

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

Oxidação de melatonina e formação de N^1 -acetil- N^2 -formil-5-metoxiquinuramina: possíveis efeitos biológicos

Sueli de Oliveira Silva

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profa. Dra. Ana Campa

São Paulo
2005

Sueli de Oliveira Silva

Oxidação de melatonina e formação de N^1 -acetil- N^2 -formil-5-metoxiquinuramina: possíveis efeitos biológicos

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Ana Campa
orientador/presidente

Heraldo Possolo de Souza
1º. examinador

Luis Fernando Bicudo Pereira Costa Rosa
2º. examinador

Marisa Helena Gennari de Medeiros
3º. examinador

Ligia Ferreira Gomes
4º. examinador

São Paulo, 04 de março de 2005

As montanhas e vales, desertos e mares
Que atravesso me levam para perto de Ti.
Minhas provações não são maiores do que o meu Deus
E não vão me impedir de caminhar
Se diante de mim, não se abrir o mar
Deus vai me fazer andar por sobre as águas.
Vou lutar e vencer vou plantar e colher
A cada dia vou viver rompendo em fé.

"Ora, a fé é o firme fundamento das coisas que se esperam, e a prova das coisas que não se vêem".

Hebreus 11:1

Não é Prêmio Nobel, mas agiu de forma tal, se comportou como;

Não é mãe, mas agiu de forma tal, se comportou como;

Não é amiga íntima, mas agiu de forma tal, se comportou como;

OBRIGADA!!!!!!!

pela orientação,

pelo colo,

pelo ombro,

e principalmente por ter investido em mim.

À minha orientadora,
Prof^a Ana Campa, por ter confiado a
mim este trabalho e participado do meu crescimento
científico e pessoal de forma tão criativa e marcante.

Ao Sandro, pelo amor, carinho, paciência nas horas difíceis e
principalmente companhia nos momentos alegres.
Você é ESPECIAL, INCRÍVEL e LINDO DEMAIS!!!!!!

Aos meus pais, Alaide e Rosa, por terem investido e
sempre acreditado em mim.

VALEU!!!!!!

Agradecimentos

A Deus, por esta grande oportunidade;

À minha enorme família por me amar e me acolher sempre;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro;

Ao Prof Luiz Henrique Catalani, pela orientação técnico-científica;

Ao Prof. Dr. José Antônio Livramento junto ao Laboratório de Neurodiagnóstico Spina França por ceder as amostras de Liquor;

A minha amiga Alziana Pedrosa por ter perdido seu tempo, ou melhor, investido parte do seu precioso tempo em mim;

Aos amigos Valdecir Ximenes e Rita Rodrigues que estiveram presentes desde o início deste trabalho;

Aos amigos de laboratório: Cristiani Bürger, Sabrina Sayori, Elaine Hatanaka, Silvana Sandri, Alessandra Okino, Flavia Mamy, Flávia Garcia, Silene Migliorini pela ajuda e companhia;

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

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

MUITO OBRIGADA!!!!!!

Lista de Abreviaturas

- AFMK:** N^1 -acetil- N^2 -formil-5-metoxiquinuramina;
- AMK:** N^1 -acetil-5-metoxiquinuramina;
- BSA:** albumina de soro bovina;
- DMSO:** dimetil sulfóxido;
- DTNB:** 5,5'-ditiobis ácido 2-nitrobenzoico;
- ERO:** espécies reativas de oxigênio;
- ERN:** espécies reativas de nitrogênio;
- GM-CSF:** fator estimulador de colônia de granulócito e macrófago;
- G-CSF:** fator estimulador de colônia de granulócito;
- HFS:** solução fluorocrômica hipotônica;
- HPLC:** cromatografia líquida de alta performance;
- IDO:** indolamina-2,3-dioxigenase;
- IL-1:** interleucina-1;
- IL-1 β :** interleucina-1 β ;
- IL-6:** interleucina-6;
- IL-8:** interleucina-8;
- IL-2:** interleucina-2;
- LPS:** lipopolissacarídeo;
- MPO:** mieloperoxidase;
- nNOS:** óxido nítrico síntase neuronal;
- NF- κ B:** fator nuclear- κ B;
- PAF:** fator de ativação plaquetária;
- PBMC:** células mononucleares de sangue periférico;
- PBS:** tampão fosfato salino;
- PMA:** acetato de forbol miristato;
- TMB:** tetrametilbenzidina;
- TNB:** ácido 5-tio-2-nitrobenzoico;
- TNF- α :** fator de necrose tumoral- α ;

Resumo

Em trabalho anterior verificamos que neutrófilos oxidam o hormônio melatonina a N^1 -acetil- N^2 -formil-5-metoxiquinuramina (AFMK), numa reação catalisada por mieloperoxidase e dependente de ânion superóxido. Neste trabalho acompanhamos a cinética de formação de AFMK e de seu produto de deformilação N^1 -acetil-5-metoxiquinuramina (AMK) quando neutrófilos foram ativados por diferentes estímulos. No sentido de obtermos informações sobre a relevância biológica destas reações, avaliamos o efeito de melatonina, AFMK e AMK sobre a formação de HOCl, sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-8) e sobre a apoptose de neutrófilos. Uma forte inibição da liberação de HOCl foi observada em concentrações de melatonina igual ou superior a 0,05 mM. Embora menos efetivo, AMK também inibiu a formação de HOCl, enquanto AFMK não teve efeito. Adicionalmente mostramos que todos estes compostos inibiram a produção de TNF- α e IL-8 por neutrófilos ativados e que AFMK foi o mais potente deles. Por exemplo, enquanto 1 μ M de AFMK inibiu eficientemente a liberação de TNF- α , efeito similar foi obtido com melatonina apenas a partir de 1 mM. O mesmo padrão de resposta foi observado na morte celular. AFMK e AMK (1 mM), mas não melatonina, inibiram significativamente (aproximadamente 25%) a morte celular de neutrófilos. Nossos dados sugerem que neutrófilos são um alvo importante para AFMK e que a rota de metabolização da melatonina pode ser útil no controle da intensidade do processo inflamatório através do consumo de ERO, controle da liberação de citocinas e da sobrevivência dos neutrófilos. Este conjunto de dados associados com o fato de que células mononucleares ativadas sintetizam melatonina e que o foco inflamatório é uma fonte de espécies reativas de oxigênio (ERO), levou-nos a verificar se a oxidação de melatonina ocorreria *in vivo* em situações inflamatórias. Para isso, analisamos amostras de liquor de pacientes com meningite viral. AFMK foi detectado em 16 das 20 amostras de liquor de pacientes com meningite viral e em nenhuma das 8 amostras controle. Das 16 amostras nas quais AFMK foi detectado, ele pôde ser quantificado em 6 (concentrações variando de 50 a 500 nM). Adicionalmente analisamos a correlação entre a presença de AFMK com alguns parâmetros inflamatórios como: celularidade, concentração de proteínas totais, TNF- α , IL-8 e IL-1 β . Verificamos que todos estes parâmetros diminuíram nas amostras de liquor onde a concentração de AFMK era maior. Em conjunto, nossos resultados mostram que

pelo menos parte dos efeitos antiinflamatórios descritos para melatonina pode ser originado da ação de seus produtos de oxidação. Nossos resultados contribuem significativamente para a compreensão do papel biológico da melatonina e seus produtos de oxidação na imunomodulação durante a inflamação.

Abstract

In a previous study we described that activated neutrophils are able to oxidize the pineal hormone melatonin to *N*¹-acetyl-*N*²-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) in a reaction dependent on myeloperoxidase and superoxide anion. Here we followed the formation of AFMK and its deformedylated product *N*¹-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK) when neutrophils were activated by different stimuli. The biological significance of this reaction has been one of our research interests, therefore we study the effect of melatonin, AFMK and AMK on the HOCl formation, on the release of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-8) and on the apoptosis process. Melatonin caused an almost complete inhibition of HOCl formation at concentrations up to 0.05 mM. Although less effective, AMK also inhibited HOCl formation, while AFMK had no effect. Additionally all the compounds assayed efficiently inhibited the production of TNF- α and IL-8 by activated neutrophils. Moreover, the inhibitory activity of AFMK was stronger than that of melatonin and could be observed already at 1 μ M. A significant inhibition of neutrophil death (approximately 25 %) was triggered by AFMK and AMK (1 mM) but not by melatonin. Our data suggest that neutrophils are an important target for AFMK and that the route of melatonin metabolism may be useful in controlling the intensity of the inflammatory process by the consumption of reactive oxygen species, control of cytokine production and neutrophils life span. These findings, associated with the efficient synthesis of melatonin by activated-mononuclear cells and the presence of reactive oxygen species in the inflammatory focus, led us to verify if inflammation triggers the oxidation of melatonin *in vivo*. In this way we analyzed the cerebrospinal fluid (CSF) of patients with meningitis. AFMK was detected in 16 CSF from 20 samples of patients with viral meningitis and in none of 8 control samples. From the 16 samples in which AFMK was detected, it was quantified in 6 (at the concentration range of 50 – 500 nM). We also analyzed the correlation between the presences of AFMK with some inflammatory parameters like: cellularity and concentration of total proteins, TNF- α , IL-8 and IL-1 β . We verify that all these parameters were decreased in samples in which AFMK was in higher concentrations. Our results show that, at least part of the antiinflammatory effects described for melatonin is indeed caused by its oxidation product. These findings add a new insight in the comprehension of the

biological role of melatonin and its oxidation products in immunomodulation and during inflammation.

Índice

Lista de Abreviaturas.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1. MELATONINA.....	4
1.2. INFLAMAÇÃO, FAGOCITOSE, SISTEMA NADPH OXIDASE E <i>BURST</i> OXIDATIVO.....	8
1.3. MIELOPEROXIDASE.....	11
1.4. CITOCINAS.....	12
1.4.1. <i>Fator de Necrose Tumoral-α (TNF-α)</i>	14
1.4.2. <i>Interleucina-8 (IL-8)</i>	15
1.4.3. <i>Interleucina-1β (IL-1β)</i>	15
1.5. APOPTOSE.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. MATERIAL.....	19
3.1.1. <i>Casuística para Extração de Melatonina e AFMK de Liquor</i>	19
3.1.2. <i>Reagentes</i>	19
3.1.3. <i>Equipamentos</i>	20
3.2. MÉTODOS.....	20
3.2.1. <i>Preparo de Reagentes</i>	20
3.2.2. <i>Síntese de AFMK e AMK</i>	21
3.2.3. <i>Isolamento de Neutrófilo</i>	22
3.2.4. <i>Cultura de Neutrófilos</i>	23
3.2.5. <i>Determinação de Citocinas</i>	23
TNF- α , IL-8 e IL-1 β	23
3.2.6. <i>Avaliação e Quantificação de Morte Celular por Citometria de Fluxo</i>	25
3.2.6.1. <i>Externalização de Resíduos de Fosfatidilserina</i>	25
3.2.6.2. <i>Fragmentação de DNA</i>	26
3.2.7. <i>Quantificação de AFMK e AMK em Cultura de Células</i>	26
3.2.8. <i>Determinação do HOCl</i>	27
3.2.9. <i>Quantificação de Melatonina e AFMK em Liquor</i>	28
3.2.9.1. <i>Proteínas totais e Contagem total e Diferencial de Leucócitos no Liquor</i>	29
3.2.10. <i>Indução de Artrite</i>	29
3.2.10.1. <i>Coleta de Líquido Sinovial</i>	30
3.2.10.2. <i>Contagem Total e Diferencial de Leucócitos no Lavado Sinovial</i>	31
3.2.11. <i>Análise Estatística</i>	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1. EFEITO DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DA MELATONINA E DE SEUS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO, AFMK E AMK, SOBRE NEUTRÓFILOS: ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	32
4.1.1. <i>Efeito de melatonina, AFMK e AMK sobre a produção de HOCl em neutrófilos</i>	32
4.1.2. <i>Efeito de melatonina, AFMK e AMK sobre a liberação de TNF-α e IL-8 por neutrófilos ativados por LPS</i>	35
4.1.3. <i>Cinética de formação de AFMK e AMK a partir da oxidação de melatonina por neutrófilos ativados por LPS e PMA</i>	36
4.1.4. <i>Efeito de melatonina, AFMK e AMK sobre a apoptose de neutrófilos</i>	39
4.2. PROCESSO INFLAMATÓRIO E A OXIDAÇÃO DE MELATONINA <i>IN VIVO</i>	44
4.2.1. <i>Dosagens de melatonina e AFMK em liquor</i>	44
4.2.2. <i>Correlação entre a presença de melatonina ou AFMK no liquor com parâmetros inflamatórios como: celularidade, concentração de proteínas, TNF-α, IL-8 e IL-1β</i>	47
4.2.3. <i>Efeito de AFMK em artrite induzida em coelhos</i>	49
5. DISCUSSÃO.....	50

5.1. EFEITO DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DA MELATONINA E DE SEUS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO, AFMK E AMK, SOBRE NEUTRÓFILOS: ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	50
5.2. PROCESSO INFLAMATÓRIO E A OXIDAÇÃO DE MELATONINA <i>IN VIVO</i>	54
6. CONCLUSÕES	59
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	60
ANEXO 1: Aprovação do Comitê de Ética FCF-USP.....	77
ANEXO 2: Termo de Consentimento Pós-Informação.....	78
ANEXO 3: LCR de Pacientes com Meningite Viral.....	79
ANEXO 4: LCR de Pacientes Usados como Amostras Controle.....	80
ANEXO 5: Trabalhos Publicados e Submetidos no Período.....	81

1. Introdução

Melatonina, hormônio sintetizado na glândula pineal, possui uma função chave na sinalização neuroendócrina e na sincronização de ritmos biológicos (1). Embora muito pouco seja conhecido sobre a ação de melatonina em leucócitos, existem também evidências de que este composto tenha propriedade imunomodulatória. Em um trabalho anterior, mostramos que neutrófilos ativados oxidam melatonina a N^1 -acetil- N^2 -formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) (2). A partir deste trabalho temos considerado a possibilidade de que a oxidação de melatonina por células do sistema imune represente uma via alternativa de metabolização de melatonina, especialmente ativa na inflamação.

Além de representar uma rota de metabolização de melatonina, esta reação pode contribuir para a formação de compostos biologicamente ativos. O AFMK, e produtos secundários, tem estrutura semelhante as quinureninas originadas da oxidação de triptofano (3) e que possuem uma série de atividades biológicas importantes (4,5). Deste modo, propusemos como hipótese que a oxidação de melatonina representaria parte dos fenômenos locais desencadeados pelo processo inflamatório e que AFMK e análogos seriam alguns dos compostos imunomodulatórios gerados nesse processo. Para tanto, avaliamos: a participação da melatonina e de seus produtos de oxidação sobre a função de neutrófilos, que são células chave na inflamação capazes de produzir ERO e várias citocinas (6-11), e a presença de AFMK em fluidos inflamatórios, assim como seus efeitos *in vivo*.

Os tópicos desta introdução detalham temas que subsidiam a compreensão do nosso trabalho.

1.1. Melatonina

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 (1-6pg/mL) e alta à noite (200-300pg/mL), o que define um ritmo diário para melatonina (12,13).

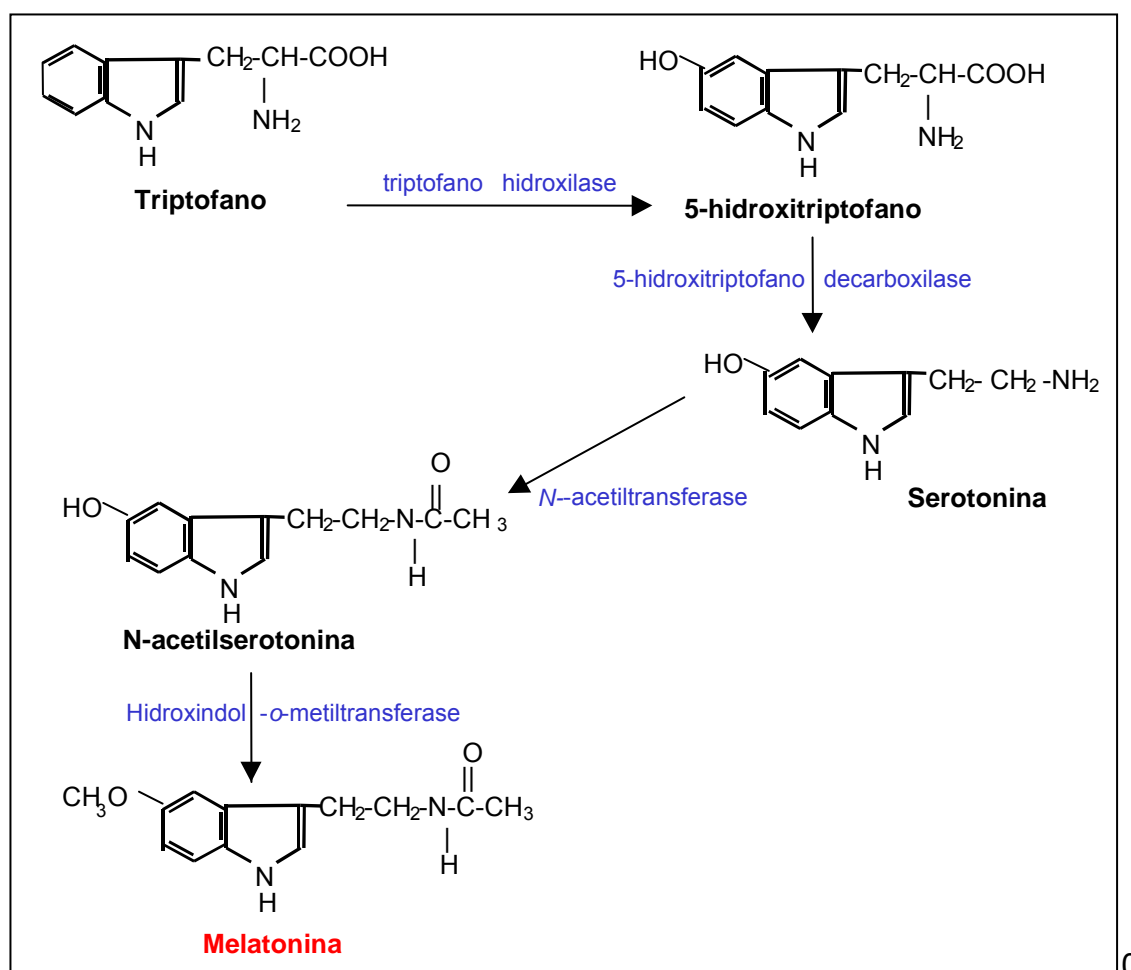
Melatonina é uma molécula anfipática e devido a esta propriedade pode penetrar em todas as membranas biológicas, podendo chegar até alguns fluidos biológicos como: saliva (14), sêmem (15), bile (16) e líquido cefaloraquidiano (LCR) (17,18), sendo nos dois últimos fluidos encontrada em quantidades maiores que no sangue (13). Nas células a melatonina pode atuar sobre receptores de membrana ou modificar diretamente reações que ocorrem no interior das células ou ainda se ligar a receptores presentes na membrana nuclear. A presença de receptores em membranas celulares confere especificidade de ação, além de permitir que a resposta fisiológica ocorra em concentrações muito baixas na faixa de picogramas por mililitro (19). Sítios de ligação de melatonina foram descritos em vários tecidos periféricos de diferentes espécies, tais como: retina (20), gônada (21), trato gastrointestinal (22) e vários tecidos neoplásicos (23). Estudos ainda apontam para a presença de receptores para melatonina em linfócitos T (24), neutrófilos (25) e monócitos (26). O efeito da melatonina parece não depender somente da sua concentração, mas também do tempo de exposição deste hormônio aos tecidos e da sensibilidade dos receptores da melatonina, a qual parece variar em função da hora do dia (12).

Estudos dos possíveis papéis fisiológicos da melatonina relatam o seu efeito sobre a pigmentação (fenômeno que não ocorre em mamíferos), sobre a maturação das gônadas (pode participar do controle da reprodução no homem), além de atuar sobre o sono nos seres humanos (12). Este hormônio é importante em várias funções fisiológicas essenciais associadas com ritmo circadiano e sazonal (12, 13). Devido a possível alta concentração de melatonina em alguns tecidos, pode-se imaginar que além de uma função hormonal clássica, isto é, ligação com receptores e desencadeamento de sinalização celular para respostas específicas, a melatonina possa apresentar atividades adicionais. Como a melatonina é um bom doador de

elétrons e reage eficientemente com oxigênio singlete (27), radicais hidroxila (28,29), peroxinitrito (30,31) e possivelmente outras espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (32), uma das propostas para alguns de seus efeitos poderia estar associado a sua capacidade em sequestrar radicais livres (33-36). A melatonina também pode atuar indiretamente como um antioxidante, como exemplo temos que melatonina estimula a expressão gênica das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (37,38,39), catalase (39,40) e glutathione peroxidase (39,41) e protege contra diversos agentes oxidantes (42,43).

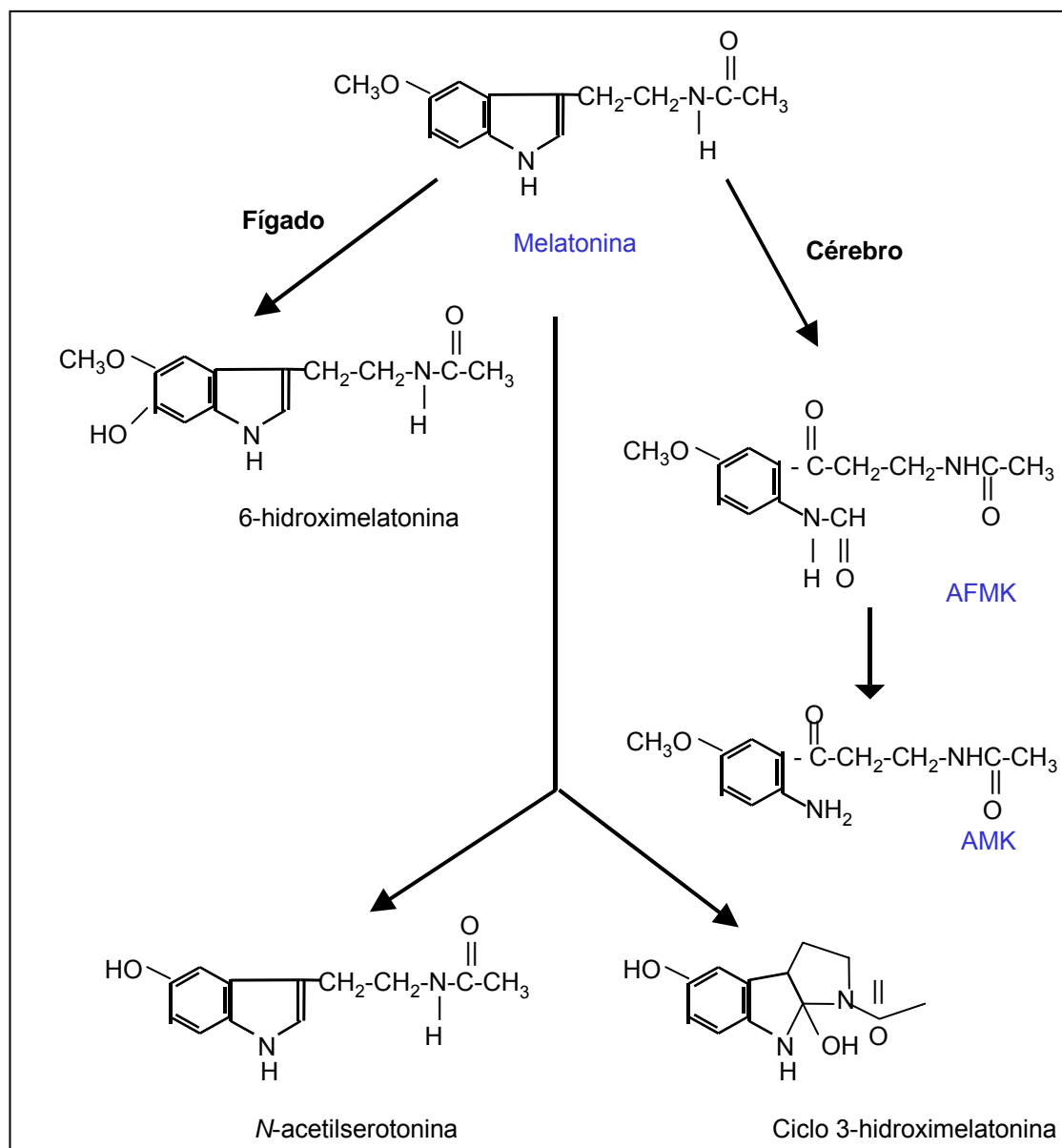
Além destas funções, este hormônio pode desempenhar algumas outras funções estratégicas. Na verdade vários efeitos sobre a produção de óxido nítrico (44,45,46), ativação de leucócitos (47) e produção de citocinas (48,49,50) foram observados. Melatonina também pode inibir a apoptose em vários tecidos (51,52) além de influenciar o sistema imune de várias formas (53,54,55). Em monócitos, a melatonina induz a secreção de interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), ativa a formação de intermediários reativos de oxigênio e a citotoxicidade contra células tumorais (26,47). Assim melatonina poderia participar dos processos inflamatórios como um imunomodulador (56,57). Apesar de inúmeros efeitos relatados, o mecanismo de ação da melatonina e seus produtos de oxidação sobre o sistema imune não está ainda esclarecido.

