T-lymphocytes [32]. In this manner, tolerance and autoimmunity are regulated by a mechanism of depletion. In this study we described an additional feature originated from IDO-catalyzed reaction products on immune regulation that not include depletion but suggest anergy (Figure 8). This effect could contribute to a mechanism to self-limit

the activation of monocytes by activating T cells expressing IFN- γ , providing a negative feedback loop maintained by kynurenine (Figure (9))

Although the axis IFN- γ - IDO - tryptophan oxidation has been amply considered in immunosuppression, he showed here that, melatonin and its oxidation products also have an activity similar to those observed to kynurenin. Melatonin, AFMK and AMK also inhibited IFN- γ production in a pathway that did not included the mediation of IL-12 or IL-10 (see figures 3,5 and 6).

It merits attention the fact that IFN- γ inhibits the formation of melatonin by resident peritoneal macrophages [33] and the degradation of melatonin and synthesis of AFMK occurs in neutrophils and monocyte/macrophage in a way dependent on MPO and independent on IFN- γ and consequently independent on IDO [34]. Indeed, recently it was suggested that melatonin, on the contrary of it was previously supposed is not a substrate of IDO [35]. Therefore successful IFN- γ inhibition may, in some cases, be performed under conditions that did not activate IDO pathway. IFN- γ is produced predominantly by T cells and NK cells on their stimulation with antigens or mitogens, but a detailed regulatory mechanism for IFN- γ production *in vivo* has not been fully worked out. Although IL-12 was shown to be the major stimulator of IFN- γ production by T cells and IL-10 one of the main inhibitor of IFN synthesis [36] we showed here a control independent of these two cytokines.

One possible mechanism by which KYN, AFMK and AMK inhibit IFN- γ production may be centered in the antioxidant properties of these compounds [37,38]. The production of IFN- γ seems to be susceptible to the presence of antioxidants [39]. It is possible that these compounds act modifying the cellular redox state that, at last, leads to a decrease in IFN- γ production. This is consistent with the activation of signaling pathways important in inflammation by ROS, for instance, with the general mechanism of NF- κ B and AP-1 activation [40].

Although previous studies from others have indicated a stimulatory effect of melatonin on T cells and monocytes [41,42] in our study we have found an inhibitory effect. In these cases these stimulatory effects occur via a direct action of melatonin receptors. The possible reasons for the contradictory effects among our study and the others are: (i) the low concentration of MEL used [43], (ii) PBMC were either not activated or only slightly activated [44], (iii) different types of stimuli were used [45], and (iv) the endogenous synthesis of MLT was inhibited before the

addition of exogenous melatonin [46]. In our case the concentrations of MEL were higher and the cells were fully activated.

The physiological plasma concentration of KYN and MLT reaches 1-3 and 1-300 μM , respectively [47,48]. Although these concentrations are low comparing with the concentration that we showed here to be active PBMC, it do not exclude the existence of high levels of these compounds at defined local and intracellular sites, as well as, in some pathological condition. Increased production of KYN is observed, for instance, in AIDS where the serum concentration of kynurenine almost doubled [49]. Furthermore, it is known that, in vitro, macrophages and dendritic cells are able to synthesized high amounts of kynurenine [2]. The same is true for MEL [50]. Although in mammals, melatonin is produced predominantly in the pineal gland, extrapineal synthesis of MLT is described in several tissues and cell types. From these, PBMC are very effective in MEL synthesis [51] and AFMK is found in relative high concentrations in CSF in disease [52].

IFN- γ has a central role in host defenses, in both innate and acquired immunity and in general, it stimulates the development and function of immune effector cells [53]. It is, on the other hand, intimately involved in the pathogenesis of several diseases such as septic shock [54] or some types of autoimmune disease [55]. Thus, the production of KYN, MEL and its oxidation products may contribute to counteract decontrolled IFN- activation. Concluding we consider that the ability of PBMC cells to convert tryptophan to melatonin has not been sufficiently explored in the discussion about the mechanisms of immunoregulation. Here, we showed that KYN has as important effect in controlling IFN- γ production and that melatonin and its metabolites have also immunomodulatory activities similar to KYN. It is important because IFN- γ dependent and independent infections may have the possibility to control lymphocyte by kynurenins and kynurenins-like compounds.

Acknowledgments: This study was supported by Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Cooedenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) and Conselho nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

REFERENCES

- [1] Munn, D.H., Shafizadeh, E., Attwood, J.T., Bondarev, I., Pashine, A., Mellor, A.L. (1999) Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. [J Exp Med](#). 189, 1363-72.
- [2] Hwu, P., Du, M.X., Lapointe, R., Do, M., Taylor, M.W., Young, H.A. (2000) Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. [J Immunol](#). 164, 3596-9.
- [3] Taylor, M.W., Feng, G.S. (1991) Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. [FASEB J](#). 11, 2516-22.
- [4] [Belladonna, M.L.](#), [Grohmann, U.](#), [Guidetti, P.](#), [Volpi, C.](#), [Bianchi, R.](#), [Fioretti, M.C.](#), [Schwarcz, R.](#), [Fallarino, F.](#), [Puccetti, P.](#) (2006) Kynurenine pathway enzymes in dendritic cells initiate tolerogenesis in the absence of functional IDO. [J Immunol](#). 177, 130-7.
- [5] Schrocksnadel, K., Widner, B., Bergant, A., Neurauter, G., Schrocksnadel, H., Fuchs, D. (2003) Tryptophan degradation during and after gestation. [Adv Exp Med Biol](#). 527, 77-83.
- [6] Widner, B., Leblhuber, F., Walli, J., Tilz, G.P., Demel, U., Fuchs, D. (2000) Tryptophan degradation and immune activation in Alzheimer's disease. [J Neural Transm](#). 107, 343-53.
- [7] Yoshida, R., Hayaishi, O. (1978) Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by intraperitoneal injection of bacterial lipopolysaccharide. *Proc. natl Acad. Sci. USA*. 75, 3998-4000.
- [8] Hassanain, H.H., Chon, S.Y., Gupta, S.L. (1993) Differential regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression by interferons-gamma and -alpha. Analysis of the regulatory region of the gene and identification of an interferon-gamma-inducible DNA-binding factor. *J Biol Chem*. 268, 5077-84.
- [9] Carlin, J.M., Borden, E.C., Sondel, P.M., Byrne, G.I. (1987) Biologic-response-modifier-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human peripheral blood mononuclear cell cultures. [J Immunol](#). 139, 2414- 8.
- [10] [Orabona, C.](#), [Puccetti, P.](#), [Vacca, C.](#), [Bicciato, S.](#), [Luchini, A.](#), [Fallarino, F.](#), [Bianchi, R.](#), [Velardi, E.](#), [Perruccio, K.](#), [Velardi, A.](#), [Bronte, V.](#), [Fioretti, M.C.](#), [Grohmann, U.](#) (2006) Toward the identification of a tolerogenic signature in IDO-competent dendritic cells. [Blood](#). 107, 2846-54.
- [11] Fujigaki, S., Saito, K., Takemura, M., Maekawa, N., Yamada, Y., Wada, H., Seishima, M. (2002) L-tryptophan-L-kynurenine pathway metabolism accelerated by *Toxoplasma gondii* infection is abolished in gamma interferon-gene-deficient mice: cross-regulation between inducible nitric oxide synthase and indoleamine-2,3-dioxygenase. [Infect Immun](#). 70, 779-86.