O aminoácido L-triptofano é o precursor da melatonina. Este aminoácido é captado ativamente pelas células da glândula pineal (58,59) e convertido a serotonina através de duas reações catalisadas respectivamente pelas enzimas triptofano hidroxilase e 5-hidroxitriptofano descarboxilase presentes na glândula pineal. A seguir, *N*-acetilação, catalisada pela enzima *N*-acetiltransferase (60) e a posterior metilação pela hidroxindol-o-metiltransferase (61), produzem melatonina (Esquema-1). Durante muito tempo se considerou que o hormônio melatonina era exclusivamente sintetizado pela glândula pineal. Estudos mais recentes descrevem a síntese extrapineal de melatonina. Assim, células da linhagem monocítica (62), linfocítica (63) e macrófagos peritôneais de ratos (64) têm enzimas necessárias para a síntese deste hormônio e altas concentrações deste foram relatadas por exemplo em medula óssea (65).



Esquema-1: Representação esquemática da biosíntese de melatonina a partir de triptofano.

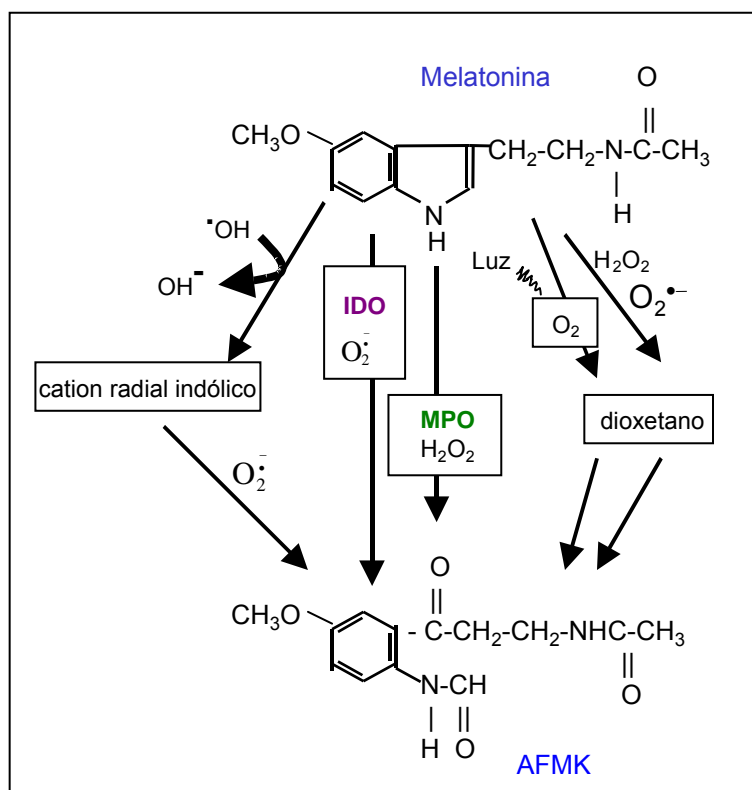
Não existem evidências de que a melatonina seja estocada na glândula pineal, a melatonina produzida é liberada diretamente na corrente sanguínea e aproximadamente 50-70% da melatonina circula na corrente sanguínea ligada a albumina. A inativação da melatonina ocorre principalmente no fígado, onde é convertida a 6-hidroxi melatonina pelo sistema do citocromo P-450, seguida de conjugação com sulfato ou glucoronato e posterior excreção na urina. No sistema nervoso central uma parte da melatonina pode ser convertida a AFMK (66) possivelmente através de clivagem oxidativa do anel indólico catalisada por enzimas como a indolamina-2,3-dioxigenase (IDO), seguida de deformilação formando AMK, por ação da enzima formamidase (assim como ocorre no metabolismo do triptofano) (1). Outras vias metabólicas menos importantes, que ocorrem em diversos tipos celulares, levam a formação de *N*-acetilserotonina e de 3-hidroxi melatonina cíclica (67) (Esquema-2).



Esquema-2: Representação esquemática de vias metabólicas de melatonina.

A formação de AFMK também pode ocorrer por foto-oxidação da melatonina (68), por reação da melatonina com oxigênio singlete (27), reação com peróxido de hidrogênio (69), reação com radical hidroxila (28,29), ou peroxinitrito (30,31) formando um cátion radical que reagindo com ânion superóxido leva a formação de AFMK. Da mesma forma AMK pode ser originado enzimaticamente, *in vitro* pela catalase (69) e esterase (66). Trabalhos do grupo mostraram ainda que melatonina pode ser oxidada por neutrófilos e células mononucleares ativadas *in vitro* numa

reação que envolve mieloperoxidase (MPO) e O_2^- levando a formação de AFMK (2,70) (Esquema-3).



Esquema-3: Representação esquemática de possíveis vias enzimáticas e químicas de formação de AFMK a partir de melatonina (75).

Trabalhos apontam para a possibilidade de que compostos do tipo quinurenina, originados da clivagem do anel indólico, tenham por si mesmos efeitos biológicos. Como exemplo, temos que a melatonina e algumas quinureninas parecem modificar a atividade de óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) (71) e que AMK seja um potente inibidor da biosíntese de prostaglandinas (72). A ação de quinureninas pode ser mais intensa do que a própria melatonina (72,73,74). Mais recentemente foi observado que tanto AFMK como AMK atuam como potentes antioxidantes (75,76).

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

O dano tecidual desencadeia uma sequência de eventos complexos conhecidos como resposta inflamatória. Estes eventos são iniciados pela liberação de uma variedade de mediadores inflamatórios como, fator de ativação plaquetária (PAF), leucotrieno B4 e várias citocinas, do local da lesão em direção à corrente

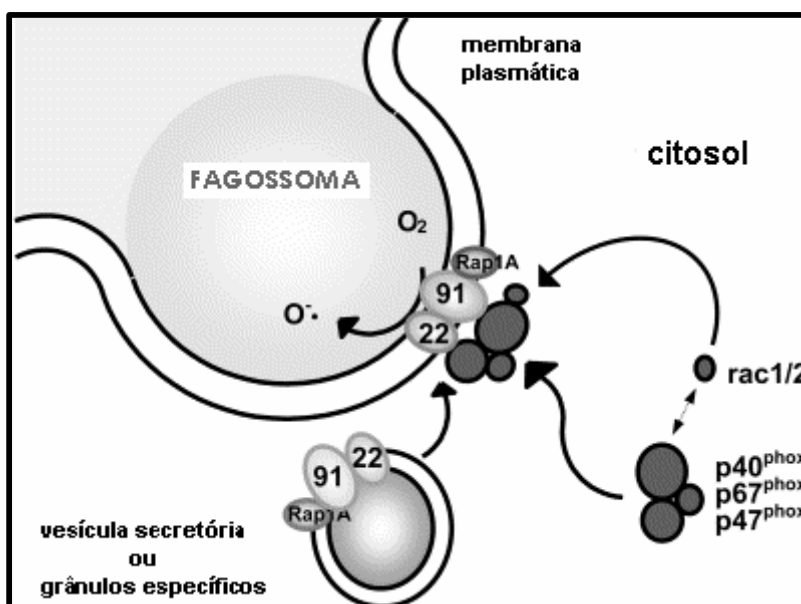
sanguínea, os quais induzem o aumento da expressão de moléculas de adesão na parede do endotélio vascular e conseqüentemente o aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade capilar, resultando na migração de células sanguíneas para a área da lesão.

A inflamação normalmente é dividida em aguda e crônica. A inflamação aguda tem uma duração efetivamente curta, de minutos a alguns dias, e suas principais características são a exudação de líquidos e proteínas plasmáticas e a migração de leucócitos, predominantemente polimorfonucleares (77).

Os neutrófilos são os leucócitos polimorfonucleares mais abundantes na circulação sanguínea e são as primeiras células a migrar para o sítio inflamatório. Estas células apresentam uma função central na defesa do hospedeiro durante o processo inflamatório porém, podem também contribuir para a destruição de tecidos (78). Isto ocorre devido ao extravasamento de produtos tóxicos para o meio extracelular.

Quando recrutados para o local da lesão, os neutrófilos apresentam a capacidade de englobar microorganismos e/ou fragmentos do tecido danificado por um processo denominado fagocitose que tem por objetivo eliminar o patógeno (79). A atuação bactericida ou fungicida de neutrófilos depende da ocorrência de dois processos concomitantes durante a formação do fagolisossomo: a formação de ERO através da ativação do sistema NADPH oxidase e a liberação de proteínas enzimáticas ou microbicidas de grânulos citoplasmáticos. Para a eliminação de patógenos extracelulares que não podem ser fagocitados, existe a necessidade da liberação de enzimas lisossomais (80).

A fagocitose é precedida pela ligação do patógeno a receptores presentes na membrana desta célula. Após o reconhecimento do agente invasor, ocorre a organização de um sistema complexo denominado NADPH oxidase, composto por proteínas citosólicas (p40^{phox}, p47^{phox} e p67^{phox}) e de membrana, também conhecido como citocromo b₅₅₈, (p22^{phox} e gp91^{phox}). Participam ainda deste complexo outras duas proteínas de baixo peso molecular a Rac 2, e a Rap1A. A organização deste sistema ocorre através da fosforilação do componente citosólico p47^{phox}, pela proteína C quinase, resultando na migração do complexo citosólico para a membrana plasmática da célula ou das vesículas secretórias e grânulos citoplasmáticos. O acoplamento de todos os componentes à membrana forma o complexo cataliticamente ativo (80,81) (Esquema-4)



Esquema-4: Organização do sistema NADPH oxidase quando fagócitos são estimulados (80).

O sistema NADPH oxidase catalisa a produção de O_2^- através da redução unieletrônica do oxigênio molecular, utilizando NADPH como doador de elétrons (82) (reação 1). Embora o O_2^- gerado tenha baixa atividade microbicida ele dará origem a outras ERO como H_2O_2 e $HOCl$ com atividade microbicida maior.



A metabolização do oxigênio molecular a O_2^- pelo sistema NADPH oxidase é denominado de *burst oxidativo*. O *burst oxidativo* é uma característica de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos que recebem genericamente a denominação de fagócitos devido a sua habilidade de englobar material particulado. O *burst* foi descrito nos anos 30 como um aumento do consumo de oxigênio, sendo que este aumento era considerado como uma fonte de energia para fagocitose. A importância do *burst* como fonte de ERO foi descrito mais tarde e este processo ficou conhecido como sendo o responsável pela capacidade *killing* de neutrófilos (82). Entretanto, Reeves e colaboradores (83) recentemente descreveram que o sistema NADPH oxidase permite um influxo de K^+ para dentro do fagossoma o que aumenta a

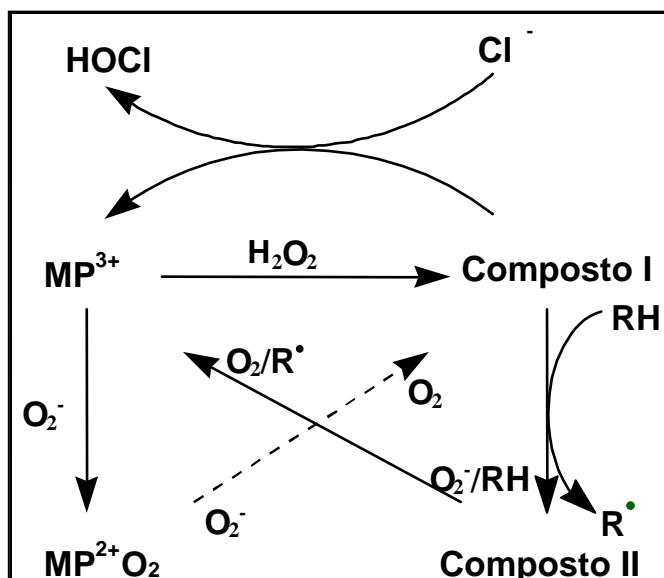
solubilização de enzimas proteolíticas presente nos grânulos, o que também favorece o *killing*.

1.3. Mieloperoxidase

MPO é uma heme peroxidase clássica, liberada após ativação celular no interior do fagolisossomo ou no espaço extracelular, que cataliza a formação de HOCl um potente agente microbicida (84). A importância da MPO na atividade microbicida de fagócitos é suportado pelo aumento da atividade microbicida dos macrófagos pela adição exógena de MPO (85) e outras peroxidases (86).

MPO representa 5% do peso seco de neutrófilos (87) e é o maior constituinte dos grânulos azurófilos citoplasmáticos (87). Os monócitos contêm cerca de um terço do conteúdo de MPO quando comparados a neutrófilos. Quando monócito se diferencia a macrófago *in vivo* ou *in vitro* este conteúdo é perdido, entretanto trabalhos recentes sugerem que em algumas situações MPO também pode estar presente em macrófagos teciduais (88,89).

Além da reação de formação de HOCl tem sido sugerido que MPO pode catalisar a oxidação de uma variedade de compostos (87,90). O mecanismo de reação da MPO envolve a reação da forma férrica (MP^{3+}) com H_2O_2 para formar um intermediário redox - composto I, o qual oxida cloreto para produzir ácido hipocloroso. A oxidação de substratos orgânicos se dá através de duas transferências sucessivas de um elétron envolvendo o intermediário - composto I e composto II. Substratos pobres de MPO sequestrariam o composto II e inibiriam a produção de ácido hipocloroso a não ser que O_2^- ou outra molécula do substrato esteja presente para reciclar a enzima (87). A oxidação de substratos orgânicos pode se dar também pelo envolvimento de MPO composto III ($MP^{2+}O_2$) (87) (Esquema-5).



Esquema-5: Ciclos conhecidos para a mieloperoxidase. (87,90,91)

Embora a principal função descrita para MPO foi durante muito tempo a produção de HOCl, atualmente tem sido descrito que MPO pode ter um espectro de ação muito maior, possivelmente tenha uma participação na imunomodulação (92). Mais recentemente, uma outra característica importante para MPO foi descrita, a reação de MPO na presença de H_2O_2 com NO (93). A interação entre NO e MPO se dá tanto através do composto I como composto II, sugerindo que MPO pode servir como um sítio catalítico para NO, regulando assim a biodisponibilidade e função de MPO ou ainda a biodisponibilidade de NO nos sítios de inflamação. Uma outra possibilidade seria a formação de oxidantes com atividade bactericida (94).

MPO tem sido correlacionada com alguns dos efeitos deletérios ocorridos durante o processo inflamatório. Neste sentido MPO poderia estar clorando proteínas e oxidando lipídeos e proteínas (95). Entretanto, trabalhos mais recentes mostraram, inesperadamente, que a ausência de MPO não diminui o dano celular (96,97). Diante desses fatos pode se esperar que MPO tenha um efeito sinalizador que vai além de seus efeitos microbicida, regulatórios ou deletério. Melatonina é um hormônio com várias ações descritas no sistema imune. É possível que algumas destas ações sejam originadas de sua oxidação por MPO (2).

1.4. Citocinas

Citocinas são hormônios polipeptídios secretados por uma variedade de tipos celulares. Representam transmissores solúveis essenciais na comunicação entre

células e coordenam respostas imunes e inflamatórias. As citocinas têm uma importância crucial na transmissão de sinais para proliferação, diferenciação e função de várias células alvos, através da interação com receptores específicos na superfície das células (98).

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

Dentre as células do sistema imune, monócitos são considerados “fábricas” de citocinas. A capacidade de neutrófilos produzir citocinas foi descrita (6-11) e resultou numa nova compreensão da função de neutrófilos na resposta imune. A descoberta de que neutrófilos tem a capacidade de sintetizar e liberar citocinas imunorregulatórias promoveu neutrófilos a células chave capazes de influenciar a direção e evolução do processo imune. A menor produção de citocinas por neutrófilos quando comparado com outras células inflamatórias poderia ser compensado pelo maior número de polimorfonuclear (PMN) em relação a outras células, no sítio inflamatório. O estado funcional da célula também deve ser considerado com relação a liberação de citocinas por neutrófilo (99,100).

A expressão de citocinas em diversos tipos celulares é dependente da ativação de fatores de transcrição tal como o fator nuclear κ B (NF- κ B). Esta mesma via opera em neutrófilos onde foi bem caracterizada (101). Em células não estimuladas, NF- κ B se encontra no citoplasma na forma de um complexo inativo devido a sua ligação a uma subunidade inibitória chamada I κ B (102). Estímulos diversos provocam a liberação de I κ B e a consequente translocação de p50 e p65 para o núcleo, induzindo assim, a síntese de mRNA para citocinas, imunoreceptores e moléculas de adesão (103). A ativação de NF- κ B é rapidamente aumentada por uma variedade de agentes, incluindo as citocinas IL-1 e TNF, viroses, lipopolissacarídeo (LPS), ésteres de forbol, luz UV e radiações ionizantes (103).

Baixas concentrações de H₂O₂ ativam NF- κ B e vários antioxidantes testados como L-cisteína, glutathiona, manitol, dentre outros suprimem a ativação de NF- κ B

por H_2O_2 (103,104,105). Assim ERO parecem servir como segundos mensageiros para regular positivamente a expressão gênica de citocinas particularmente IL-8 (106). Estudos realizados demonstraram que a melatonina agindo como um sequestrador de radical hidroxila, pode estar regulando a ativação, translocação e ligação de NF- κ B ao DNA (107) e portanto controlando a expressão de citocinas. Contudo, a função de melatonina na regulação da produção de citocinas por neutrófilos não é conhecido e por células mononucleares em alguns casos é contraditório (26,47,50).

1.4.1. Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α)

TNF é o principal mediador da resposta imune imediata a vírus e bactérias gram negativas e é também um dos principais responsáveis por muitas das complicações sistêmicas que ocorrem em infecções severas (108).

São descritas duas diferentes formas desta proteína: TNF- α , uma proteína solúvel não-glicosilada de 17 kDa e TNF- β , uma glicoproteína secretada de 25 kDa. Estas são produtos de diferentes genes e são produzidas por diferentes tipos celulares.

TNF- α é secretado por monócitos, neutrófilos e macrófagos ativados, e por muitas outras células incluindo células B, células T e fibroblastos. TNF- α é um potente mediador parácrino e endócrino de funções inflamatórias e imunes que regulam o crescimento e a diferenciação de uma variedade de tipos celulares. É seletivamente citotóxico para muitas células transformadas, especialmente em combinação com IFN- γ . TNF- α está envolvido em choque séptico, caquexia, autoimunidade e doenças inflamatórias. A atividade proinflamatória do TNF- α é resultante principalmente de sua capacidade de aumentar a expressão de moléculas de adesão e conseqüentemente promover a aderência de neutrófilos ao endotélio vascular. O TNF- α também atua no priming de neutrófilos o que resulta em um aumento notável na atividade fagocitária de neutrófilos, na indução da liberação de enzimas lisossomais e na estimulação da produção de superóxido (109,110). É conhecido que TNF- α induz o *stress* oxidativo em alguns tipos celulares e que a adição de antioxidantes, redução da pressão de oxigênio (pO_2) ou a super-expressão de superóxido dismutase aumenta a sobrevivência dessas células,

sugerindo que os radicais de oxigênio estão envolvidos nos efeitos citotóxicos do TNF (111,112).

Embora o mecanismo exato de ação do TNF na mediação da atividade citolítica *in vitro* e *in vivo* não esteja bem caracterizado, sua atividade tumoricida parece ser decorrente da ativação e aderência de neutrófilos, mediando a necrose hemorrágica de tumores sólidos e a inflamação associada (113)

1.4.2. Interleucina-8 (IL-8)

A citocina pró-inflamatória IL-8 faz parte da sub-família α das quimiocinas. Esta quimocina pode ser produzida por vários tipos celulares, incluindo neutrófilos, linfócitos, granulócitos, fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, hepatócitos e condrócitos. IL-8 encontra-se associada a processos agudos e crônicos, sendo produzida rapidamente após um estímulo inflamatório. Apresenta como principal função a quimioatração para neutrófilos, células T, basófilos e linfócitos; age também como fator de ativação e fator angiogênico além de estimular a atividade microbicida e o *burst* respiratório em leucócitos. Receptores para IL-8 têm sido identificados em neutrófilos, basófilos e linfócitos, além de sítios de ligação saturados em monócitos, eosinófilos, células endoteliais e em eritrócitos (114,115,116).

Embora inicialmente considerada um produto de monócitos, hoje é conhecido que neutrófilos são fontes importantes de IL-8. Pela liberação de IL-8, os neutrófilos têm a capacidade de amplificar o recrutamento de neutrófilos adicionais no sítio inflamatório. A produção de IL-8 pode ser esperada em infecções, isquemia, trauma e em outros distúrbios de homeostase tecidual, desde que concentrações de IL-1 e TNF estejam elevadas. Nestas condições é provável que IL-8 seja a causa principal da acumulação local de neutrófilos (117,118).

1.4.3. Interleucina-1 β (IL-1 β)

IL-1 é um mediador importante na resposta de defesa do hospedeiro contra injúria e infecções. Uma grande variedade de células incluindo monócitos, macrófagos e neutrófilos são capazes de liberar IL-1. Existem duas formas de IL-1, conhecidas como IL-1 α e IL-1 β as quais possuem somente 30% de homologia, porém se ligam aos mesmos receptores de superfície celular e desencadeiam as mesmas atividades biológicas.

Os efeitos biológicos de IL-1 são similares aos do TNF e dependem da quantidade de citocinas produzidas. Em baixas concentrações, IL-1 funciona como um mediador da inflamação local aumentando a expressão de moléculas de superfície que promovem a adesão de leucócitos. Em altas concentrações, IL-1 ganha a circulação sanguínea e exerce efeitos endócrinos causando febre e induzindo a síntese de proteínas de fase aguda.

Embora existam semelhanças entre as atividades de IL-1 e TNF, IL-1 não induz morte celular por apoptose e não causa dano tecidual (119,120), apenas potencializa os efeitos de TNF- α .

1.5. Apoptose

A maioria dos processos inflamatórios agudo é desativada por programas que interrompem a inflamação e limitam a destruição de tecidos. Estes programas incluem a eliminação do agente infeccioso por fagocitose, o decréscimo progressivo do recrutamento de leucócitos promovido por sinais endógenos e finalmente a apoptose de leucócitos (121).

A apoptose é uma forma molecularmente elaborada de eliminação celular, caracterizada morfológicamente pelos seguintes eventos: degradação do DNA genômico em fragmentos oligonucleosomais, condensação da cromatina, diminuição do volume e aumento da granulosidade celular, manutenção da estrutura das organelas, formação de pregas citoplasmáticas e consequente fragmentação das células nos chamados corpos apoptóticos (122).

Este processo de morte celular ocorre em diversas situações fisiológicas, estando envolvido na regulação de processos biológicos fundamentais como desenvolvimento embrionário e regulação homeostática das células imunes. Entretanto, pode aparecer em situações patológicas, como por exemplo, em certas doenças neurodegenerativas e câncer ou ainda em situações artificiais como indução de morte de células tumorais por agentes quimioterápicos (122).

Em relação a apoptose em situações fisiológicas podemos citar a apoptose de neutrófilos. Os neutrófilos possuem um tempo de vida relativamente curto (8-20 horas), porém quando recrutados para o foco inflamatório seu tempo de sobrevivência pode ser aumentado (123). Estudos *in vitro* identificaram uma variedade de agentes que modulam a apoptose de neutrófilos. Interleucina-2 (IL-2), leucotrieno B₄, corticosteroides e lipopolissacarídeo (LPS) inibem a apoptose (123-128), enquanto

enzimas proteolíticas, imunocomplexos, bactérias, IL-10 e vírus induzem apoptose (129-132). Estímulos que inibem a apoptose garantem um número maior de neutrófilos ativos no foco inflamatório. Por outro lado, a apoptose de neutrófilos pode ser caracterizada como um processo importante, limitando a injúria tecidual nos sítios de inflamação (133). Estudos mostram que neutrófilos em apoptose apresentam uma atividade diminuída do burst respiratório (134), são incapazes de degranular e perdem a capacidade de se ligar a moléculas de adesão (135). Além disso a fagocitose de neutrófilos em apoptose é um processo que inibe a liberação de citocinas próinflamatórias (136). No entanto a apoptose de neutrófilos estaria atuando no sentido de estabelecer uma nova homeostase no tecido.

Dentre os vários agentes que modulam a apoptose podemos citar ainda a melatonina. A função da melatonina na apoptose foi descrita nos anos 90 (137) e atualmente o número de trabalhos que demonstram esta capacidade da melatonina vem crescendo. Estes estudos mostram a melatonina atuando como inibidor da apoptose em células imunes (137) e células neuronais (137) e atuando como um indutor da apoptose em células cancerígenas (137). Dessa forma melatonina poderia ser usada no tratamento de doenças neurodegenerativas e adicionalmente no tratamento do câncer (137,138). Apesar dos inúmeros estudos e dos prováveis benefícios descritos para melatonina, o mecanismo de ação sobre a apoptose ainda não está claro. No entanto pode se inferir que a propriedade de sequestrar radicais livres e outros mecanismos intracelulares mediados por melatonina podem estar envolvidos.

2. Objetivos

Objetivo Geral:

Este trabalho foi proposto na tentativa de verificar (i) a relevância da reação de oxidação da melatonina (ii) e de seus produtos de oxidação AFMK e AMK, sobre a função de neutrófilos *in vitro* e (iii) se o processo inflamatório proporciona as condições necessárias para que a oxidação de melatonina ocorra *in vivo*.

Objetivos Específicos:

- verificar o efeito de melatonina e de seus produtos de oxidação, AFMK e AMK, sobre a produção de HOCl por neutrófilos ativados;

- verificar o efeito da melatonina e de seus produtos de oxidação, AFMK e AMK, sobre a liberação de TNF- α e IL-8 por neutrófilos ativados;

- verificar o efeito da melatonina e de seus produtos de oxidação, AFMK e AMK, sobre o processo de apoptose de neutrófilos;

- verificar a ocorrência da reação de oxidação da melatonina *in vivo*, através do monitoramento de melatonina e da formação de seu produto de oxidação, AFMK, em liquor de pacientes com meningite;

- verificar a correlação entre a presença de melatonina ou AFMK no liquor com alguns parâmetros inflamatórios como: celularidade, concentração de proteínas, TNF- α , IL-8 e IL-1 β ;

- verificar o efeito de AFMK sobre artrite induzida em coelhos.

3. Material e Métodos

Este estudo foi realizado em concordância com as normas éticas constantes na resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde, sobre pesquisa envolvendo seres humanos no Brasil, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) sob número 158 (anexo 1). As amostras foram utilizadas perante a assinatura do Termo de Consentimento pelo paciente ou responsável (anexo 2).

3.1. Material

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

-Liquor foi obtido junto ao Laboratório de Neurodiagnóstico Spina França (responsável Dr. José Antônio Livramento, médico Livre Docente Neurologia FMUSP);

-Coelhos machos da raça New Zealand de 2 a 3 meses de idade, pesando entre 2,5 e 3,5 kg, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram alimentados com água e ração "ad libitum".

3.1.1. Casuística para Extração de Melatonina e AFMK de Liquor

As amostras de liquor (3,0 mL, estocadas a -20°C) foram obtidas por punção lombar em condições assépticas. Vinte amostras foram de pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial para meningite viral (anexo 3) e 8 amostras foram de indivíduos com um mal estar transitório, sem alterações bioquímicas, citológicas ou microbiológicas no liquor, eles foram usados como controle (anexo 4). A idade média dos pacientes com meningite viral variou de 1 a 35 anos distribuída em 65% de homens e 35% de mulheres.

3.1.2. Reagentes

Todos os reagentes a seguir são de grau analítico:

-catalase (EC 1.11.1.6, de fígado bovino), Histopaque^R (densidade = 1077), dextran, dimetil sulfoxido (DMSO), acetato de forbol miristato (PMA), zimosan, glicose, melatonina, meio de cultura RPMI 1640 e LPS foram obtidos da Sigma Chemical Co.;

-fosfato de sódio, fosfato diácido de potássio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, cloreto de sódio, etanol, diclorometano, acetonitrila, e bicarbonato de sódio foram obtidos da Merck S.A.;

-peróxido de hidrogênio 60% foi obtido da INTEROX;

-heparina foi obtida da Roche;

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

-Anexina-V-FITC foi obtido da BioWhittaker, Inc. (Walkersville, MD, USA)

3.1.3. Equipamentos

Balança analítica AG204 Mettler Toledo, pH-metro micronal B374, espectrofotômetro Hitachi U-2000, autoclave vertical modelo 103 FABBE-PRIMA, banho maria 37°C com agitador orbital, modelo 102/109.089, FANEN, ultrassom Cole-Parmer 8853, centrífuga Refrigerada himac CR 20B2 Hitachi, rotor RPR20-2, centrífuga de bancada, Incibrás, Modelo PIN IV, rotor swing, fluxo laminar, estufa com 5% de CO₂ a 37° marca Harris, modelo CNW300A, microscópio Invertido marca Nikon, centrífuga de eppendorf marca Beckman, modelo Allegra 21R, leitor de ELISA, modelo SLT-Spectra, cromatografia líquida de alta performance (HPLC) SHIMADZU SCL-10A vp com detectores SPD-10A vp (diode array) e RF-10A xl (fluorescência), *software* Class-VP, coluna de fase reversa SUPERCOSIL LC-18 (25cm x 4,6mm, 5µm), citômetro de fluxo FACScalibur marca Bencton & Dickinsonn, *software* Cell Quest, espectômetro de Massa Quattro II (micromass, Manchester, UK).

3.2. Métodos

3.2.1. Preparo de Reagentes

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

-Foram preparadas soluções estoque de CaCl₂ 100 mM, MgCl₂ 50 mM, glicose 100 µM, NaCl 0,9 e 2,7, H₂O₂ 50 mM e melatonina 10 mM;

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

-O meio de cultura utilizado foi RPMI 1640 suplementado com L-glutamina 0.3 g/L , Hepes 2,32 g/L , bicarbonato de sódio 2.0 g/L , estreptomicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, penicilina 100UI/ mL e 10% soro fetal bovino. O meio foi filtrado em filtro Millipore de poro 0.22 μm e acondicionado em frasco de vidro previamente esterilizado. Todo o procedimento foi realizado em fluxo laminar;

-Tampão de lavagem (0,05% Tween 20 em PBS, pH 7.4);

-Tampão bloqueador (1% de albumina de soro bovina (BSA), 5% de sucrose em PBS com 0,05% de NaN_3);

-Reagente diluente (0,1% de BSA, 0,05% Tween 20 em tampão Tris-salina, pH 7.4).

3.2.2. Síntese de AFMK e AMK

AFMK e AMK foi sintetizado a partir da reação de melatonina (1 mM) dissolvida em 100 mL de H_2O_2 30%. Esta reação foi incubada 2 horas a temperatura ambiente sob agitação. Após este período foi realizada uma extração com 50 mL de diclorometano (repetida três vezes). O solvente foi evaporado utilizando nitrogênio e o produto bruto foi ressuspendido em H_2O milliQ (139). 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 (254 nm). As amostras foram injetadas (500 μL) em uma coluna preparativa C18 shimadzu Shim-pack, usando acetonitrila : H_2O (25:75) como fase móvel com fluxo de 10 mL/min . Os picos correspondentes ao AFMK e AMK foram coletados, concentrados, redissolvidos em um pequeno volume de água e submetidos à identificação por espectrometria de massa ($[\text{M}+\text{H}^+]$ m/z = 265 (AFMK) e $[\text{M}+\text{K}^+]$ m/z = 275 (AMK)) usando eletrospray (ES/MS) Espectômetro de Massa Quattro II (micromass, Manchester, UK) (Figura-1) e espectrofotometria UV-visível (AFMK λ_{max} = 340, AMK λ_{max} = 380) (Figura-2), (66). As concentrações de AFMK e AMK foram determinadas usando absorção em 340 nm (ϵ_{340} = 3600 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e 380 nm (ϵ_{380} = 4500 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) respectivamente (66).

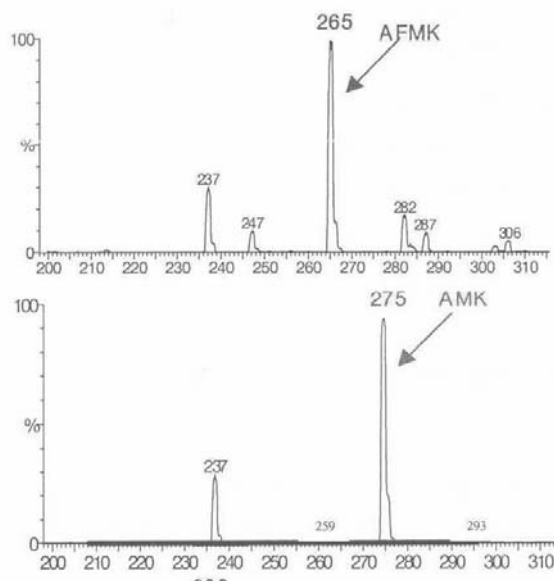


Figura-1: Espectro de massa de AFMK (protonado com H^+) e AMK (protonado com K^+) resultante da oxidação da melatonina.

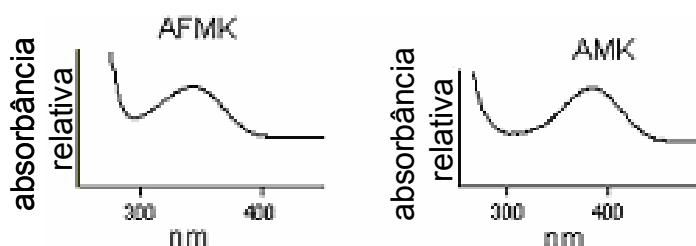


Figura-2: Espectro UV-VIS de AFMK and AMK. AFMK $\lambda_{max} = 340$, AMK $\lambda_{max} = 380$.

3.2.3. Isolamento de Neutrófilo

Neutrófilos de sangue periférico foram obtidos a partir de doadores voluntários aparentemente saudáveis, recrutados entre os professores, funcionários e alunos do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. O sangue foi colhido em tubos plásticos heparinizados (10U/mL), e posteriormente diluído na proporção 1:1 com PBS 10 mM, pH 7,4, filtrado em millipore de poro 0,22 μm . A diluição foi colocada sobre 10 mL de Histopaque^R (densidade = 1077). O material foi centrifugado a 500 g à temperatura ambiente por 20 minutos em centrífuga de bancada, ao infranadante foram adicionados 15 mL de Dextran 5%, diluído em solução salina 0,9% estéril para sedimentação de eritrócitos. O material foi mantido em banho de gelo (com inclinação de 45°) por 45 minutos, sendo o sobrenadante recolhido (volume completado para 30 mL com PBS 10 mM) e centrifugado a 500 g à temperatura

ambiente por 5 minutos em centrífuga de bancada. O sobrenadante foi descartado e o infranadante submetido a hemólise em 10 mL de água gelada (0°C – destilada e filtrada em filtro mllipore de poro 0,22 μm) com agitação constante por um minuto. A isotonicidade foi restabelecida com 5mL de NaCl 2,7% (filtrado em millipore de poro 0,22 μm) (140) e 15 mL de PBS 10 mM estéril. O material foi centrifugado em 500 g à temperatura ambiente por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o infranadante ressuspendido em 1mL de PBS 10 mM ou RPMI 1640. A contagem de células totais foi realizada em câmara de Neubauer e a viabilidade celular verificada com azul de tripan.

3.2.4. Cultura de Neutrófilos

Neutrófilos, $2,5 \times 10^6$ células/mL ou $5,0 \times 10^5$ células/mL (plaqueados em placas Nunc de fundo chato com 96 wells- volume final de 300 μL) foram submetidos a 18 horas de cultura em estufa com 5% de CO_2 a 37°C. As células foram divididas em oito grupos. O primeiro grupo foi o grupo controle e não recebeu tratamento. O segundo grupo foi tratado com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O terceiro, quarto e quinto grupo recebeu tratamento *in vitro* de AFMK, AMK e melatonina respectivamente com concentrações variando de 0,001 mM a 1,0 mM. O sexto, sétimo e oitavo grupo foi tratado com AFMK, AMK e melatonina respectivamente na presença de LPS. O material submetido à cultura foi recolhido e centrifugado em frasco de plástico estéril de 1,0mL a 200 g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante livre de células foi coletado e submetido a congelamento em tubos cryogenicos a $\leq -80^\circ\text{C}$ até o momento do ensaio de quantificação de TNF- α e IL-8 (R&D System) por Elisa. Os neutrófilos foram recuperados para o ensaio de apoptose utilizando Anexina V-FITC.

3.2.5. Determinação de Citocinas

Citocinas foram mensuradas por imunoenensaio quantitativo. As determinações de TNF- α , IL-8 e IL-1 β foram realizadas através de placas de ELISA montadas e padronizadas a partir de Kits DuoSet da R&D System.

TNF- α , IL-8 e IL-1 β

TNF- α , IL-8 e IL-1 β , foram mensurados em sobrenadante de cultura de células ($2,5 \times 10^6$ células/mL) mantidas em cultura de 18 horas por ensaio imunoenzimático

ELISA. O princípio básico do teste é a imobilização de um dos reagentes em uma fase sólida, enquanto outro reagente pode ser ligado a uma enzima, com preservação tanto da atividade enzimática como da imunológica do anticorpo.

A fase sólida, ou seja, o anticorpo de captura é formado por anti-TNF- α humana ou anti-IL-8 humana ou anti-IL-1 β humana (4 μ g/mL), diluída em PBS e o anticorpo de detecção é formado por anti-TNF- α humana biotilada (300 ng/mL) ou anti-IL-8 humana biotilada (20 ng/mL) ou anti-IL-1 β humana biotilada (0,1 pg/mL), diluído em reagente diluente.

Na revelação da reação utilizamos estreptavidina conjugada com peroxidase de raiz forte (HRP) (diluição 1:200 com o reagente diluente). O substrato utilizado foi uma mistura 1:1 de H₂O₂ e tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi terminada pela adição de H₂SO₄ (2 N). A leitura foi realizada em 450 nm e uma leitura de correção em 540 nm. A leitura de correção é importante para eliminar qualquer interferente presente na placa.

- Preparo da Placa para dosagem de TNF- α , IL-8 e IL-1 β :

- 1- O anticorpo de captura foi diluído em PBS, numa concentração final de 4 μ g/mL. Foram colocados 100 μ L do anticorpo diluído por poço sendo então a placa coberta e incubada por 20 horas a temperatura ambiente;

- 2- No dia seguinte, os poços foram aspirados e lavados com 400 μ L de tampão de lavagem três vezes;

- 3- As placas foram bloqueadas adicionando 300 μ L de tampão bloqueador a seguir as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 1 hora;

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

- Procedimento de dosagem de TNF- α , IL-8 e IL-1 β

- 1- Quando necessário fez-se a diluição de amostras ou padrões com o reagente diluente, finalizando, por poço, 100 μ L de amostra. A placa foi coberta com fita adesiva e incubada por 2 horas a temperatura ambiente;

- 2- Os poços foram aspirados e lavados com 400 μ L de tampão de lavagem três vezes;

- 3- 100 μ L do anticorpo de detecção (300ng/mL para TNF- α , 20ng/mL para IL-8 ou 0,1pg/mL para IL-1 β) diluído no reagente diluente foram adicionados. A placa foi

coberta novamente com fita adesiva e incubada por duas horas a temperatura ambiente;

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

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

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

7- 100 μ L da solução substrato foram adicionados em cada poço e incubados durante 20 minutos a temperatura ambiente evitando luz direta. A solução substrato foi preparada diluindo-se o reagente colorido A (H_2O_2) e o reagente colorido B (tetrametilbenzidina) na proporção 1:1;

8- 50 μ L da solução *stop* (H_2SO_4 , 2N) foram adicionados em cada poço homogeneizando bem;

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

Os resultados foram expressos através da construção de uma curva padrão linear com concentrações conhecidas de TNF- α , IL-8 e IL-1 β .

3.2.6. Avaliação e Quantificação de Morte Celular por Citometria de Fluxo

Foram utilizados dois protocolos para a verificação da morte celular através da leitura no citômetro de fluxo (FACS).

3.2.6.1. Externalização de Resíduos de Fosfatidilserina

As Anexinas compreendem um grupo de proteínas que se ligam a fosfolipídeos de membrana na presença de Ca^{2+} . A Anexina V liga-se com alta afinidade e especificidade à fosfatidilserina, uma molécula que quando localizada na face externa da membrana celular confere uma característica universal de células em apoptose (141).

Apoptose foi medida em neutrófilos ($1,7 \times 10^6$ células/mL) após cultura de 18 horas. Os neutrófilos foram ressuspensos em 500 μ L de tampão de Anexina (10 mM de hepes, 150 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de $MgCl_2$ e 1,8 mM de $CaCl_2$, pH 7,4), para remover todo o meio de cultura, e centrifugados a 200g por 10 minutos a 4°C. As células foram recuperadas e ressuspensas em 100 μ L de solução de Anexina V-FITC (isotiocianato de fluoresceína) (1,5 μ L de Anexina estoque em 1 mL

de tampão de Anexina) e incubadas por 15 minutos no escuro a temperatura ambiente. Após este período as células foram diluídas com 400 μL de tampão de Anexina e transferidas para tubos de polipropileno, onde foram adicionados 50 μL de PI (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e analisadas imediatamente. O índice de apoptose foi monitorado por citometria de fluxo. A porcentagem de células viáveis foi reconhecida como negativas para as duas marcações ($\text{FITC}^-/\text{PI}^-$), as células em apoptose inicial positivas para Anexina e negativas para PI ($\text{FITC}^+/\text{PI}^-$), e as células em apoptose tardia apresentaram as duas marcações positivas ($\text{FITC}^+/\text{PI}^+$). Utilizou-se o canal 1 (FL-1) para Anexina e canal 3 (FL-3) para PI. No mínimo 5.000 eventos foram contados por amostras.

3.2.6.2. Fragmentação de DNA

A fragmentação de DNA foi medida em neutrófilos após cultura de 18 horas. Os neutrófilos ($1,7 \times 10^6$ células/mL) foram ressuspensas em 250 μL de solução fluorocrômica (HFS, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de iodeto de propídio em 0,1% de citrato de sódio mais 0,1% Triton X-100) e incubadas por 1 hora no escuro entre 2-8 $^{\circ}\text{C}$. Após este período as células foram transferidas para tubos de polipropileno, e analisadas (142). O índice de fragmentação de DNA foi monitorado por citometria de fluxo. A porcentagem de DNA genômico marcado com PI foi usado como medida da fragmentação de DNA. Utilizou-se o canal de fluorescência 2 (FL-2) para PI.

3.2.7. Quantificação de AFMK e AMK em Cultura de Células

Neutrófilos, $2,5 \times 10^6$ células/mL (plaqueados em placas Nunc de fundo chato com 96 wells- volume final de 300 μL) foram submetidos a 0, 15 e 30 minutos e 1, 2, 4 e 18 horas de cultura, em presença de LPS mais melatonina em estufa com 5% de CO_2 a 37 $^{\circ}\text{C}$. Os sobrenadantes foram analisados por HPLC SHIMADZU SCL-10A vp acoplado a SPD-10A vp (*diode array*) e RF-10A xl (fluorescência). Alíquotas de 40 μL foram injetadas em coluna LC-18. As amostras foram eluídas com fluxo de 1,0 mL por minuto em fase móvel de acetonitrila : H_2O (25:75). AFMK foi detectado por fluorescência (excitação 340nm e emissão 460nm) e AMK por UV-VIS absorvância (254nm). As concentrações de AFMK e AMK foram determinadas através de curvas padrão preparadas a partir de concentrações conhecidas obtidas pela diluição de AFMK e AMK em RPMI (Figura-3). O limite de detecção (sinal/ruído = 3:1) foi 0,15 e

0,10 μM e o limite de quantificação (sinal/ruído = 10:1) foi 0,5 e 0,33 μM , para AFMK e AMK respectivamente (143). Nas condições utilizadas a relação do sinal com a concentração se mostrou linear para os dois compostos ($r = 0,9999$, $n = 10$, $p < 0,005$, para AFMK) e ($r = 0,9898$, $n = 10$, $p < 0,005$, para AMK) na faixa analisada (1,0-25,0 μM).