- [12] Kai, S., Goto, S., Tahara, K., Sasaki, A., Tone, S., Kitano, S. Indoleamine 2,3-dioxygenase is necessary for cytolytic activity of natural killer cells. (2004) *Scand J Immunol.* 59, 177-82.
- [13] Frumento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, G., Benatti, U., Ferrara, GB.(2002) Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med.* 196, 459-68.
- [14] Goda, K., Hamane, Y., Kishimoto, R., Ogishi, Y. (1999) Radical scavenging properties of tryptophan metabolites. Estimation of their radical reactivity. *Adv Exp Med Biol.* 467. 397-402.
- [15] Terness, P., Bauer, T.M., Rose, L., Dufter, C., Watzlik, A., Simon, H., Opelz G. (2002) Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. [J Exp Med.](#) 196,447-57.
- [16] Fallarino, F., Grohmann, U., Vacca, C., Bianchi, R., Orabona, C., Spreca, A., Fioretti, M.C., Puccetti, P. (2002) T cell apoptosis by tryptophan catabolism. [Cell Death Differ.](#) 9, 1069-77.
- [17] Grohmann, U., Fallarino, F., Puccetti, P. (2003) Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol.* 24, 242-8
- [18] Mellor, A.L., Keskin, D.B., Johnson, T., Chandler, P., Munn, D.H. Cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase inhibit T cell responses. [J Immunol.](#) 168,3771-6
- [19] Moffett, J.R., Namboodir, M.A. Tryptophan and the immune response. (2003) [Immunol Cell Biol.](#) 81, 247-65.
- [20] Silva, S.O., Rodrigues, M.R., Ximenes, V.F., Bueno-da-Silva, A.E., Amarante-Mendes, G.P., Campa, A. (2004) Neutrophils as a specific target for melatonin and kynuramines: effects on cytokine release. [J Neuroimmunol.](#) 156, 146-52.
- [21] [Tan, D.X.](#), [Manchester, L.C.](#), [Reiter, R.J.](#), [Plummer, B.F.](#), [Limson, J.](#), [Weintraub, S.T.](#), [Qi, W.](#) (2000) Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. [Free Radic Biol Med.](#) 29, 1177-85.
- [22] [Boyum, A.](#) Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. (1976) [Scand J Immunol.](#) 5, 9-15.
- [23] Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F., Riccardi, C. (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods.* 139,271-9.
- [24] Okamura, H., Kashiwamura, S., Tsutsui, H., Yoshimoto, T., Nakanishi, K. (1998) Regulation of interferon- γ production by IL-12 and IL-18. *Current Opinion in Immunology.* 10, 259-284.

- [25] Mellor, A.L., Munn, D.H. (2004) IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. [Nat Rev Immunol](#). 4, 762-74.
- [26] [Munn, D.H.](#), [Zhou, M.](#), [Attwood, J.T.](#), [Bondarev, I.](#), [Conway, S.J.](#), [Marshall, B.](#), [Brown, C.](#), [Mellor, A.L.](#) (1998) Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. [Science](#). 281, 1191-3.
- [27] [Munn, D.H.](#), [Sharma, M.D.](#), [Baban, B.](#), [Harding, H.P.](#), [Zhang, Y.](#), [Ron, D.](#), [Mellor, A.L.](#) (2005) GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. [Immunity](#). 22, 633-42.
- [28] [Grohmann, U.](#), [Fallarino, F.](#), [Bianchi, R.](#), [Orabona, C.](#), [Fioretti, M.C.](#), [Puccetti, P.](#) (2003) A defect in tryptophan catabolism impairs tolerance in nonobese diabetic mice. [J Exp Med](#). 198, 153-60.
- [29] [Munn, D.H.](#) Indoleamine 2,3-dioxygenase, tumor-induced tolerance and counter-regulation. (2006) [Curr Opin Immunol](#). 18, 220-5.
- [30] Boasso, A., Herbeuval, J-P., Hardy, A.W., Winkler, C., Shearer Gene M. (2005) Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4⁺ T cells. [Blood](#) 105, 1574-1581.
- [31] [Stone, T.W.](#) (2001) Endogenous neurotoxins from tryptophan. [Toxicon](#). 39, 61-73.
- [32] [Fallarino, F.](#), [Grohmann, U.](#), [Vacca, C.](#), [Orabona, C.](#), [Spreca, A.](#), [Fioretti MC](#), [Puccetti P.](#) (2003) T cell apoptosis by kynurenines. [Adv Exp Med Biol](#). 527,183-90.
- [33] [Rodrigues, M.R.](#), [Rodriguez, D.](#), [Henrique Catalani, L.](#), [Russo, M.](#), [Campa, A.](#) (2003) Interferon-gamma independent oxidation of melatonin by macrophages. [J Pineal Res](#). 34, 69-74.
- [34] [Silva, S.O.](#), [Ximenes, V.F.](#), [Catalani, L.H.](#), [Campa, A.](#) (2000) Myeloperoxidase-catalyzed oxidation of melatonin by activated neutrophils. [Biochem Biophys Res Commun](#). 279, 657-62.
- [35] Ferry, G., Ubeaud, C., Lambert, P.H., Berti, S., Coge, F., Chomarat, P., Delagrance, .P, Serkiz, B., Bouchet, J.P., Truscott, R.J., Boutin, J.A. (2005) Molecular evidence that melatonin is enzymatically oxidized in a different manner than tryptophan: investigations with both indoleamine 2,3-dioxygenase and myeloperoxidase. [Biochem J](#). 388, 205-15.
- [36] Pestka, S., Krause, C. D., Sarkar, D., Walter, M. R., Shi, Y., Fisher, P.B. (2004) Interleukin-10 and Related Cytokines and Receptors. [Annual Review of Immunology](#). 22, 929-979.
- [37] Reiter, R.J, Tan, D.X., Cabrera, J., D'Arpa, D. (1999) Melatonin and tryptophan derivatives as free radical scavengers and antioxidants. [Adv Exp Med Biol](#). 467, 379-87
- [38] Ressmeyer, A.R., Mayo, J.C., Zelosko, V., Sainz, R.M., Tan, D.X., Poeggeler, B., Antolin, I., Zsizsik, B.K., Reiter, R.J., Hardeland, R. (2003) Antioxidant properties of the melatonin

metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. *Redox Rep.* 8, 205-13.

[39] Rachon, D., Rimoldi, G., Wuttke, W. (2006) In vitro effects of genistein and resveratrol on the production of interferon-gamma (IFN γ) and interleukin-10 (IL-10) by stimulated murine splenocytes. *Phytomedicine.* 13, 419-24.

[40] Michiels, C., Minet, E., Mottet, D., Raes, M. (2002) Regulation of gene expression by oxygen: NF-kappaB and HIF-1, two extremes. *Free Radic Biol Med.* 33, 1231-42.

[41] Kuhlwein, E., Irwin, M. (2001) Melatonin modulation of lymphocyte proliferation and Th1/Th2 cytokine expression. *J Neuroimmunol.* 117,51-7

[42] Morrey, K.M., McLachlan, J.A., Serkin, C.D., Bakouche, O. (1994) Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. *J Immunol.* 153, 2671-80.

[43] Arias J., Melean, E., Valero, N., Pons, H., Chacin-Bonilla, L., Larreal Y., Bonilla, E. (2003) Effect of melatonin on lymphocyte proliferation and production of interleukin-2 (IL-2) and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in mice splenocytes. *Invest Clin.* 44, 41-50.

[44] Garcia-Maurino, S., Gonzalez-Haba, M.G., Calvo, J.R., Rafii-El-Idrissi, M., Sanchez-Margalet, V., Goberna, R., Guerrero, J.M. (1997) Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN- γ production by human circulating CD4⁺ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes *J. Immunol* 159, 574-581.

[45] Garcia-Maurino, S., Pozo, D., Carrillo-Vico, A., Calvo, J.R., Guerrero, J.M.(1999) Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. *Life Sci.* 65, 2143-50.

[46] Carrillo-Vico, A., Lardone, P.J., Fernandez-Santos, J.M., Martin-Lacave, I., Calvo, J.R., Karasek, M., Guerrero, J.M. (2005) Human lymphocyte-synthesized melatonin is involved in the regulation of the interleukin-2/interleukin-2 receptor system. *J Clin Endocrinol Metab.* 90, 992-1000.

[47] Fujigaki, S., Saito, K., Takemura, M., Fujii, H., Wada, H., Noma, A., Seishima, M. (1997) Species differences in L-tryptophan-kynurenine pathway metabolism: quantification of anthranilic acid and its related enzymes. *Arch Biochem Biophys.* 358, 329-35.

[48] Pandi-Perumal, S.R., Srinivasan, V., Maestroni, G.J., Cardinali, D.P., Poeggeler, B., Hardeland, R. (2006) Melatonin. *FEBS J.* 273, 2813-38.

[49] Huengsber, M., Winer, J.B., Gompels, M., Round, R., Ross, J., Shahmanesh, M. (1998) Serum kynurenine-to-tryptophan ratio increases with progressive disease in HIV-infected patients. *Clin Chem.* 44, 858-62.