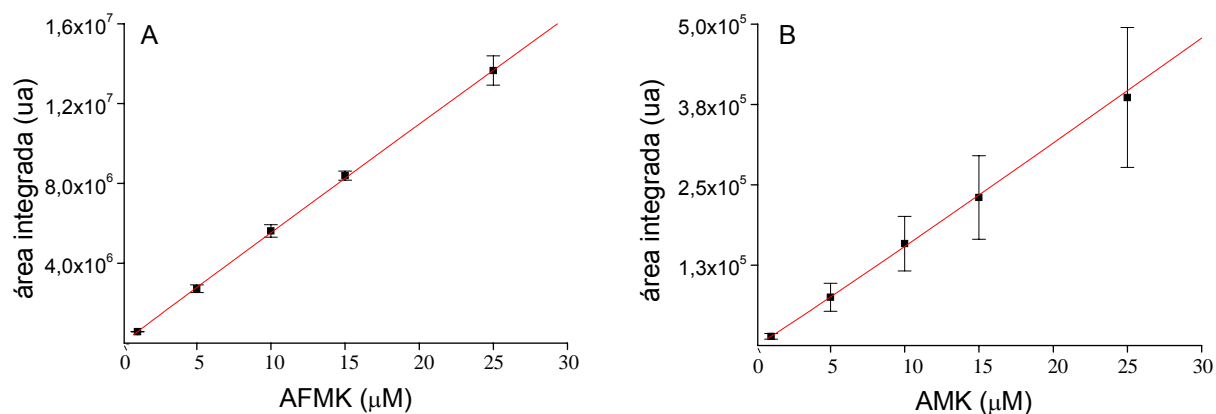
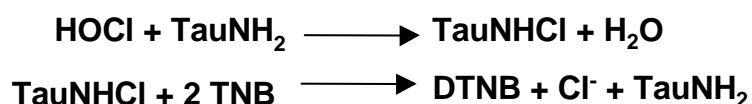


Figura-3: Área integrada de fluorescência (A) ou absorvância (B) versus concentração de AFMK e AMK obtidos em HPLC.

3.2.8. Determinação do HOCl

A formação de HOCl foi acompanhada por espectrofotometria baseada na formação de taurina-cloramina resultante da reação de ácido hipocloroso com taurina. Neutrófilos ($2,0 \times 10^6$ células/mL) ativados com zimozam opsonizado ($4,0 \times 10^7$ partículas/ensaio) em tampão fosfato 10mM (pH 7,4) contendo 140mM de NaCl, 1mM de CaCl_2 , 0,5mM de MgCl_2 e 1mg/mL de glicose foram incubados com taurina 15mM a 37°C sob agitação suave. A reação foi interrompida após 30 minutos pela adição de $20\mu\text{g/mL}$ de catalase e a mesma foi mantida em gelo por 5 minutos seguida de uma centrifugação (10 minutos, 12.000 g, 4°C). A concentração de taurina-cloramina presente no sobrenadante foi estimada pela oxidação do ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) a 5,5'-ditiobis ácido 2-nitrobenzoico (DTNB) medindo o decréscimo da absorvância de TNB a 412 nm como descrito (144), (Figura-4).



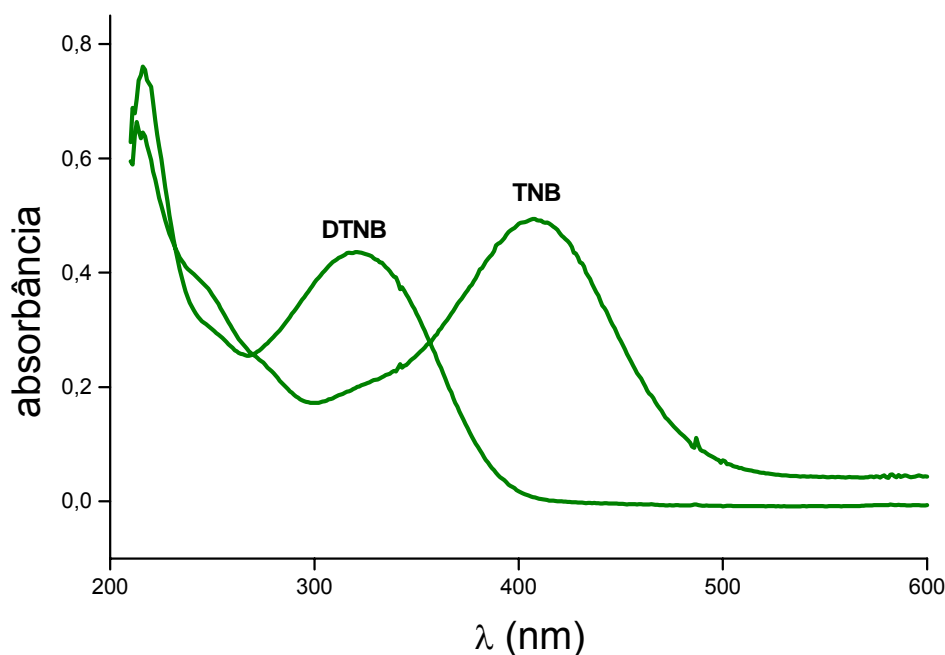


Figura-4: Oxidação do TNB a DTNB pela taurina-cloramina obtido por espectro de absorvância.

3.2.9. Quantificação de Melatonina e AFMK em Liquor

Amostras de 1,0 mL de liquor foram tratadas com 100 μ L de NaOH 4M e 10 mL de diclorometano (145). O material foi submetido à agitação intensa por 10 minutos seguido de centrifugação (2.700 g/10 minutos). Em seguida a fase orgânica (infranadante) foi recolhida, evaporada com nitrogênio, ressuspensa em 500 μ L de acetonitrila /H₂O (25:75) e submetida a análise por HPLC SHIMADZU SCL-10A vp acoplado a RF-10A xl (fluorescência). Alíquotas de 40 μ L foram injetadas em coluna LC-18. As amostras foram eluídas com fluxo de 1,0mL por minuto em fase móvel de acetonitrila : H₂O (25:75). Melatonina e AFMK foram detectados por fluorescência (excitação 228 ou 340nm e emissão 348 ou 460nm, respectivamente) (145). As concentrações de melatonina e AFMK foram determinadas através de curvas padrão preparadas a partir de concentrações conhecidas obtidas pela diluição de melatonina e AFMK em solução aquosa tratados da mesma maneira que os fluidos biológicos (Figura-5). O limite de detecção (sinal/ruído = 3:1) foi 3 e 10 nM e o limite de quantificação (sinal/ruído = 10:1) foi 10 e 50 nM, para melatonina e AFMK

respectivamente (143). Nas condições utilizadas a relação do sinal com a concentração se mostrou linear para melatonina ($r = 0.9985$, $n = 3$, $p < 0.0001$) na faixa de 10-30 nM e para AFMK ($r = 0.9999$, $n = 3$, $p < 0.0001$) na faixa de 50-500 nM. Para concentrações menores tanto de melatonina quanto de AFMK não se obteve reprodutibilidade nos sinais das áreas.

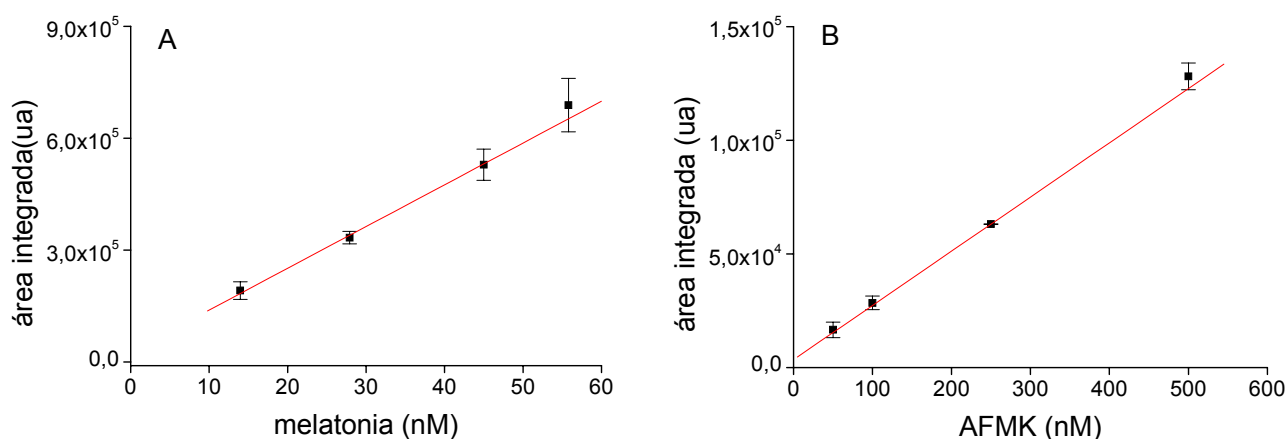


Figura-5: Área integrada de fluorescência *versus* concentração de melatonina (A), e AFMK (B) obtidos em HPLC. As amostras de melatonina e AFMK foram extraídas com diclorometano, evaporadas com nitrogênio e resuspendidas em 500 μ L de acetonitrila /H₂O (25:75).

3.2.9.1. Proteínas totais e Contagem total e Diferencial de Leucócitos no Líquor

-Proteínas totais foram dosadas pelo método de precipitação por ácido tricloroacético 5%

-A contagem de células totais nas amostras de líquor foi realizada em câmara de Fuchs-Rosenthal, e o perfil citomorfológico foi feito usando uma citocentrífuga ou uma câmara de citosedimentação (anexo 3).

3.2.10. Indução de Artrite

Foi realizada de acordo com procedimento já descrito por Brum Fernandes et al., (146) com algumas modificações. Os animais foram inicialmente imunizados com 1,0 mL de adjuvante completo de Freund contendo 5mg de albumina sérica bovina metilada (SABm) diluída em salina. Receberam um volume total de 2,0 mL desta

emulsão distribuídos em 2 injeções intramusculares (0,5 mL) na região glútea e mais 1,0 mL administrado por via subcutânea em 5 diferentes locais na região interescapular. Decorridos 7 dias, os animais tiveram o dorso tricotomizado e receberam 5 injeções intradérmicas de 0,2 mL de uma solução de SABm 0,1% em salina estéril apirogênica. A reação de Arthus subsequente foi avaliada macroscopicamente após 4 e 24 horas. Os animais foram considerados prontos para a injeção intrarticular do antígeno, quando desenvolveram em pelo menos um dos pontos injetados, uma área central de necrose, o que corresponde a uma reação de Arthus intensa (++++), pela classificação de Cochrane C.G. (147). Os animais que não apresentaram resposta foram novamente submetidos às injeções intradérmicas após uma semana. Quando a resposta desejada não foi obtida após 5 semanas consecutivas de imunização secundária, os animais foram retirados do experimento e sacrificados. Além da reação de Arthus positiva, controlou-se a titulação de anticorpos dos animais utilizados através de testes de imunodifusão radial em gel de agár, e só foram utilizados animais com titulação de anticorpos acima de 1/8. Uma semana após o resultado satisfatório da reação intradérmica, os animais receberam injeção de 0,5 mL de solução de SABm 0,2% em salina estéril apirogênica em ambos os joelhos. Após duas horas os animais receberam 200 µL do composto AFMK (0,26mg/mL) no joelho esquerdo (articulação experimental) e mesmo volume do diluente na articulação contralateral (controle).

3.2.10.1. Coleta de Líquido Sinovial

Após 24 horas, os animais foram anestesiados com um solução de xilazina (5 mg/kg) associado com quetamina (50 mg/kg) por via intramuscular, em seguida sacrificados com uma injeção edovenosa de 2,0 mL de KCl 20%. O líquido sinovial foi coletado através da lavagem da cavidade articular com uma solução de salina contendo 1mg/mL de EDTA e aspiração com seringa. O material retirado foi colocado em tubos de prolipropileno imersos em banho de gelo e uma alíquota de 50 µL usada para contagem global de células em câmara de Neubauer. O restante foi centrifugado a 150 g a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante, após a avaliação da quantidade de azul de Evans presente, foi alíquotado em tubos de Eppendorf e estocados a -70°C para análises posteriores.

3.2.10.2. Contagem Total e Diferencial de Leucócitos no Lavado Sinovial

Alíquotas de 50 μ L dos lavados sinoviais foram diluídas em 450 μ L de salina e o número total de células contados em câmara de Neubauer. Após a centrifugação do lavado sinovial e retirada do sobrenadante, o botão celular foi ressuspendido em salina e as células colocadas em lâminas para a realização de esfregaços. As lâminas foram coradas pelo método de Leishman (148) e a contagem diferencial de leucócitos realizada sob microscopia ótica.

3.2.11. Análise Estatística

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.

4. Resultados

4.1. Efeito da reação de oxidação da melatonina e de seus produtos de oxidação, AFMK e AMK, sobre neutrófilos: ensaios *in vitro*

4.1.1. Efeito de melatonina, AFMK e AMK sobre a produção de HOCl em neutrófilos

Em trabalho desenvolvido pelo grupo (149) observamos que melatonina, AFMK e AMK (0,1 e 1mM) não alteram a fagocitose mas afetam o *killing* de *S. aureus*. Após 60 minutos de incubação, o índice de *killing* diminui 38, 28 e 37% na presença de 1mM de melatonina, AFMK e AMK, respectivamente (149).

Considera-se que a atividade microbicida de neutrófilos dependa, pelo menos em parte, da produção de ERO. Dentre as ERO produzidas por neutrófilos, o HOCl é a espécie com maior atividade microbicida. HOCl, como já explicitado, é formado em uma reação catalisada por MPO. Assim, na presença de bons substratos de MPO, por exemplo, melatonina e AMK, poderia se esperar uma redução na produção de HOCl resultando em um comprometimento da atividade microbicida. Além desta possibilidade, como melatonina reage eficientemente com algumas ERO (33-31) e ERN (32) é razoável supor que reaja também com HOCl, o que explicaria o efeito de melatonina sobre o *killing* de neutrófilos. Neste sentido nós determinamos a produção de HOCl por neutrófilos ativados em presença de melatonina e seus produtos de oxidação, AFMK e AMK, através de espectrofotometria baseada na formação de taurina-cloramina resultante da reação de ácido hipocloroso com taurina (Figuras 6 e 7). A concentração de taurina-cloramina presente no sobrenadante foi estimada pela oxidação do TNB a DTNB, medindo o decréscimo da absorvância de TNB a 412 nm (Material e Métodos).

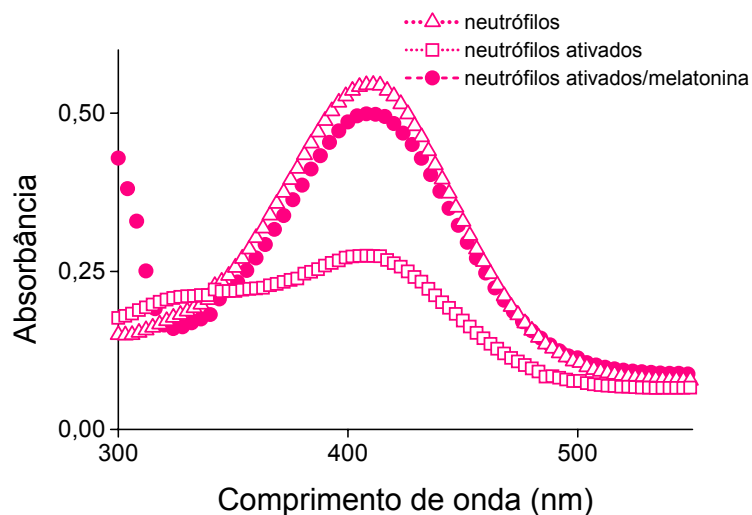


Figura-6: Determinação da formação de HOCl por neutrófilos ($2,0 \times 10^6$ células/mL) ativados com zimozam opsonizado ($4,0 \times 10^7$ partículas/mL) com ou sem melatonina (1mM) obtido através do espectro de absorvância do TNB. Este é um exemplo representativo de 4 experimentos com diferentes preparações de neutrófilos.

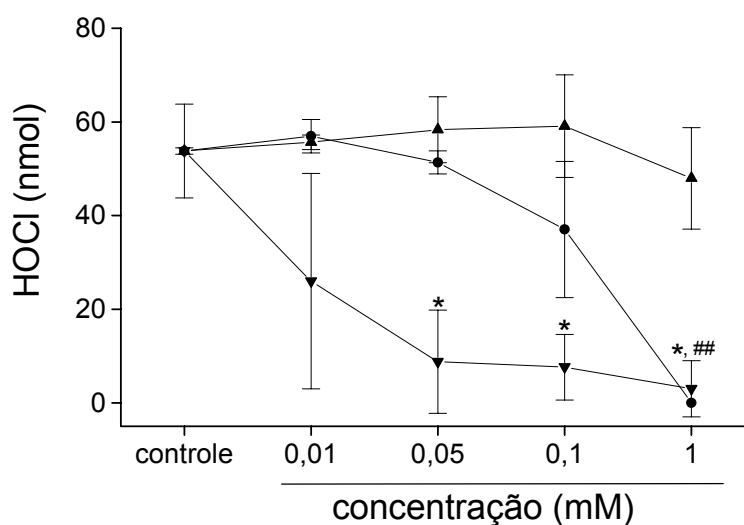


Figura-7: Efeito da concentração de melatonina (▼), AFMK (▲) e AMK (●) sobre a produção de HOCl em neutrófilos ativados ($2,0 \times 10^6$ células/mL) com zimozam opsonizado ($4,0 \times 10^7$ partículas/mL). Estes dados representam a média \pm EP de 4 experimentos. (* equivale a $p \leq 0,05$ para melatonina e ## $p \leq 0,005$ para AMK quando comparados com o grupo controle).

Como esperado melatonina (1mM) inibiu a formação de HOCl promovido por neutrófilos ativados com zimozam opsonizado (Figura-6). O mesmo foi observado quando neutrófilos foram ativados com PMA (dados não mostrados). A inibição da

formação de HOCl depende da concentração de melatonina (Figura-7). Uma forte inibição da formação de HOCl foi observada em concentrações de melatonina igual ou superior a 0,05 mM. AMK inibiu a formação de HOCl somente em altas concentrações (1 mM) enquanto AFMK não afetou a formação de HOCl (Figura-7). É importante notar que melatonina, AFMK e AMK, em nossa condição experimental, por si só não reagiram diretamente com HOCl em quantidades expressivas (dados não mostrados).

Para verificar se a presença de bactéria modifica a inibição da formação de HOCl causada por melatonina, a produção de HOCl foi determinada quando *S. aureus* foi incubado com neutrófilos e melatonina (Figura-8).

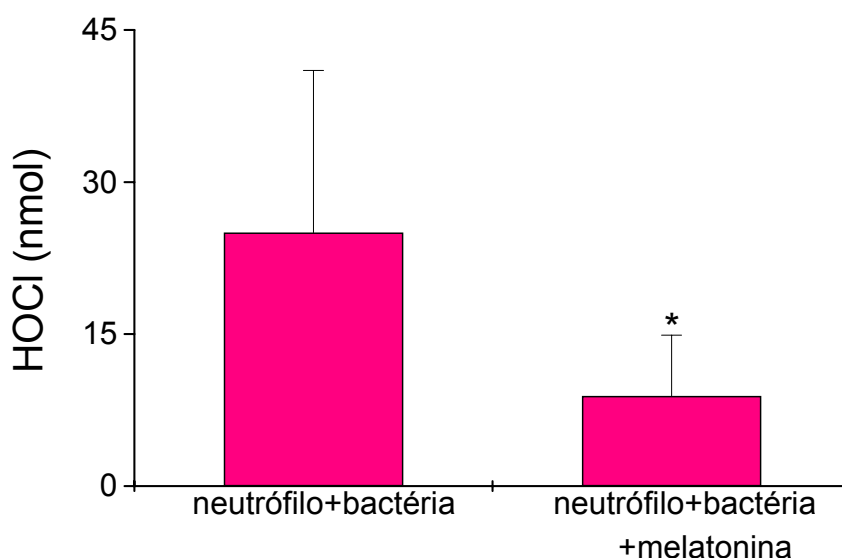


Figure-8: Efeito de melatonina (1,0mM) sobre a produção de HOCl em neutrófilos ativados ($2,0 \times 10^6$ células/mL) com *S. aureus* ($1,0 \times 10^8$ bactérias/mL). Estes dados representam a média \pm EP de 3 experimentos. (* equivale a $p \leq 0,05$ quando comparados com o grupo controle).

A Figura-8 mostra que *S. aureus* como estímulo não alterou o efeito observado anteriormente, ou seja, melatonina diminuiu a formação de HOCl por neutrófilos. Melatonina (1,0mM) isoladamente não modificou a viabilidade da bactéria (dado não mostrado).

4.1.2. Efeito de melatonina, AFMK e AMK sobre a liberação de TNF- α e IL-8 por neutrófilos ativados por LPS

Visando avaliar a função da melatonina e seus metabólitos na mediação do processo inflamatório, foi avaliada a liberação de citocinas por neutrófilos ativados. Dentre as citocinas passíveis de serem analisadas escolhemos TNF- α e IL-8. Estas citocinas são mediadores inflamatórios responsáveis pela ativação e recrutamento de leucócitos (116,150) que direcionam a progressão do processo inflamatório.

As citocinas foram dosadas em sobrenadantes de cultura de neutrófilos (18 horas). O efeito de melatonina, AFMK e AMK em presença ou não de LPS sobre a liberação de TNF- α e IL-8 é mostrado na Figura-9 e Figura-10, respectivamente.

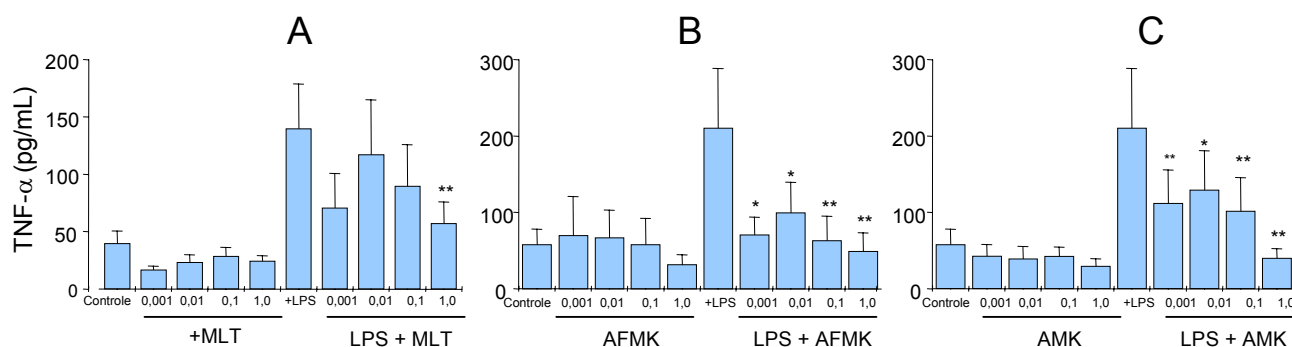


Figura-9: Efeito de melatonina (A), AFMK (B) e AMK (C) (0,001; 0,01; 0,1 ou 1,0 mM) sobre a liberação de TNF- α por neutrófilos (PMN) ($2,5 \times 10^6$ células/mL) com ou sem LPS ($1 \mu\text{M}$). As citocinas foram medidas no sobrenadante da cultura após 18 h de incubação por ELISA. Estes dados representam a média \pm EP de 5 experimentos. (* equivale a $p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,005$ para diferente de neutrófilo/LPS).

Melatonina, AFMK e AMK (0,001-1mM) não afetaram significativamente a produção basal de TNF- α por neutrófilos (Figura-9). Em neutrófilos ativados por LPS, AFMK e AMK inibiram a liberação de TNF- α em todas as concentrações ensaiadas (Figuras-9B e 9C), enquanto melatonina inibiu somente com 1mM (Figura-9A).

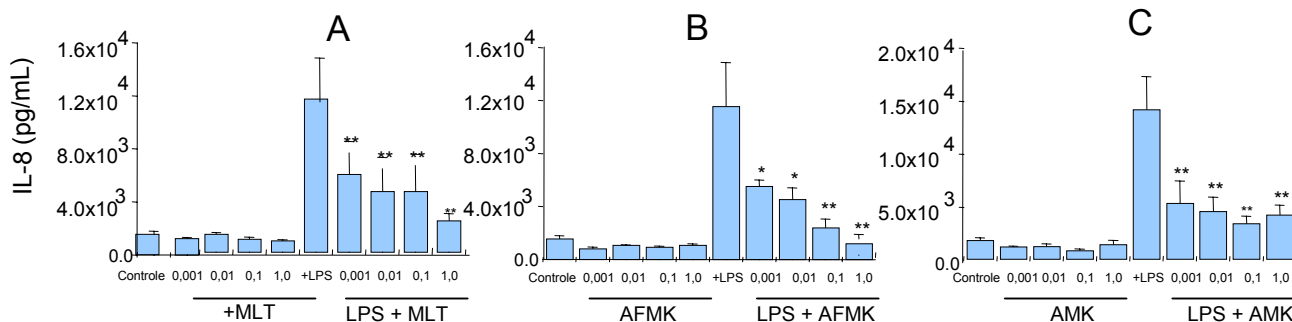


Figura-10: Efeito de melatonina (A), AFMK (B) e AMK (C) (0,001; 0,01; 0,1 ou 1,0mM) sobre a liberação de IL-8 por neutrófilos (controle) ($2,5 \times 10^6$ células/mL) com ou sem LPS ($1 \mu\text{mL}$). As citocinas foram medidas no sobrenadante da cultura após 18 h de incubação por ELISA. Estes dados representam a média \pm EP de 5 experimentos. (* equivale a $p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,005$ para diferente de neutrófilo/LPS).

Melatonina, AFMK e AMK, na faixa analisada (0,001-1mM), não afetaram significativamente a produção basal de IL-8 por neutrófilos (Figura 10). Entretanto, em neutrófilos ativados com LPS estes compostos inibiram fortemente a liberação de IL-8. Por exemplo, um decréscimo de mais de 50% foi observado com a menor concentração testada para cada composto (0,001 mM). Este efeito inibitório foi dose dependente e o composto mais efetivo foi o AFMK onde 1 mM inibiu completamente a liberação de IL-8 por neutrófilos (Figura 10B).

A inibição da liberação de TNF- α e IL-8 por neutrófilos ativados mediada por altas concentrações de melatonina, AFMK e AMK, deixa evidente que estes compostos são biologicamente ativos, pelo menos, no controle da liberação de citocinas. Neste sentido, avaliamos a possibilidade deste efeito ocorrer também em concentrações menores destes compostos ($< 1 \mu\text{mol/L}$).

Nossos resultados mostraram que concentrações abaixo de $1 \mu\text{mol/L}$ não afetam a liberação de TNF- α e IL-8 (dados não mostrados).

4.1.3. Cinética de formação de AFMK e AMK a partir da oxidação de melatonina por neutrófilos ativados por LPS e PMA

Considerando que o produto principal da oxidação da melatonina por neutrófilos ativados via PMA em tampão fosfato salino é o AFMK (2), e que a deformilação deste composto leva ao AMK, pode-se esperar que a redução na

liberação de TNF- α e IL-8 pelo sistema melatonina/neutrófilo/LPS tenha a contribuição de ambos, AFMK e AMK. Seguindo o mesmo raciocínio esperamos ainda a contribuição de AMK no sistema AFMK/neutrófilo/LPS. Para verificarmos se estas contribuições existem quantificamos estes produtos, ou seja, identificamos e dosamos AFMK e AMK nas mesmas condições empregadas na dosagem de citocinas. Para tanto o sobrenadante recuperado após 0, 15, e 30 minutos e 1, 2, 4 e 18 horas das culturas de neutrófilos mantida em RPMI-1640 na presença de 0,1 mM de melatonina e 1,0 μ g/mL de LPS foi analisado por HPLC. Para efeito comparativo foram feitos experimentos com neutrófilos ativados com PMA (55ng/mL). A Figura-11 mostra um cromatograma obtido a partir do sobrenadante de cultura de 18 horas de neutrófilo ativado com PMA em presença de melatonina. A cinética de formação de AFMK e AMK e a concentração destes compostos obtida nestas culturas foi calculada pela curva padrão mostrada em Material e Métodos (Figura-12).

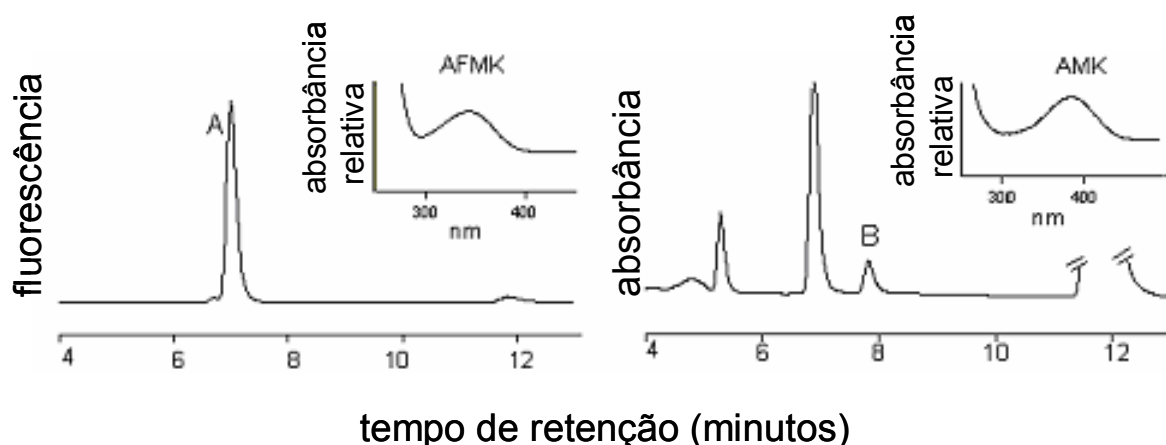


Figure-11: Cromatograma representativo de AFMK (A) e AMK (B) em sobrenadante de cultura de neutrófilos (2.5×10^6 células/mL) ativados com PMA (55 ng/mL) em presença de melatonina (0.1 mM) mantidos em RPMI por 18 horas. AFMK e AMK foram detectados por fluorescência (λ_{ex} 340, λ_{em} 460 nm) e absorbância (254 nm) respectivamente. Os inserts mostram o espectro UV-VIS de AFMK e AMK.

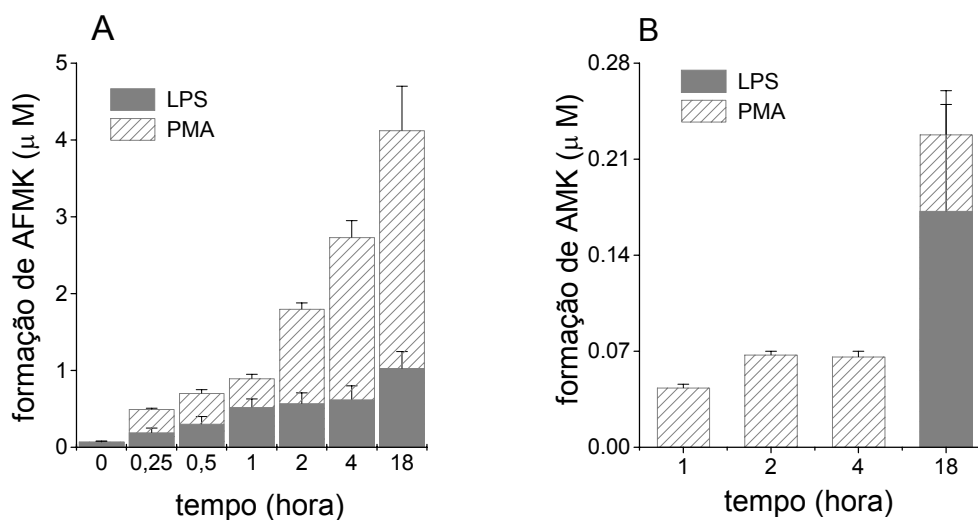


Figura-12: Cinética de formação de AFMK (A) and AMK (B) a partir da oxidação de melatonina (0,1 mM) por neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) ativados com LPS (1µg/mL) ou PMA (55ng/mL) após incubação de 0, 15, e 30 minutos e 1, 2, 4 e 18 horas em RPMI. Estes dados representam a média \pm EP de 3 experimentos.

A condição cromatográfica utilizada possibilitou uma separação eficiente e uma quantificação sensível de AFMK e AMK (Figura-11). Tanto AFMK por sua característica fluorescente, a qual não é usualmente encontrada em derivados indólicos biológicos como triptofano, serotonina e melatonina, quanto AMK com espectro de absorvância centrado em 380nm puderam ser reconhecidos.

A cinética de formação de AFMK e AMK mostrou que neutrófilos ativados com LPS ou PMA converteram melatonina em AFMK (Figura 12A). AMK, o produto esperado a partir da deformilação do AFMK, também foi formado (Figura-12B). A formação de AFMK pôde ser observada em tempos curtos de incubação e foi progressiva com o tempo. Na ausência de estímulo a produção de AFMK em 18 horas foi aproximadamente 20% daquela produzida em presença de LPS enquanto AMK não foi detectado (dados não mostrados). A concentração de AMK nas culturas foi relativamente baixa quando comparada com o seu precursor AFMK. A ativação de neutrófilos com PMA produziu concentrações maiores de AFMK e AMK do que ativação com LPS.

4.1.4. Efeito de melatonina, AFMK e AMK sobre a apoptose de neutrófilos

O estudo do efeito de melatonina e seus produtos de oxidação sobre a apoptose de neutrófilos tornou-se ainda mais importante face aos resultados mostrados no item 4.1.2. O fato de melatonina e seus metabólitos inibirem a liberação de IL-8 e TNF- α poderiam ser secundários a um efeito citotóxico destes compostos que levasse à perda de viabilidade celular. Neste sentido realizamos ensaios para avaliarmos a viabilidade dos neutrófilos frente a melatonina utilizando microscopia óptica. Fizemos experimentos com diferentes tempos de incubação de célula com melatonina (tempo zero e 2 horas) e presença ou não de estímulo (PMA) (Figura-13).

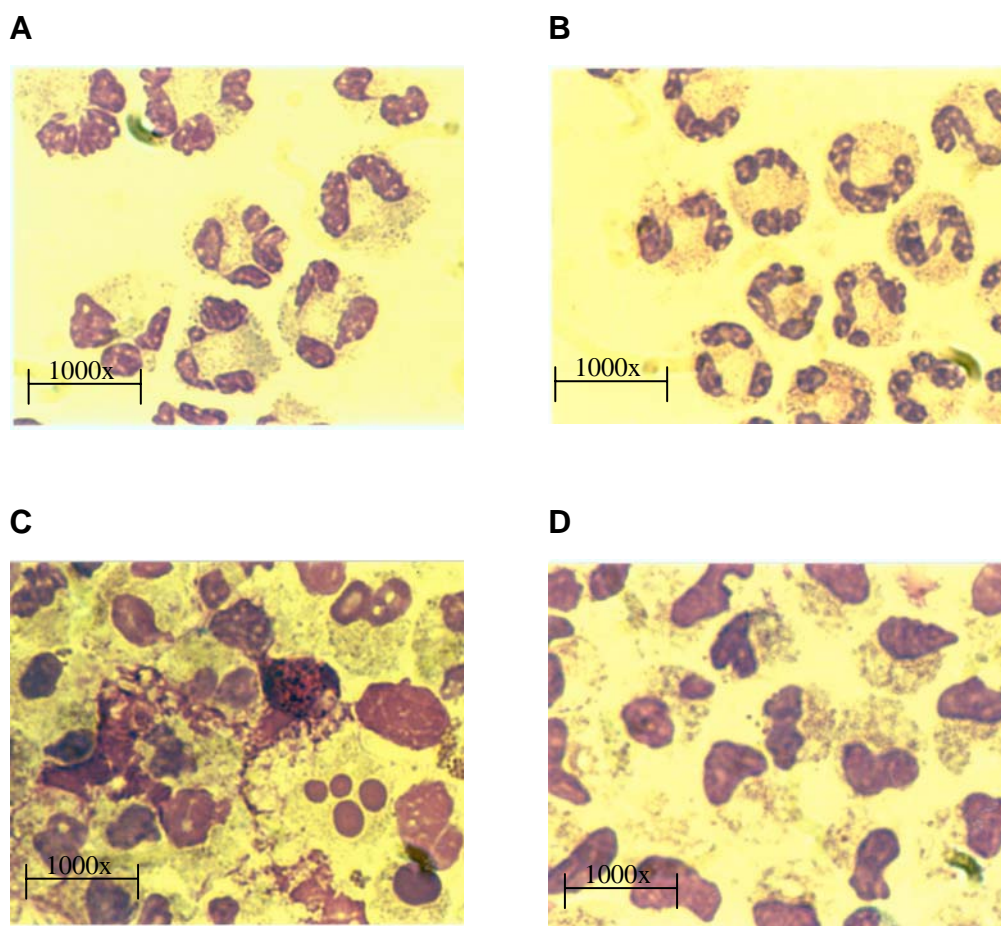


Figura-13: Neutrófilos ($2,0 \times 10^6$ células/mL) estimulados com PMA (53 ng/mL) após 2 horas de incubação com ou sem melatonina (1 mM). Os controles também são mostrados. **A:** PMN; **B:** PMN/melatonina; **C:** PMN/PMA; **D:** PMN/PMA/melatonina. Este é um exemplo representativo de 2 experimentos com diferentes preparações de neutrófilos.

Observamos após 2 horas de incubação, ainda que preliminarmente, uma diminuição na vacuolização celular e uma diminuição de núcleos picnóticos na presença de melatonina (Figura-13B).

Para obtermos informações mais precisas a respeito da função da melatonina e também de AFMK e AMK sobre a viabilidade de neutrófilos realizamos ensaios de apoptose celular através da marcação com Anexina/PI e ensaios de fragmentação de DNA do núcleo celular através de marcação com PI. As Figuras 14 e 15 mostram respectivamente um histograma representativo de apoptose e fragmentação de DNA nuclear constitutiva de neutrófilos analisados imediatamente após o seu isolamento e após 18 horas de cultura. O efeito de melatonina, AFMK e AMK sobre a morte de neutrófilos e sobre a fragmentação de DNA de neutrófilos são mostrados nas Figuras 16 e 17 respectivamente.

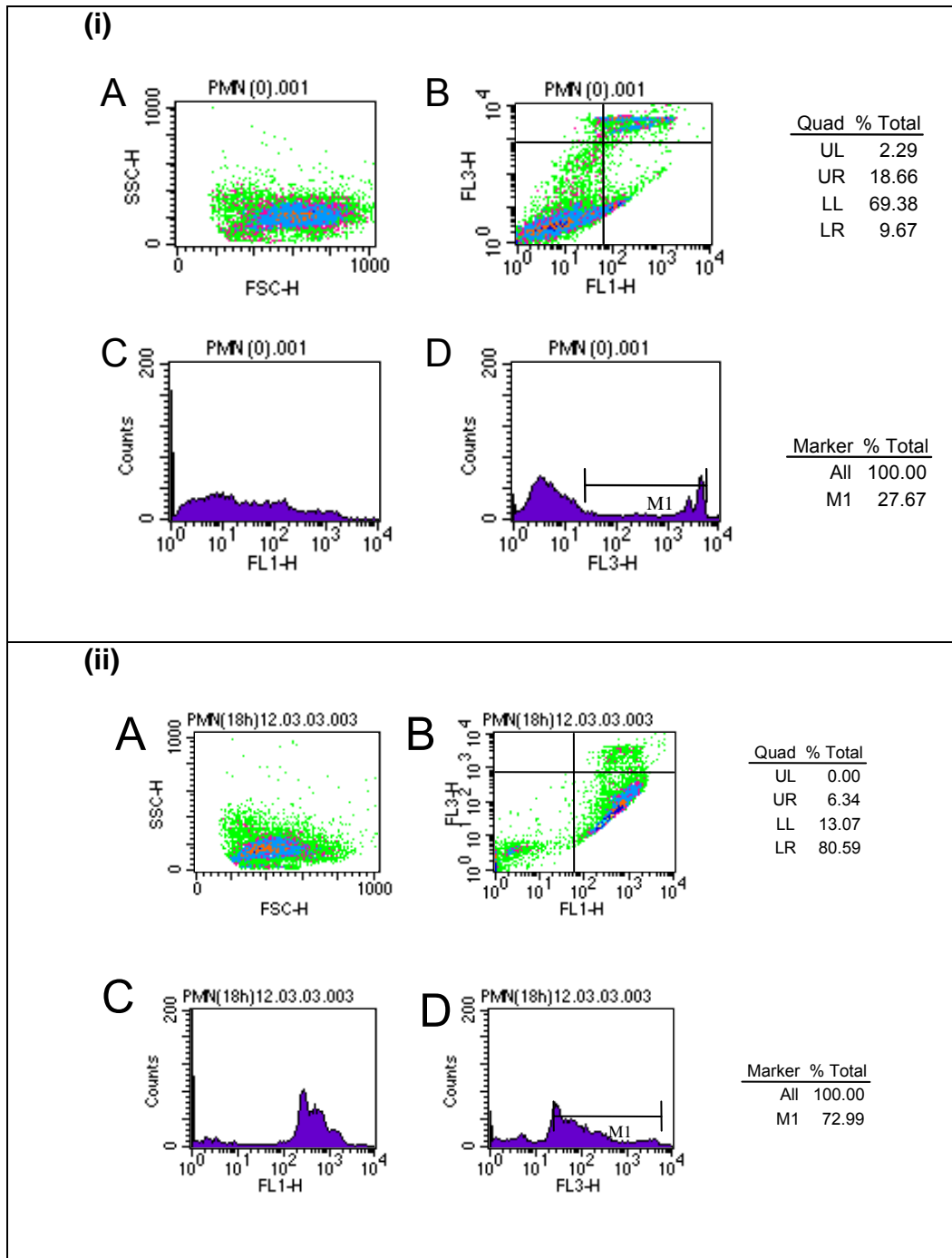


Figura-14: Histogramas representativos de neutrófilos marcados com Anexina V-FITC e PI após zero (i) e 18 horas de incubação (ii). Tamanho/granulosidade (A); Anexina/PI (B); Anexina (C); e PI (D). Consideram-se células viáveis aquelas com marcação negativa para Anexina e PI (LL, *Low Left*) (FITC⁻/PI⁻), células em apoptose inicial com marcação positiva para Anexina e negativa para PI (LR, *Low Right*) (FITC⁺/PI⁻), e células em apoptose tardia com as duas marcações positivas (UR, *Up Right*) (FITC⁺/PI⁺). O índice de apoptose de neutrófilo foi monitorado por citometria de fluxo.

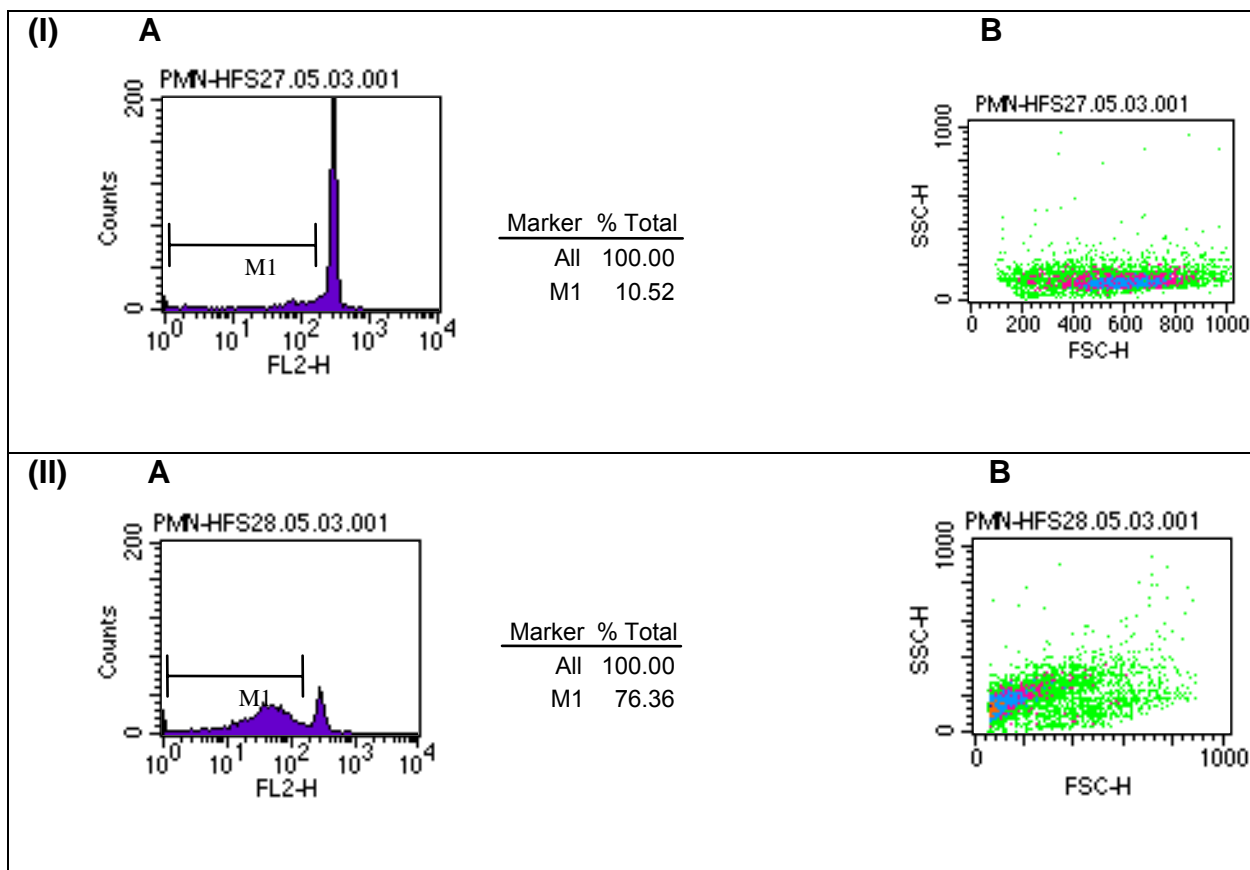


Figura-15: Histogramas representativos de fragmentação de DNA genômico de neutrófilo marcado com PI após zero (i) e 18 horas de incubação (ii). Tamanho/granulosidade (A); PI (B). O índice de fragmentação de DNA foi monitorado por citometria de fluxo.