- [50] [Martins, E. Jr.](#), [Ferreira, A.C.](#), [Skorupa, A.L.](#), [Afeche, S.C.](#), [Cipolla-Neto, J.](#), [Costa Rosa, L. E.](#) (2004) Tryptophan consumption and indoleamines production by peritoneal cavity macrophages *J. Leukocyte Biol* 75, 1116-1121.
- [51] Carrillo-Vico, A., Calvo, J. R., Abreu, P., Lardone, P. J., Garcia-Maurino, S., Reiter, R. J., Guerrero, J. M. (2004) Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.* 18,537-539
- [52] Silva, S.O., Ximenes, V.F., Livramento, J.A., Catalani, L.H., Campa, A. (2005) High concentrations of the melatonin metabolite, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, in cerebrospinal fluid of patients with meningitis: a possible immunomodulatory mechanism. *J Pineal Res.* 39, 302-6.
- [53] Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A. (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukocyte Biology* 75: 163-189.
- [54] Goldmann, O., Chhatwal, G.S., Medina, E. (2005) Contribution of natural killer cells to the pathogenesis of septic shock induced by *Streptococcus pyogenes* in mice. *J Infect Dis.* 191, 1280-6.
- [55] Balasa, B., Deng C., Lee, J., Bradley, L.M., Dalton, D.K., Christadoss, .P, Sarvetnick, N. (1997) Interferon gamma (IFN-gamma) is necessary for the genesis of acetylcholine receptor-induced clinical experimental autoimmune myasthenia gravis in mice. *J Exp Med.* 186, :385-91

LEGENDS

Figure 1. Kynurenine pathway of tryptophan and melatonin metabolism.

NFK, *N*-formylkynurenine; KYN, *L*-kynurenine; AFMK, *N*¹-acetyl-*N*²-formyl-5-methoxykynuramine and AMK, *N*¹-acetyl-5-methoxykynuramine.

Figure 2. Effect of Kynurenine (A), Melatonin (B), AFMK (C) and AMK (D) on the release of IL-2 by PBMC. The cells (1.5×10^6 cells/ mL) were incubated with KYN, MEL, AFMK or AMK (10^{-6} , 10^{-4} and 10^{-3} M) in the presence of PHA. Cytokines were measured in 12 h culture supernatants by ELISA. Data are means $\pm$ SEM of three experiments.

Figure 3. Effect of Kynurenine (A), Melatonin (B), AFMK (C) and AMK (D) on mitogen (PHA)-induced lymphocyte proliferation. PBMC (1.5×10^6 cells/ mL) were incubated with KYN, melatonin, AFMK, or AMK (0.5; 0.75 and 1.0 mM) for 72 h. Lymphocyte proliferation was measured in cpm, converted to a stimulation index, the to a percent response, where response to PHA alone equals 100% response. Each cell culture was performed in triplicate and data are means $\pm$ SEM of seven experiments.

Figure 4. Effect of Kynurenine (A), Melatonin (B), AFMK (C) and AMK (D) on the release of IFN- γ by PBMC. The cells (1.5×10^6 cells/ mL) were incubated with KYN, MEL, AFMK or AMK (10^{-9} - 10^{-3} M) in the presence of PHA. Cytokines were measured in 72 h culture supernatants by ELISA. Data are means $\pm$ SEM of three experiments.

Figure 5. Effect of Kynurenine (A), Melatonin (B), AFMK (C) and AMK (D) on apoptosis. PBMC (1.5×10^6 cells/ mL) were incubated with KYN, MEL, AFMK or AMK (10^{-3} M) in the presence of PHA for 72 hours. DNA fragmentation were measured by flow cytometry. Data are means $\pm$ SEM of three experiments.

Figure 6. Effect of Kynurenine (A), Melatonin (B), AFMK (C) and AMK (D) on the release of IL-12 by PBMC. The cells (1.5×10^6 cells/ mL) were incubated with KYN, MEL, AFMK or AMK (10^{-9} - 10^{-3} M) in the presence of LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) and IFN- γ (1000 ng/mL). Cytokines were measured in 72 h culture supernatants by ELISA. Data are means $\pm$ SEM of three experiments.

Figure 7. Effect of Kynurenine (A), Melatonin (B), AFMK (C) and AMK (D) on the release of IL-10 by PBMC. The cells (1.5×10^6 cells/ mL) were incubated with KYN, MEL, AFMK or AMK (10^{-9} - 10^{-3} M) in the presence of PHA. Cytokines were measured in 72 h culture supernatants by ELISA. Data are means $\pm$ SEM of three experiments.

FIGURE 1

FIGURE 2

FIGURE 3

FIGURE 4

FIGURE 5

FIGURE 6

FIGURE 7

FIGURE 8