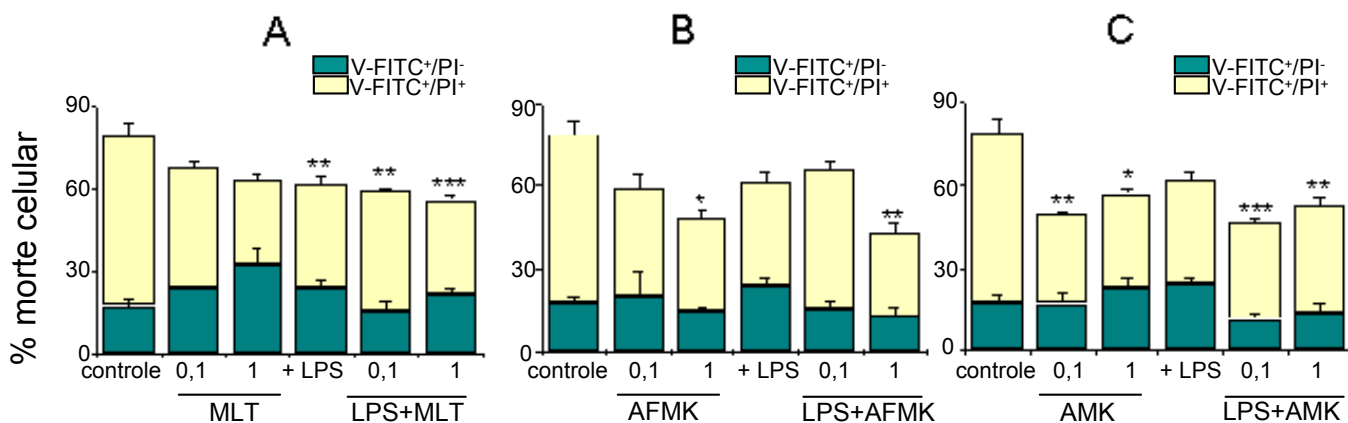


Figura-16: Efeito de melatonina (A), AFMK (B) e AMK (C) (0,1 ou 1,0 mM) sobre a morte de neutrófilos ($1,7 \times 10^6$ células/mL, marcados com Anexina V-FITC e PI). Após 18h de cultura duas subpopulações de neutrófilos foram identificadas: células em apoptose inicial com marcação positiva para Anexina e negativa para PI (FITC⁺/PI⁻), e células em apoptose tardia com as duas marcações positivas (FITC⁺/PI⁺). O índice de apoptose foi monitorado por citometria de fluxo. Este gráfico é representativo de 4 experimentos e a média \pm EP de 1 experimento em triplicata. (* equivale a $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$ e *** $p \leq 0,001$ quando comparados com o grupo controle).

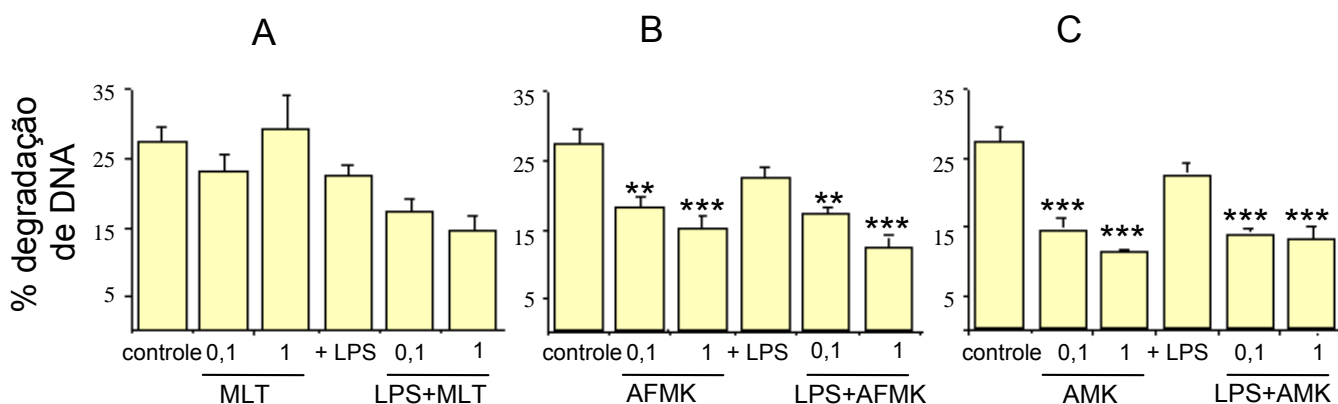


Figura-17: Efeito de melatonina (A), AFMK (B) e AMK (C) (0,1 ou 1,0 mM) sobre a degradação de DNA de neutrófilos ($1,7 \times 10^6$ células/mL, marcados com PI) após incubação de 18h. O índice de degradação de DNA foi monitorado por citometria de fluxo. Este gráfico é representativo de 4 experimentos e a média \pm EP de 1 experimento em triplicata. (* equivale a $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$ e *** $p \leq 0,001$ quando comparados com o grupo controle).

Neutrófilos são constitutivamente apoptóticos e após 18 h de cultura aproximadamente 80% das células já iniciaram o processo de apoptose. A morte celular representa os resultados de apoptose inicial e tardia. Quando esses dados

são analisados em conjunto pode se observar que nenhum dos três compostos, melatonina, AFMK e AMK, aumentaram a morte dos neutrófilos, pelo contrário, AFMK e AMK, protegeram os neutrófilos de morte celular (Figura-16). Por exemplo, um decréscimo de aproximadamente 25% na morte celular foi observado com 1mM de AFMK e AMK (Figuras 16B e 16C). Para os ensaios de fragmentação de DNA pôde ser observado que as duas concentrações testadas de AFMK e AMK (0,1 e 1mM) inibiram significativamente a fragmentação do DNA genômico de neutrófilos após cultura de 18 horas (Figura 17B e 17C), enquanto melatonina mais uma vez não teve efeito. O efeito protetor de AFMK e AMK foi, no mínimo, similar ao efeito do LPS, um inibidor conhecido de apoptose, pois não houve sinergismo entre AFMK/AMK e LPS.

4.2. Processo inflamatório e a oxidação de melatonina *in vivo*

4.2.1. Dosagens de melatonina e AFMK em liquor

Visando verificar a ocorrência da reação de oxidação da melatonina *in vivo*, durante o processo inflamatório e em uma condição analítica simples, padronizamos dosagens de melatonina e AFMK em fluidos biológicos por HPLC.

Foram analisadas 20 amostras de liquor de pacientes com meningite viral, e 8 amostras controle. As amostras foram purificadas e concentradas a partir de um processo de extração com diclorometano com o objetivo de amplificar os sinais de fluorescência de melatonina e AFMK. A Figura-18 apresenta três cromatogramas com o objetivo de mostrar e identificar a presença de AFMK nas amostras de liquor com meningite viral.

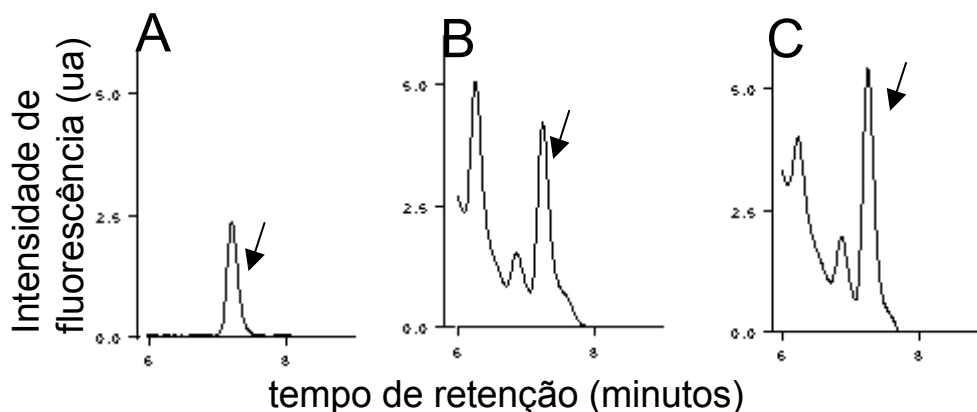


Figura-18: Cromatograma representativo obtido por HPLC de 100nM de AFMK sintetizado (A), amostra de liquor de paciente com meningite viral (B) e o mesmo que B mais 100 nM de AFMK sintetizado (C). As setas indicam AFMK em todos os cromatogramas. As amostras foram extraídas como descrito em Material e Métodos.

Na maioria das amostras de liquor dos pacientes com meningite viral foi identificado um pico com o mesmo tempo de retenção que o padrão de AFMK. A identidade destes picos foi confirmada por contaminação com padrão de AFMK (Figura-18). Uma identificação mais rigorosa foi realizada por espectrometria de massa ($[M+H^+]$ $m/z = 265$ usando eletrospray (ES/MS).

As concentrações de melatonina e AFMK nas amostras analisadas foram determinadas através de curvas padrão construídas a partir de melatonina comercial e AFMK sintetizado, ambos extraídos com diclorometano. Nossas condições permitiram estabelecer um limite de detecção (sinal/ruído = 3:1) 3 e 10 nM e um limite de quantificação (sinal/ruído = 10:1) 10 e 50 nM, para melatonina e AFMK respectivamente. A recuperação de melatonina e AFMK após a extração foi de 60%. Nas condições utilizadas a relação do sinal com a concentração se mostrou linear para melatonina ($r = 0.9985$, $n = 3$, $p < 0.0001$) na faixa de 10-30 nM e para AFMK ($r = 0.9999$, $n = 3$, $p < 0.0001$) na faixa de 50-500 nM (Figura-5 Mateial e Métodos). Para concentrações menores, tanto de melatonina quanto de AFMK, não se obteve reprodutibilidade nos sinais das áreas. A detecção e quantificação de melatonina e AFMK nas amostras de liquor são mostradas na Figura-19.

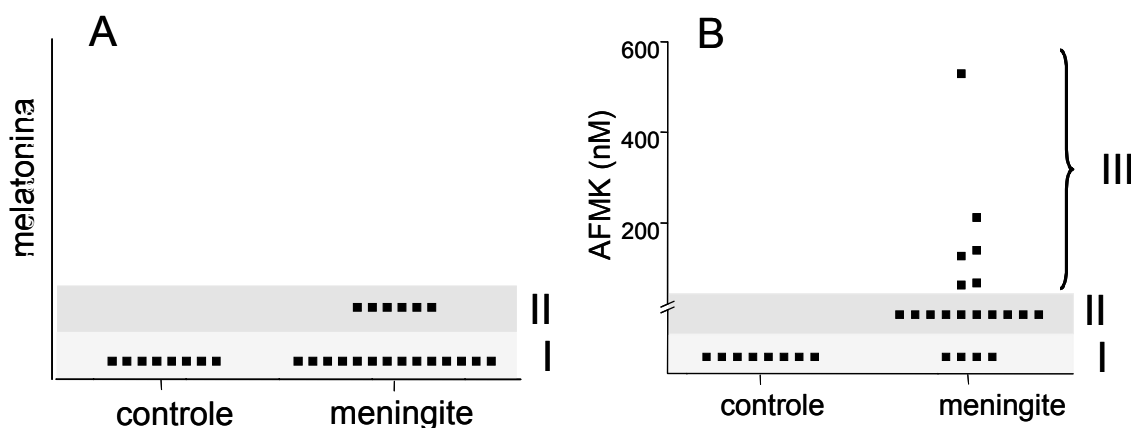


Figura-19: Análise de melatonina e AFMK em amostras de liquor por HPLC. Melatonina e AFMK não foram detectados nas amostras controle (n=8). As amostras de liquor de pacientes com meningite viral foram classificadas em grupos. O grupo I representa melatonina (n=14) (A) ou AFMK (n=4) (B) não detectados, o grupo II representa melatonina (n=6) (A) ou AFMK (n=10) (B) detectados, mas não quantificados e o grupo III representa AFMK quantificado em concentrações ≥ 50 nM.

Das 8 amostras controle nenhuma apresentou sinal de fluorescência para melatonina ou AFMK. Melatonina foi detectada em 6 e AFMK em 16 das 20 amostras de liquor de pacientes com meningite viral. Para melatonina, nenhuma das 6 amostras detectadas pode ser quantificada pois a concentração de melatonina estava abaixo do limite de quantificação (≥ 10 nM) (Figura-19A). Para AFMK, do total de 16 amostras detectadas, 6 foram quantificadas com concentrações variando entre 50 e 500nM (Figura-19B). A análise quantitativa de AFMK não foi possível em todas as amostras pois o limite de quantificação estabelecido foi de concentrações ≥ 50 nM.

Baseado nos dados acima foi definido na Figura 19 A duas regiões: grupo I, relativo às amostras onde melatonina não foi detectada e grupo II, relativo às amostras onde melatonina foi detectada, mas não quantificada. Para AFMK (Figura 19 B) foram definidas três regiões: grupo I, relativo às amostras onde AFMK não foi detectado, grupo II, relativo às amostras onde AFMK foi detectado, mas não quantificado e grupo III, relativo às amostras onde AFMK foi quantificado com concentrações variando entre 50 e 500nM.

4.2.2. Correlação entre a presença de melatonina ou AFMK no liquor com parâmetros inflamatórios como: celularidade, concentração de proteínas, TNF- α , IL-8 e IL-1 β

É importante notar que embora as amostras de liquor tenham sido coletadas em diferentes momentos do dia não foi evidenciada nenhuma correlação entre a concentração de AFMK nas amostras com o ciclo claro/escuro. Para obtermos informações a respeito da função de melatonina e AFMK nas amostras de liquor, estudamos a correlação entre estes dois compostos com alguns parâmetros inflamatórios como: celularidade (Figura-20), concentração de proteínas (Figura-21), TNF- α , IL-8 e IL-1 β (Figura-22, dados apresentados somente para AFMK). Para isso nós consideramos, além do grupo controle, os mesmos três grupos mencionados acima, ou seja, analíto não detectado (grupo I), detectado, mas não quantificado (grupo II) e quantificado (AFMK \geq 50nM) (grupo III).

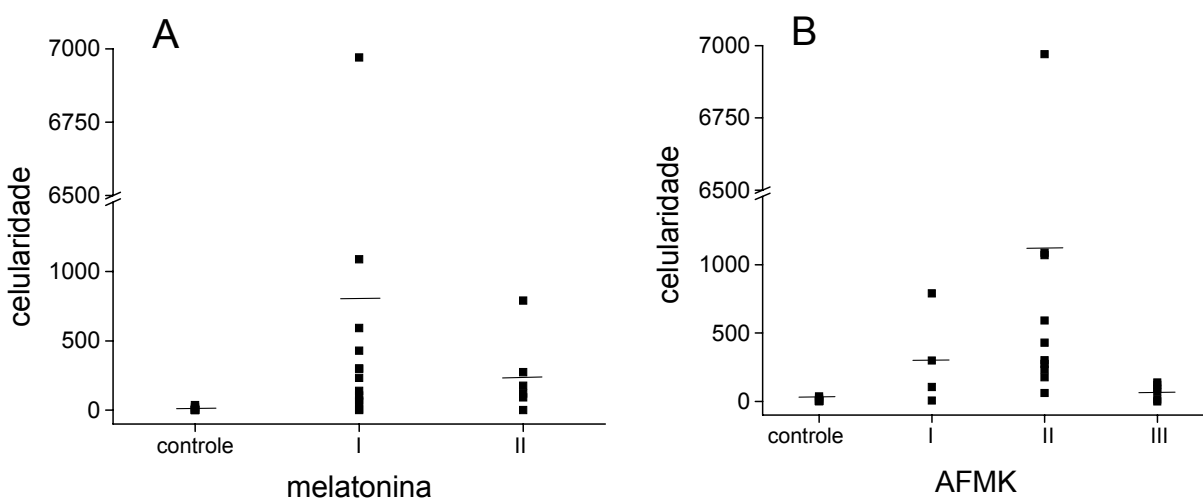


Figura-20: Celularidade *versus* presença de melatonina (A) ou AFMK (B) em amostras de liquor. Consideramos, além do grupo controle, os grupos: analíto não detectado (grupo I), detectado mas, não quantificado (grupo II) e quantificado (AFMK \geq 50nM) (grupo III).

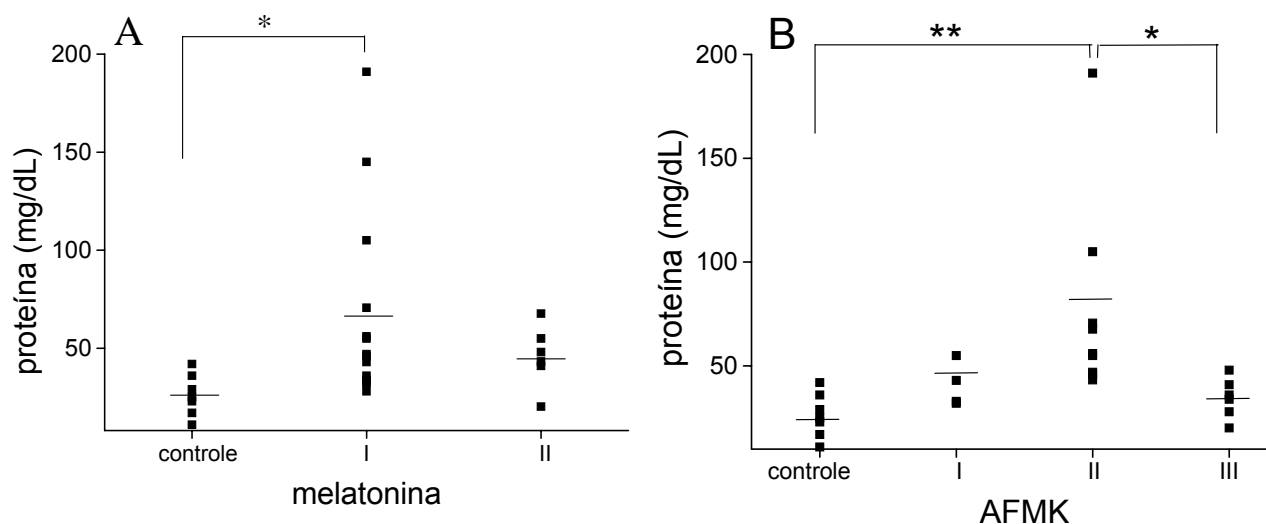


Figura-21: Concentração de proteína *versus* presença de melatonina (A) ou AFMK (B) em amostras de liquor. Consideramos, além do grupo controle, os grupos: analíto não detectado (grupo I), detectado mas, não quantificado (grupo II) e quantificado (AFMK \geq 50nM) (grupo III). (* equivale a $p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,005$).

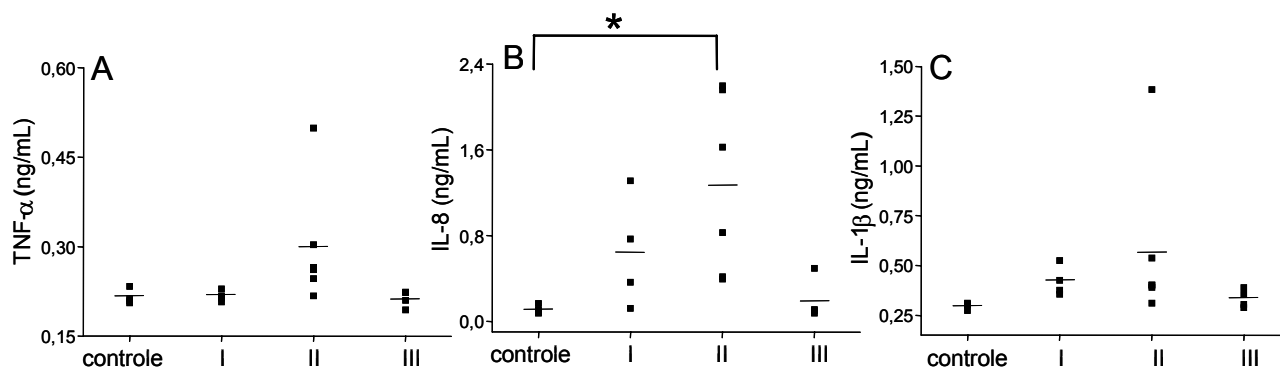


Figura-22: Dosagem de TNF- α (A), IL-8 (B) e IL-1 β (C), em amostras de liquor. Consideramos, além do grupo controle, os grupos: AFMK não detectado (I), detectado, mas não quantificado (II) e quantificado (\geq 50nM) (III). (* equivale a $p \leq 0,05$).

Observamos que o grupo II mostrou os maiores valores de número de células (Figura-20) e concentração de proteínas (Figura-21). O grupo III mostrou uma distribuição e uma média de valores muito similar ao grupo controle (Figuras 20 e 21). O mesmo comportamento foi observado para as citocinas pró-inflamatórias (Figura-22), onde o grupo II e o grupo controle mostraram uma diferença estatística, especialmente para IL-8.

4.2.3. Efeito de AFMK em artrite induzida em coelhos

A presença de AFMK em amostras de líquor de pacientes com meningite viral e sua correlação com parâmetros inflamatórios adicionado ao efeito de AFMK observado nos ensaios *in vitro* leva-nos a concluir que AFMK tem propriedades antiinflamatórias. Dessa forma para ampliarmos o estudo da função deste composto em processos inflamatórios avaliamos em colaboração com a Professora Suzana Beatriz Veríssimo de Melo da FMUSP o efeito de AFMK sobre um modelo experimental de artrite induzida em coelhos. Como esperado, observamos uma diminuição significativa na celularidade dos líquidos sinovial tratados com AFMK (Figura-23).

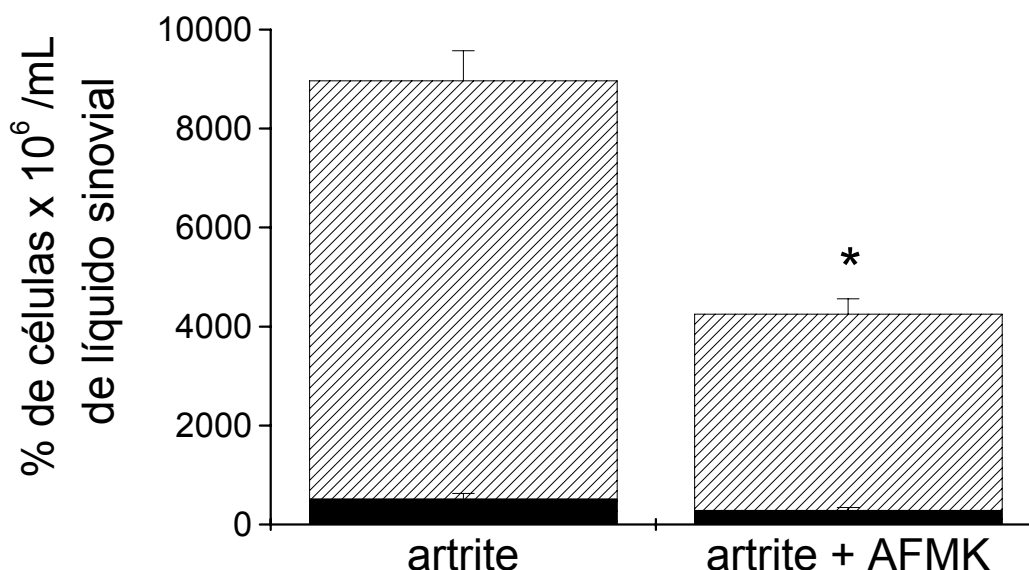


Figura-23: Contagem diferencial de leucócitos (neutrófilos ■ e monócitos ■) na cavidade articular de coelhos com artrite induzida por antígeno após 24 horas. Os animais tiveram artrite induzida nos dois joelhos e duas horas depois receberam injeção de AFMK (0,26mg/mL) no joelho esquerdo e do veículo no joelho direito. Estes dados representam a média de 5 experimentos. (* equivale a $p \leq 0,05$).

5. Discussão

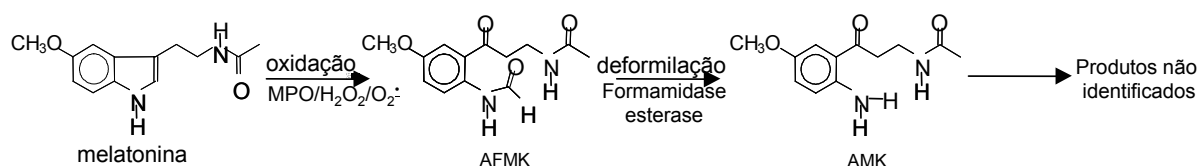
5.1. Efeito da reação de oxidação da melatonina e de seus produtos de oxidação, AFMK e AMK, sobre neutrófilos: ensaios *in vitro*

Neste estudo avaliamos a cinética de formação de AFMK e AMK a partir da oxidação de melatonina e descrevemos os efeitos destes compostos sobre diferentes funções de neutrófilos. Especificamente, estudamos o efeito de melatonina, AFMK e AMK sobre a produção de HOCl e citocinas e sobre a morte celular.

Nossos resultados são claros em relação à cinética de formação de AFMK e AMK onde mostramos que neutrófilos ativados com LPS ou PMA converteram melatonina em AFMK. AMK, o produto esperado a partir da deformilação do AFMK, também foi formado (Figura-12). Em relação a função de neutrófilos mostramos uma ação inibitória de melatonina sobre a produção de HOCl a partir de 0,05 mM (Figuras 6 e 7). AMK inibiu a produção de HOCl somente em altas concentrações (1mM) e AFMK não teve efeito. Melatonina também inibiu a liberação de IL-8 (Figura-10A) e, embora de forma menos intensa, inibiu a liberação de TNF- α (Figura-9A). O efeito inibitório da liberação de citocinas foi extensiva a AFMK e AMK, que em alguns casos se apresentaram mais potentes que a própria melatonina (Figuras 9 e 10). Sobre o efeito destes compostos na viabilidade celular vimos que AFMK e AMK, mas não melatonina, retardaram a morte celular e a degradação de DNA de neutrófilos (Figura-16 e 17).

Analizando os resultados obtidos no estudo da cinética da reação de oxidação da melatonina, observamos que neutrófilos ativados com PMA produziram concentrações maiores de AFMK e AMK do que ativação com LPS. Isto se deve provavelmente a maior habilidade de PMA, em relação a LPS, em induzir produção de ânion superóxido e, possivelmente, a degranulação de MPO (151), o que favorece a oxidação de melatonina. A concentração de AMK nas culturas foi relativamente baixa quando comparada com o seu precursor AFMK. A baixa quantidade de AMK pode ser devido a deformilação ineficiente de AFMK em neutrófilos. Embora leucócitos contenham esterases, não existe descrição de formamidase em neutrófilos. Uma outra possibilidade é que o AMK formado poderia

ser subsequentemente metabolizado (Esquema-6). Na verdade existem dados do grupo de que AMK é oxidado pela própria MPO, o mesmo não ocorre com AFMK (152). Embora o produto de oxidação de AMK por MPO não tenha ainda sido identificado, AMK é completamente consumido por neutrófilos ativados durante 60 minutos de incubação (152). Em adição, foi recentemente descrita a alta reatividade de AMK com ERO (76). Consequentemente a concentração de AMK encontrado em nossos experimentos pode representar uma fração da concentração total produzida pela deformilação de AFMK.

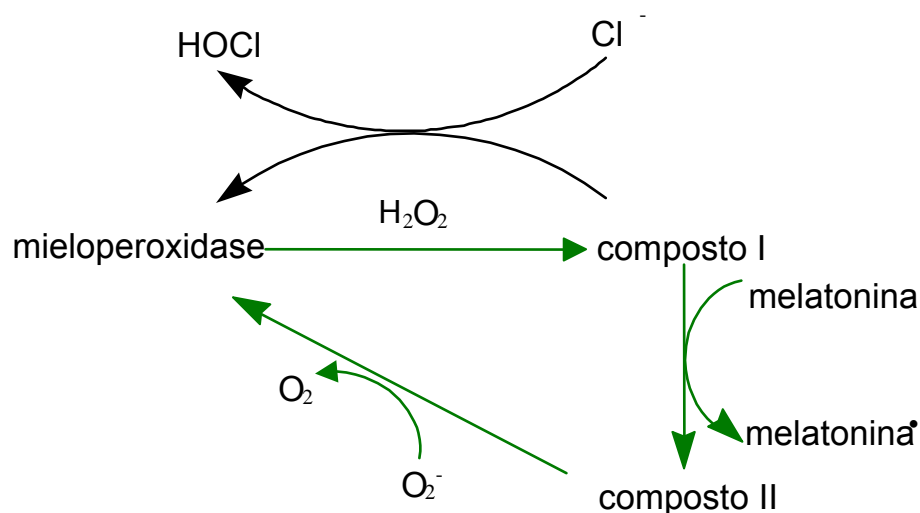


Esquema-6: Oxidação de melatonina e formação de AFMK que pode ser deformilado a AMK.

A partir do estudo da cinética de formação de AFMK e AMK em neutrófilos, descrito acima, fica clara a importância da compreensão da participação da melatonina e de sua oxidação no sistema imune. AFMK e AMK são análogos dos produtos formados a partir da oxidação do triptofano, *N*-formilquinurenina (NFK) e quinurenina, respectivamente (3). Apesar de várias atividades biológicas terem sido descritas para NFK e quinurenina (4,5) praticamente, não existem relatos sobre possíveis atividades de AFMK e AMK. Para estes são descritos apenas a inibição da síntese de prostaglandinas (72) e propriedades antioxidantes (75,76).

Em relação a formação de HOCl, melatonina e AMK inibiram a formação de HOCl o que era esperada uma vez que ambos os compostos são substratos de MPO (2,152). Similarmente, o fato de que AFMK não interfere com a produção de HOCl era esperado, uma vez que AFMK não é substrato de MPO. Este composto não reage com MPO nem com peroxidase (152).

A oxidação de melatonina por MPO envolve a enzima na sua forma nativa, composto I e composto II (91). Esta reação é O₂⁻ dependente provavelmente devido a participação do O₂⁻ no processo de reciclagem do composto II (153) (Esquema-7). Este mesmo mecanismo pode ser esperado para a oxidação de AMK.



Esquema-7: Reações catalisadas por MPO. Além da formação de HOCl MPO pode oxidar vários substratos incluindo melatonina. Composto I oxida melatonina a um cátion radical, e O_2^- é usado para reciclar o composto II à enzima na sua forma nativa. As setas em verde representam o ciclo peroxidásico.

Este ciclo, MPO nativa/composto I/composto II/MPO nativa compete com a formação de HOCl. Além de competir como substrato para MPO o ciclo peroxidásico consome H_2O_2 e O_2^- . Há a inibição da formação de HOCl e como consequência há também inibição da formação de espécies reativas derivadas do HOCl, como por exemplo, o oxigênio singlete. Pode-se esperar que a supressão de todas estas ERO reflitam na atividade microbicida de neutrófilos (*killing*), especialmente no caso de bactérias susceptíveis como *S. aureus* (154). Em trabalho paralelo do grupo foi observado que tanto melatonina e AMK quanto AFMK inibem o *killing* de *S. aureus* por neutrófilos (149). Assim, embora a supressão de ERO poderia se aceitar como o mecanismo provável pelo qual melatonina e AMK inibem o *killing*, este não é o caso de AFMK. Apesar de AFMK ser um antioxidante supostamente potente (75) esta atividade não pode ser considerada no contexto deste estudo, pois o sequestro de ERO primárias como H_2O_2 e O_2^- por AFMK causaria um decréscimo na produção de HOCl, o que não foi observado neste estudo.

Como conclusão, nossos achados sugerem que embora a inibição da produção de HOCl tenha participação na inibição da atividade *killing* promovida por melatonina e AMK, este mecanismo não deve atuar sozinho. A intensidade e padrão de inibição

do *killing* promovido por melatonina, AFMK e AMK são muito similares (149), assim é altamente provável que a atividade inibitória destes compostos no *killing* seja desencadeado também por outros mecanismos que não envolvam ação antioxidante. O *killing* é um processo complexo onde não somente a produção de ERO é relevante. Como exemplo, é conhecida a importância da ativação de enzimas proteolíticas e a troca de eletrólitos através da membrana para a atividade bactericida de neutrófilos (83).

Outras questões surgem a partir dos nossos resultados. Uma questão em aberto é de que forma a melatonina e seus produtos de oxidação controlam a produção de citocinas por neutrófilos. A inibição da produção de citocinas por melatonina, AFMK e AMK não é decorrente de perda de viabilidade celular e deve envolver mecanismos regulatórios refinados. Apesar de não termos estudado o mecanismo desse processo há a possibilidade de que neste caso as propriedades antioxidantes de melatonina (33-31), AFMK (75) e AMK (76) estejam envolvidas. Antioxidantes modificam o estado redox da célula e levam conseqüentemente a um decréscimo na produção de citocinas. Esta proposta é consistente com a ativação, por ERO, dos caminhos de sinalização importantes na inflamação, por exemplo com o mecanismo geral de ativação de NF- κ B e AP-1(155). De fato, foi recentemente descrito que melatonina inibe a ativação destes fatores (156) Vale ressaltar que a inibição na liberação de TNF- α e IL-8 induzida por melatonina deve ter a contribuição de AFMK e AMK, uma vez que ambos são gerados neste sistema. Da mesma forma, o efeito desencadeado por AFMK deve ter alguma contribuição do AMK.

Apesar de AFMK e AMK não afetarem a apoptose de neutrófilos ativados por LPS, observamos neste trabalho que AFMK e AMK, mas não melatonina inibiram a apoptose espontânea de neutrófilos. Neutrófilos são constitutivamente apoptóticos e acredita-se que vários grupos de proteínas estejam envolvidas na execução e regulação deste processo. Proteínas da família Bcl-2, considerada como principal regulador da apoptose, podem prevenir (por exemplo, Mcl-1) ou promover (por exemplo, Bax) a apoptose (157). A translocação de Bax para a mitocôndria leva a perda do potencial de membrana com conseqüente liberação do citocromo c e formação de proteínas pró-apoptóticas (caspases). É aceito que a concentração de Bax mantém-se constante enquanto a concentração de Mcl-1 diminui com o tempo o que favorece a apoptose de neutrófilos. Dessa forma, a apoptose espontânea de

neutrófilos poderia ser diminuída por agentes que aumentassem a expressão de Mcl-1 ou impedissem a translocação de Bax para a mitocôndria. Este é o mecanismo proposto para inibidores conhecidos da apoptose espontânea de neutrófilos como por exemplo, fator estimulador de colônia de granulócito e macrófago (GM-CSF e G-CSF) (158,159). O achado de que AFMK e AMK inibem a apoptose espontânea de neutrófilos é inédito e estes compostos poderiam atuar em vários dos caminhos envolvidos no complexo mecanismo da apoptose espontânea de neutrófilos. Este é um assunto de extrema relevância que merecerá uma atenção no futuro próximo.

O fato que AFMK e AMK foram mais potentes que a melatonina em inibir a liberação de IL-8 e TNF- α e inibir a morte celular por neutrófilos, e o fato que neutrófilo oxida melatonina ampara fortemente a idéia de que pelo menos parte dos efeitos inibitórios descritos para melatonina pode não ser direto, mas sim mediado por seus metabólitos. Adicionalmente, baseado no conhecimento de que as concentrações de TNF- α e IL-8 contribuem para a severidade do processo inflamatório (116,150,160), este estudo provê um *background* para explicar, por exemplo, o efeito de melatonina na atenuação da inflamação aguda e crônica (161-164), dor (165), infiltração de leucócitos (166) e angiogênese (167). Em uma visão mais ampla, o achado de que melatonina e seus metabólitos atuam amplamente sobre neutrófilos adiciona uma informação chave para a compreensão da função biológica de melatonina como um imunomodulador. Todos os aspectos comentados nesta discussão deverão ser considerados quando do uso terapêutico da melatonina, especialmente em doenças onde neutrófilos desempenham uma função fundamental.

Em conjunto, nossos dados corroboram com a idéia inicial de que a rota de metabolização de melatonina pode ser útil no controle da intensidade do processo inflamatório através do consumo de ERO, controle de liberação de citocinas e da sobrevivência de neutrófilos.

5.2. Processo inflamatório e a oxidação de melatonina *in vivo*

Apesar do crescente número de estudos sobre a ação biológica da melatonina, ainda não se têm informações diretas que evidenciem a participação deste composto na resposta imune. Esta participação dependeria da biodisponibilidade e de altas concentrações de melatonina. É sabido que a concentração sérica de

melatonina é bastante baixa, isto é, a concentração máxima não ultrapassa 300 pg/mL (1,12). Entretanto, contribuições recentes demonstraram que linfócitos ativados sintetizam grandes quantidades de melatonina (63), células mononucleares ativadas possuem as enzimas necessárias para a síntese de melatonina (62) e concentrações elevadas de melatonina foram identificadas na medula óssea (65) e em macrófagos peritôneais de ratos (64).

Em um recente editorial, Reiter e Tan (168) levantaram a questão sobre qual poderia ser considerada a concentração fisiológica de melatonina. Os autores argumentam que a concentração de melatonina em células, organelas e em outros fluidos biológicos, que não sangue, não deve necessariamente estar em equilíbrio com a concentração de melatonina no plasma. Assim, por exemplo, concentrações de melatonina levemente acima ou muito acima daquela observada no soro estão presentes no LCR (18) e no terceiro ventrículo (17) respectivamente. A alta concentração de melatonina presente no sistema ventricular, particularmente no terceiro ventrículo onde a concentração de melatonina é 20 vezes maior que no sangue, é resultante da passagem de melatonina da glândula pineal, via recesso da pineal, para o sistema ventricular (17).

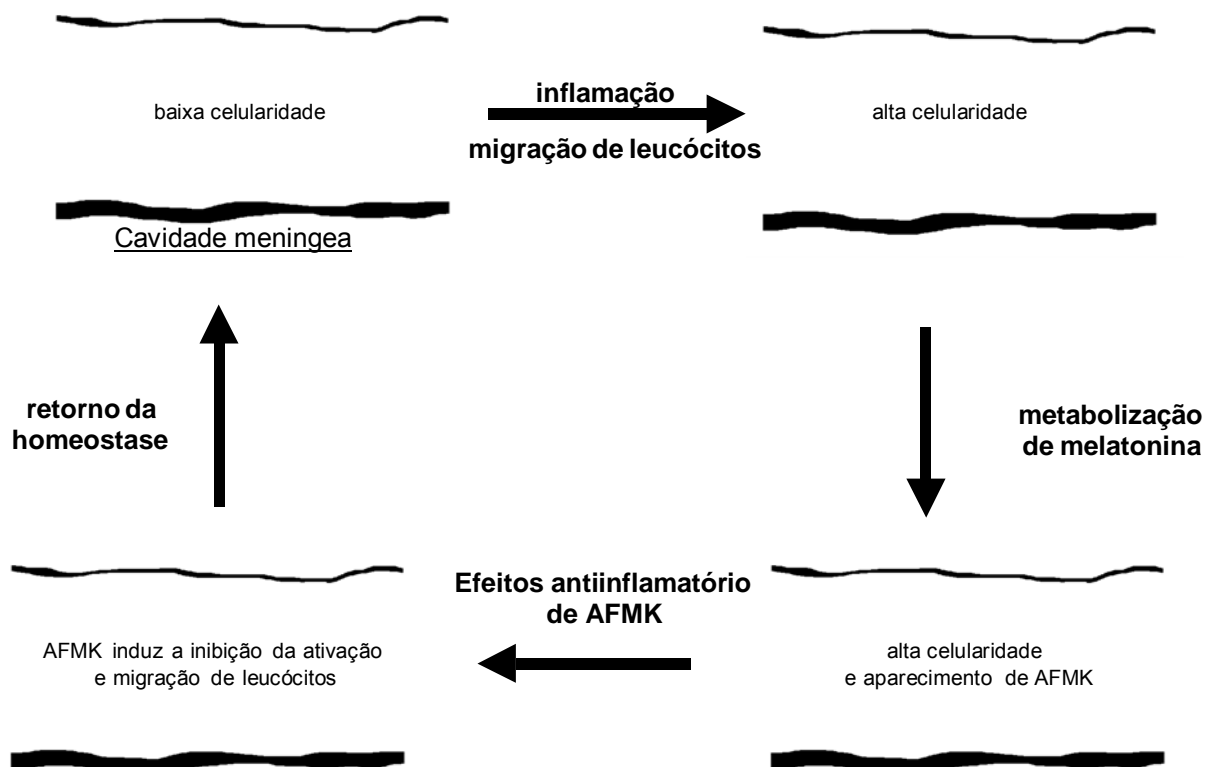
Acreditando que a concentração de melatonina seja alta (maior que a concentração sérica) em sítios específicos e supondo a presença de células inflamatórias em alguns destes sítios, há então a possibilidade de ocorrer a oxidação de melatonina e formação de AFMK. Neste sentido, a melatonina poderia ser oxidada não enzimaticamente através de sua reação com ERO ou enzimaticamente em reações catalizadas por MPO ou IDO. O foco inflamatório, desta forma possui as condições necessárias para a busca de AFMK.

Nesta tese nós fizemos a primeira descrição do achado de AFMK em liquor de pacientes com meningite viral (Figura 19B). Além disso, é importante notar que a concentração de AFMK encontrada em alguns pacientes excede em duas ordens de grandeza a concentração normal de melatonina encontrada no soro. Na verdade a concentração elevada de AFMK é próxima à concentração de melatonina encontrada no recesso da pineal (estrutura originada de uma evaginação do terceiro ventrículo) de carneiros (169). Este achado confirma nossa hipótese de que o foco inflamatório possui todas as condições necessárias para a procura de AFMK.

Infelizmente o método por nós utilizado não apresentou sensibilidade suficiente para quantificarmos melatonina. É possível que em condições inflamatórias a

concentração final de melatonina tenha a contribuição da síntese local originada por células mononucleares. Ainda que de forma preliminar, os nossos resultados detectando melatonina em LCR de pacientes com meningite amparam esta idéia (Figura-19A).

As amostras utilizadas neste trabalho foram coletadas possivelmente em diferentes estágios da doença. Se imaginarmos que o processo inflamatório compreende uma fase inicial pró-inflamatória que progride até uma fase de reparo e reestabelecimento da homeostasia, as amostras utilizadas neste estudo devem ser heterogêneas, algumas pertencendo ao processo inflamatório e outras a fase de recuperação. Assim, a sequência de eventos envolvida neste processo deve compreender: a instalação do processo inflamatório com migração celular e a progressão do processo inflamatório com a síntese local de melatonina por células mononucleares e sua posterior metabolização a AFMK. Em concentrações elevadas de AFMK poderia se esperar uma modulação negativa da inflamação, como visto *in vitro* e retorno a homeostasia (Esquema-7). Desta forma AFMK em liquor de pacientes com meningite poderia ser uma resposta natural para prevenir, por exemplo, o dano tecidual.



Esquema-7: Síntese de melatonina e posterior metabolização a AFMK por células imunes como parte da progressão de um processo inflamatório.

Assim, neste estudo nós observamos paralelamente a determinação de AFMK parâmetros inflamatórios tais como celularidade (Figura-20), concentração de proteínas (Figura-21) e de citocinas próinflamatórias (Figura-22). Estes parâmetros foram inversamente correlacionados com a concentração de AFMK nas amostras. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos *in vitro* onde AFMK inibiu eficientemente a liberação de $TNF\alpha$ - e IL-8 por neutrófilos (Figuras 9B e 10B). Mais uma vez chamamos a atenção para a possibilidade de que a conhecida atividade antiinflamatória de melatonina (49,50,55) seja na verdade originada de seu produto de oxidação AFMK.

Além da importância do achado de que LCR humano, na vigência de meningite, possui AFMK e que a concentração deste composto correlaciona-se inversamente com marcadores inflamatórios, este estudo descreve uma padronização para a determinação de AFMK em amostras biológicas. O interesse na determinação de AFMK em amostras biológicas tem sido crescente. Recentemente, ainda que em baixas concentrações (0,2 pmol), AFMK foi quantificado em soro humano por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (170) e em

homogenato de retina e no ventrículo lateral de ratos tratados com doses farmacológicas de melatonina por cromatografia líquida acoplada a um detector de fluorescência (171).

Embora este estudo tenha sido centrado numa condição inflamatória restrita ao sistema nervoso central qualquer condição inflamatória, a princípio, poderia ser um bom local para a pesquisa de AFMK.

Apesar de preliminar, mostramos também neste estudo que AFMK diminuiu a celularidade de líquido sinovial de coelho com artrite. Este achado amplia o conhecimento dos efeitos antiinflamatórios promovidos por AFMK e corrobora com nossa hipótese inicial.

Estes dados juntos sugerem que AFMK pode ser um bom marcador de metabolização de melatonina em focos inflamatórios, além de ter atividade imunomodulatória.

6. Conclusões

Neste trabalho mostramos que:

1- melatonina e AMK, mas não AFMK, inibem a formação de ácido hipocloroso por neutrófilos ativados (Figura 7). Assim, a inibição da atividade de *killing* de neutrófilos por melatonina, AFMK e AMK não pode ser atribuída exclusivamente à inibição da formação de ácido hipocloroso.

2- melatonina, e em maior intensidade seus produtos de oxidação, AFMK e AMK, inibem a liberação de TNF- α e IL-8 de neutrófilos ativados por LPS (Figuras 9 e 10), sugerindo que estes compostos podem ter efeitos antiinflamatórios importantes;

3- AFMK e AMK retardam a morte de neutrófilos aumentando sua viabilidade celular (Figuras 15 e 16). Neste caso AFMK e AMK podem garantir uma maior sobrevivência de neutrófilos no foco inflamatório;

4- AFMK está presente em algumas amostras de líquor de pacientes com meningite viral (Figura-19). Este achado reforça nossa idéia de que o foco inflamatório possui as condições necessárias para que a oxidação de melatonina ocorra;

5- a celularidade e as concentrações de proteína total, TNF- α , IL-8 e IL-1 β , diminuem nas amostras de líquor onde a concentração de AFMK é maior (Figuras 20, 21 e 22), amparando os ensaios *in vitro*, ou seja, AFMK tem efeito antiinflamatório;

6- AFMK diminui a celularidade em líquido sinovial de coelhos com artrite experimental induzida (Figura 23) o que reforça a hipótese de que AFMK tem efeito antiinflamatório *in vivo*;

7. Referência Bibliográfica

1. Kvetnoy, I.M., Sandvik, A.K., Waldum, H.L. (1997). The diffuse neuroendocrine system and extrapineal melatonin. **J. Mol. Endocrinol.** 18:1-3.
2. 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, 657-662.
3. Freese, A., Swartz, K.J., During, M.J., Martin, J.B. R. (1990). Kynurenine metabolites of tryptophan: implications for neurologic diseases. **Neurology.** 40 691-695. Review.
4. 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.** 196 459-468.
5. 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 1069-1077.
6. Cassatella, M.A. (1995). The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunology Today;** 16, 21-26.
7. Malyak, M., Smith, M.F., Abel, A.A. Atend, W.P. (1994). Peripheral blood neutrophil production of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta. **J. Clin. Immunol.** 14, 20-30.
8. Re, F., Mengozzi, M., Muzio, M. Dinarello, C.A., Mantovani, A. Colotta, A. (1993).. Expression of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) by human circulating polymorphonuclear cells. **Eur. J. Immunol.** 23, 570-573.
9. Fava, R.A., Olsen, N.J., Postlthwaite, A.E. Broadley, K.N., Davidson, J.M., Nanney, L.B., Lucas, C. Townes, A.S. (1993). Transforming growth factor β 1 (TGF β 1) induced neutrophil recruitment to sinovial tissues: implications for TGF- β -driven synovial inflammation and hiperplasia. **J. Exp. Med.** 173, 1121-1132.
10. Lloyd A.R. Oppenheim, J.J. (1992). Poli's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. **Immunol. Today.** 13, 169-172.

11. Kita, H., Ohnishi, T., Okubo, Y., Weiler, D., Abrams, J.S. Gleich, G.J. (1991). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 release from human peripheral blood eosynophils and neutrophils. **J. Exp. Med.** 174, 745-748.
12. Zhdanova, I.V. & Wurtman, R.J.. The pineal hormone-melatonin. *in*: Conn, P.M. and Melmed, S. **Endocrinology: basic and clinical principles**. 1997,. Humana Press Inc. Totowa, NJ, cap 18, 279-290.
13. Reiter, R.J. (1991). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and its physiological interactions. **Endocr. Rev.** 12, 151-180.
14. Miles, A., Philbrick, D.R.S., Tidmarsh, S.F., Shaw, D.M. (1985). Direct radioimmunoassay of melatonin in saliva. **Clin. Chem.** 31, 1412-1413.
15. Bornman, M.S., Oosthuizenm, J.M.C., Barnard, H.C., Schulenburg, G.W., Boomker, D., Reif, S. (1989). Melatonin and sperm motility. **Andrologia** 21, 483-485.
16. Tan, D.X., Manchester, L.C., Reiter, R.J., Qi, W., Hanes, M.A., Farley, N.J. (1999). High physiological levels of melatonin in bile of mammals. **Life Sci.** 65, 2523-2529.
17. Skinner, D.C., Malpaux, B. (1999). High melatonin concentrations in third ventricular cerebrospinal fluid are not due to Galen vein blood in recirculating through the choroids pleaxus. **Endocrinology** 140, 4399-4405.
18. Rousseau, A., Petren, S., Plannthin, J., Eklundh, T., Nordin, C. (1999). Serum and cerebrospinal fluid concentrations of melatonin: a pilot study in healthy male volunteers. **J Neural Transm.** 106, 883-888.
19. Tan, D.X., Manchester, L.C., Hardeland, R., Lopez-Burillo, S., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Reiter, R.J. (2003). Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. **J. Pineal Res.** 34, 75-78.
20. Pang, S.F., Allen, A.E. (1986). Extra-pineal melatonin in the retina: Its regulation and physiological function, in Reiter RJ (ed): **Pineal Research** vol 4. New York, NY, Alan R Liss, 55-95.
21. Reppert, S.M.; Weaver, D.R., Ebisawa, T. (1994). Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. **Neuron.** 13, 1177-1185.
22. Lee, P.P. & Pang, S.F. (1993). Melatonin and its receptors in the gastrointestinal tract. **Biol Signals.** 2, 181-193.

23. Ying, S.W.; Niles, L.P., Crocker, C. (1993). Human malignant melanoma cells express high affinity receptors for melatonin: Antiproliferative effects of melatonin and 6-chloromelatonin. **Eur. J. Pharmacol.** 246, 89-96.
24. Konakchiev, R., Kyurkchiev, S., Kehayov, I., Taushanova, P., Kanchev, L. (1995). Selective effect of methoxyindoles on the lymphocyte proliferation and melatonin binding to activated lymphoid cells. **J Neuroimmunol.** 63, 125-132.
25. Lopez-Gonzalez, M.A., Calvo, J.R., Segura, J.J., Guerrero, J.M. (1993). Characterization of melatonin binding sites in human peripheral blood neutrophils. **Biotechnol Ther.** 4, 253-262
26. Barjavel, M.J., Mamdouh, Z., Raghbate, N., Bakouche, O. (1998). Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. **J. Immunol.** 160, 1191-1197.
27. de Almeida, E.A., Martinez, G.R., Klitzke, C.F., de Medeiros, M.H., Di, Mascio, P. (2003). Oxidation of melatonin by singlet molecular oxygen ($O_2(1\Delta g)$) produces N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynurenine. **J. Pineal Res.** 35, 131-137.
28. Tan, D.X.; Chen, L.D.; Poeggeler, B.; Manchester, L.C.; Reiter, R.J. (1993). Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. **Endoc. J.** 1, 57-60.
29. Matuszak, Z., Reszka, K.J., Chignell, C.F. (1997). Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radicals: EPR and spin trapping investigations. **Free Radical Biol. & Med.** 23, 367-372.
30. Zhang, H., Squadrito, G.L., Pryor, W.A. (1998). The reaction of melatonin with peroxynitrite: formation of melatonin radical cation and absence of stable nitrated products. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 251, 83-87.
31. Zhang, H., Squadrito, G.L., Uppu, R., Pryor, W. (1999). Reaction of peroxynitrite with melatonin: a mechanistic study. **Chem. Res. Toxicol.** 12, 526-534.
32. Reiter, R.J., Tan, D.X., Manchester, L.C., Qi, W. (2001). Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: A review of the evidence. **Cell. Biochem. Biophys.**, 34, 237-256.
33. Hardeland, R., Reiter, R.J., Poeggeler, B., Tan, D.X. (1993). The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection

- and formation of bioactive substances. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 17, 347-357.
34. Reiter, R.J., Poeggeler, B., Tan, D.X., Chen, L.D., Manchester, L.C., Guerrero, J.M. (1993). Antioxidant capacity of melatonin: A novel action not requiring a receptor. **Neuroendocrinol. Lett.** 15, 103-116.
 35. Tan, D.X., Manchester, L.C., Reiter, R.J., Qi, W., Karbownik, M., Calvo, J.R. (2000). Significance of melatonin in antioxidative defense system: Reactions and products. **Biol. Signals Recept.** 9, 137–159.
 36. Reiter, R.J., Tan, D.X., Osuna, C. Gitto, E. (2000). Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. **J. Biomed. Sci.** 7, 444-458.
 37. Antolin, I., Rodriguez, C., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Uria, H., Kotler, M.L., Rodriguez-Colunga, M.J., Tolivia, D., Menendez-Pelaez, A. (1996). Neurohormone melatonin prevents cell damage: Effect of gene expression for antioxidative enzymes. **FASEB J.** 10, 882-890.
 38. Kotler, M., Rodriguez, C., Sainz, R.M., Antolin, I., Menendez-Pelaez, A. (1998). Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. **J. Pineal Res.** 24, 83-89.
 39. Rodriguez, C., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Antolin, I., Herrera, F., Martin, V., Reiter, R.J. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **J Pineal Res.** 36, 1-9.
 40. Montilla, P., Tunez, I., Munoz, M.C., Soria, J.V., Lopez, A. (1997). Antioxidative effect of melatonin in rat brain oxidative stress induced by adriamycin. **Ver. Esp. Fisiol.** 53, 301-305.
 41. Barlow-Walden, L.R., Reiter, R.J., Abe, A., Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen L.D., Poeggeler B. (1995). Melatonin stimulated brain glutathione peroxidase activity. **Neurochem. Int.** 26, 497-502.
 42. Sewerynek, E.; Reiter, R.J.; Melchiorri, D. (1996). Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: Protection by melatonin. **Hepatogastroenterology.** 43, 898-903.
 43. Hsu, C.H., Chi, B.C., Casida, J.E. (2002). Melatonin reduces phosphine-induced lipid and DNA oxidation *in vitro* and *in vivo* in rat brain. **J. Pineal Res.** 32, 53-58.
 44. Blanchard, B., Pompon, D., Ducrocq, C. (2000). Nitrosation of melatonin by nitric oxide and peroxynitrite. **J. Pineal Res.** 29, 184-192.

45. Turjanski, A.G., Saurz, D.A., Doctorovich, F., Estrin, D.A., Rosenstein, R.E. (2001). Nitrosation of melatonin by nitric oxide: A computational study. **J Am Chem Soc** 37, 97-101.
46. Cutolo, M., Villaggio, B., Candido, F., Valenti, S., Ciusti, M., Felli, L., Sulli, A., Acardo, S. (1999). Melatonin influences interleukin-12 and nitric oxide production by primary cultures of rheumatoid synovial macrophages on THP-1 cells. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 876, 246-254.
47. Morrey, K. M., Mclachlan, J.A., Serkin, C.D., Bakouche, O. (1994). Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. **J. Immunol.** 153, 2671-2680.
48. 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-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. **J. Immunol.** 159, 574-581
49. Garcia-Maurino, S., Gonzalez-Haba, M.G., Calvo, J.R., Goberna, R., Guerrero, J.M. (1998). Involvement of nuclear binding sites for melatonin in the regulation of IL-2 and IL-6 production by human blood mononuclear cells. **J Neuroimmunol.** 92, 76-84.
50. Di Stefano, A., Paulesu, L. (1994). Inhibitory effect of melatonin on production of IFN γ or TNF α in peripheral blood mononuclear cells of some blood donors. **J. Pineal Res.** 17, 164-169.
51. Sainz, R.M., Mayo, J.C., Uría, H., kotler, M., Antolin, I., Rodriguez, C. Menendez-P.A. (1995). The pineal neurohormone melatonin prevents *in vivo* and *in vitro* apoptosis in thymocytes. **J. Pineal Res.** 19, 178-188.
52. Mayo, J.C., Sainz, R.M., Uría, H., Antolin, I., Isteban, M.M., Rodriguez, C. (1988). Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells: implications for Parkinsons' disease. **J. Pineal Res.** 24, 179-192.
53. Angeli, A., Gatti, G., Sartori, M.L., Del Ponte, D., Cerignola, R. (1988). Effect of exogenous melatonin on human natural killer (NK) cell activity. An approach to the immunomodulatory role of the pineal gland. in **The pineal gland and cancer** 1988, (gupta A, Attanasio A, Reiter RJ, eds) Muller and Bass, Tubingen, 145-156.

54. Csaba, C., Barath, P. (1975). Morphological changes of thymus and the thyroid gland after postnatal extirpation of the pineal body. **Endocrinol. Exp.** 9, 59-67.
55. Maestroni, G.J.M., Conti, A., Pierpaoli, W. (1987). Role of the pineal gland in immunity. II. Melatonin enhances the antibody response via an opiate-ergic mechanism. **Clin. Exp. Immunol.** 68, 384-391.
56. Calvo, J.R., Rafii-El-Idrissi, M., Pozo, D., Guerrero, J.M. (1995). Immunomodulatory role of melatonin: specific binding sites in human and rodent lymphoid cells (review). **J. Pineal Res.** 18, 119-126.
57. Caroleo, M.C., Frasca, D., Nistico, G., Doria, G. (1992). Melatonin as immunomodulator in immunodeficient mouse. **Immunopharmacology.** 23, 81-89.
58. Sugden, D. (1979) Circadian changes in rat pineal tryptophan content: Lack of correlation with serum tryptophan. **J Neurochem** 33:811-813,
59. Reiter, R.J. (1991). Pineal melatonin: All biology of its synthesis and of its physiological interactions. **Endocr. Ver.** 12, 151-180.
60. Weissbach, H., Redfield, B.G., Axelrod, J. (1960). Biosynthesis of melatonin: Enzymatic conversion of serotonin to N-acetylserotonin. **Biochim. Biophys. Acta** 43, 352-353.
61. Axelrod, J., Weissbach, H. (1960). Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. **Science** 131, 1312-1313.
62. Finochiaro, L.M.E., Nahmod, V.E., Launay, J.M. (1991). Melatonin biosynthesis and metabolism in peripheral-blood mononuclear leukocytes. **Biochem. J.** 280, 727-731.
63. 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.** Published online January.
64. Martins, E.Jr., Ferreira, A.C., Skorupa, A.L., Afeche, S.C., Cipolla-Neto, J., Costa Rosa, L.F. (2004). Tryptophan consumption and indoleamines production by peritoneal cavity macrophages. **J Leukoc Biol.** 75, 1116-1121.

65. Tan, D., Manchester, L.C., Reiter, R.J., Qi, W., Zhang, M., Weintraub, S.T., Cabrera, J., Sainz, R.M., Mayo, J.C. (1999). Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. **Biochim. Biophys Acta**; 1472, 206-214.
66. 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, 1311-1313.
67. Tan, D.X., Manchester, L.C., Reiter, R.J., Plummer, B.F. (1999). Cyclic 3-hydroxymelatonin: a melatonin metabolite generated as a result of hydroxyl radical scavenging. **Biol. Signals Recept.** 8, 70-74.
68. Hardeland, R., Balzer, I., Poeggeler, B., Fuhrberg, B., Uria, H., Behrmann, G., Wolf, R., Meyer, T.J., Reiter, R.J. (1995). On the primary functions of melatonin in evolution: mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation, and scavenging of free radicals. **J Pineal Res.** 18, 104-111.
69. 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 Rad. Biol. Med.** 29, 1177-1185.
70. Silva, S.O, Rodrigues, M.R., Ximenes, V.F., Bueno-da-Silva, A.E.B., Amarante-Mendes, G.P., Campa, A. (2004). Neutrophils as a specific target for melatonin and kynuramines: effects on cytokine release. **J. Neuroimmunology** 156, 146-152.
71. León, J., Vives, F., Crespo, E., Camacho, E., Espinosa, A., Gallo, M.A., Escames, G., Acuna-Catroviejo, D. (1998). Modification of nitric oxide synthase activity and neuronal response in rat striatum by melatonin and kynurenine derivatives. **J. Neuroendocrinol.** 10, 297-302.
72. Kelly, R.W., Amato, F., Seamark, R.F. (1984). *N*-acetyl-5-methoxykynurenamine, a brain metabolite of melatonin, is a potent inhibitor of prostaglandin biosynthesis. **Biochem Biophys Res Commun.** 121, 372-379.
73. Kennaway, D.J., Hugel, H.M., Clarke, S., Tjandra, A., Johnson, D.W., Royles, P., Webb, H.A., Carbone, F. (1988). Structure activity studies of melatonin analogs in prepubertal male-rats. **Aust J Biol Sci.** 41, 393-400.

74. León, J., Macías, M., Escames, G., Camacho, E., Khaldy, H., Martín, M., Espinosa, A., Gallo, M.A., Acuna-Catroviejo, D. (2000). Structure-Related Inhibition of Calmodulin-Dependent Neuronal Nitric-Oxide Synthase Activity by Melatonin and Synthetic Kynurenines. **Molecular Pharmacology**. 58, 967-975.
75. Tan, D.X., Manchester, L.C., Burkhardt, S., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Kohen, R., Shohami, E., Huo, I-S., Hardeland, R., Reiter, R.J. (2001). *N*¹-acetyl-*N*²-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. **FASEB J.** 15, 2294-2296.
76. 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 *N*¹-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. **Redox Rep.** 8, 205-13.
77. Cotran, R.S.; Kumar, V. Robbins, S.L. **Inflamação e reparação em Patologia Estrutural e Funcional** 1996. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 5ª edição 45-83.
78. Weiss, S.J. (1989). Tissue destruction by neutrophils. **N. Engl. J. med.** 320, 365-376.
79. Moore, P.L., Bank, H.L., Brissie, N.T., Spicer, S.S. (1978). Phagocytosis of bacteria by polymorphonuclear leukocytes: a freeze-fracture, scanning electron microscope, and thin section investigation of membrane structure. **J. Cell. Biol.** 76, 158.
80. Roos, D., van Bruggen, R., Meischl, C. (2003). Oxidative killing of microbes by neutrophils. **Microbes Infect.** 5, 1307-15. Review.
81. Deleo, F.R., Quinn, M.T. (1996). Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. **J. Leucoc. Biol.** 60, 677-691.
82. Babior, B.M. (1978). Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. **N. Engl. J. Med.** 298, 659-68.
83. Reeves, E.P., Lu, H., Jacobs, H.L., Messina, C.G., Bolsover, S., Gabella, G., Potma, E.O., Warley, A., Roes, J., Segal, A.W. (2002) Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. **Nature.** 416, 291-297.

84. Harrison, J.E., Schultz, J. (1976). Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. **J. Biol. Chem.** 251, 1371-1374.
85. Marodi, L., Tournay, C., Kaposzta, R., Johnston, R.B.Jr and Mogueilevsky, N. (1998) Augmentation of human macrophage candidacidal capacity by recombinant human myeloperoxidase and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Infect Immun.* 66, 2750-2754.
86. Lefkowitz, D.L., Lincoln, J.A., Howard, K.R., Stuart. R., Lefkowitz, S.S. and Allen, R.C. (1997) Macrophage-mediated candidacidal activity is augmented by exposure to eosinophil peroxidase: a paradigm for eosinophil-macrophage interaction. *Inflammation* 21, 159-172.
87. Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. (1998). Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. **Blood.** 92, 3007-3017.
88. Rodrigues, M.R., Rodriguez, D., Russo M., Campa A. (2002). Macrophage activation include high intracellular myeloperoxidase activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**; 292: 869-873.
89. Nagra, R.M., Becker, B., Tourtellotte, W.W., Antel, J.P., Gold, D., Palatino, T., Smith, R.A., Nelson, J.R., Reynolds, W.F. (1997). Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. **J. Neuroimmunol.** 78, 97-107.
90. Kettle, A., Winterbourn, C.C. (1994). Superoxide-dependent hydroxylation by myeloperoxidase. **J. Biol. Chem.** 269, 17146-177151.
91. Ximenes, V.F., Catalani, L.H. Campa, A. (2001). Oxidation of melatonin and tryptophan by HRP cycle involving compound III. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 287, 130-134.
92. Lefkowitz, D.L., Mills, K., Morgan, D. Lefkowitz, S.S. (1992). Macrophage Activation and Immunomodulation by Myeloperoxidase. **Exp. Biol. Med.** 199, 204-210.
93. Abu-Soud, H.M. Hazen, S.L. (2000). Nitric Oxid modulates the catalytic activity of myeloperoxidases. **J. Biol. Chem.** 275, 5425-5430.
94. Abu-Soud, H.M. Hazen, S.L. (2000). Nitric Oxid is a physiological substrate for mammalian peroxidases. **J. Biol. Chem.** 275, 37524-37532.

95. Daugherty, A., Rateri, D.L., Dunn, J.L., Heinecke, J.W. (1994). Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. **J. Clin. Invest.** 94, 437-444.
96. Brennan, M-L., Anderson, M.M, Shih, D.M., Qu, X-D., Wang, X., Mehta, A.C., Lim, L.L., Shi, W., Hazen, S.L., Jacob, J.S., Crowley, J.R., Heinecke, J.W. Lulis, A.J. (2001). Increased atherosclerosis in myeloperoxidase-deficient mice. **J. Clin. Invest.** 107,419-430
97. Brennan, M-L., Gaur, A., Pahuja, A., Lulis, A.J. Reynolds, W.F. (2001). Mice lacking myeloperoxidase are more susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. neuroimmunol.** 112, 97-105.
98. Liu, H.L., Djeu, J.Y. (1995). Role of cytokines in neutrophil functions. In: Aggarwal, B. B. and Puri, R. K. Human Cytokines: Their Role in Disease and Therapy, 71-86 **Cambridge-Blackwell Science**, Inc.
99. Cassatella, M.A., Meda, L., Bonora, S., Ceska, M. Constantin, G. (1993). Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorfonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 β in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolyssacharide. **J. Exp. Med.** 178, 2207-2211.
100. Cassatella, M.A., Meda, L., Gasperini, S., Calzetti, F., Bonora, S. (1994). Interleukin 10 (IL-10) upregulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolyssacharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation. **J. Exp. Med.** 179, 1695-1699.
101. McDonald P.P., Bald A., Cassatela M.A. (1997). Activation of the NF-kB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. **Blood**; 89, 3421-33.
102. Baeuerle P.A. Baltimore D. (1988). I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. **Science.** 242, 540-6.
103. Scheck R., Albermann K., Baewerle P.A. (1992). Nuclear factor kB: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). **Free Rad. Res. Comms.**, 17, 221-37.
104. Schreck, R., Meier, B., Mannel, D.N., Droge, W., Baeuerle, P.A. (1992). Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. **J. Exp. Med.**; 175,1181-94.

105. Schreck R., Grassmann R., Fleckenstein B., Baeuerle P.A. (1992). Antioxidants selectively suppress activation of NF-kappa B by human T-cell leukemia virus type I Tax protein. **J. Virol.** 66, 6288-93.
106. Remick, D.G. Villarete, L. (1996). Regulation of cytokine gene expression by reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates. **J. Leukocyte Biology.** 59, 471-5.
107. Chuang, J-I., Mohan, N., Meltz, M.L., Reiter, R.J. (1996). Effect of Melatonina on NF-kB DNA-Binding Activity in the rat Spleen. **Cell. Biology International.** 20, 687-692.
108. Abbas, A.K.; Lichtman, A.H. Pober, J.S. **Citocinas em Imunologia Celular e Molecular.** 1998, Editora Revinter Ltda. Rio de Janeiro, 1º edição, 253-276.
109. Pichyangkul, S., Schick, D., Jia, F., Berent, S., Bollon, A., Kahn, A. (1987). Binding of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) to high-affinity receptors on polymorphonuclear cells. **Exp. Hematol.** 15, 1055-1059.
110. Ferrante, A. Nandoskar, M., Walz, A, Goh, D.H.B., Kowanko, I.C. (1988). Effects of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 alpha and beta on human neutrophil migration, respiratory burst and degranulation. **Int. arch. Allergy Appl. Immunol.** 86, 82-91.
111. Matthews, N., Neate, M.L., Jackson, S.K. Stark, J.M. (1987). Tumour cell killing by tumor necrosis factor. Inhibition by anaerobic conditions, freeradical scavengers and inhibitors of arachidonate metabolism. **Immunology.** 62, 153-155.
112. Wong, G.H., Elwell, J.H., Oberley, L.W., Goerddel, D.V. (1989). Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance by cytotoxicity of tumor necrosis factor. **Cell.** 58, 923-931.
113. Klebanoff, S.J., Vadas, M.A. Harland, J.M., Sparks, L.H., Gamble, J.R., agosti, J.M., Waltersdorff, A.M. (1986). Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factors. **J. Immunol.** 136, 4220-4225.
114. Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., Halbwachs-Mecarelli, L. (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Lab Invest.** 80, 617-653. Review.
115. Luster, A.D. (1998). Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N. Engl. J. Med.** 338, 436-445.
116. Baggiolini, M., Dewald, B. Moser, B. (1997). Human chemokines: an update.

- Annu. Rev. Immunol.** 15, 675-705.
117. Baggiolini, M. Clark-Lewis, I. (1992). Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. **FESBS**;307, 97-101.
 118. Bischoff, S.C., Krieger, M., Brunner, T., Rot, A., Von Tscharner, V., Baggiolini, M., Dahinden, C.A. (1993). Rantes and Related chemokines activate human basophil Granulocyte through different G protein-coupled receptors. **Eur. J. Immunol.** 23, 761-767.
 119. Cassatella, M.A. (1999). Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. **Adv Immunol.** 73, 369-509.
 120. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. (1998). Citocinas em **Imunologia Celular e Molecular**. Ed Revinter Ltda, 253-276.
 121. Liles, W.C., Klebanoff, S.J. (1995). Regulation of apoptosis in neutrophils--Fas track to death? **J Immunol.** 155, 3289-32891. Review.
 122. Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J.M., Venkatachalam, M.A. (1999). Apoptosis: Definition, Mechanisms and Relevance to Disease. **The American J. of Medicine.** 107, 489-506.
 123. Colotta, F., Polentarutti, N., Sozzani, S., Mantovani, A. (1992). Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. **Blood** 80: 2012.
 124. Brach, M.A., do Vos, S., Gruss, H.J., Hermann, F. (1992). Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed death. **Blood** 80: 2920.
 125. Yamamoto, C., Yoshida, S., Taniguchi, H., Qin, M.H., Miyamoto, H., Mizuguchi, H. (1993). Lipopolysaccharide and granulocyte colony-stimulating factor delay neutrophil apoptosis and ingestion by guinea pig macrophages. **Infect. Immun.** 61:1972.
 126. Pericle, F., Liu, J.H., Diaz, J.L., Blanchard, D.K., Wei, S., Forni, G., Djeu, J. Y. (1994). Interleukin-2 prevention of apoptosis in human neutrophils. **Eur. J. Immunol.** 24: 440.
 127. Liles, W.C., Klebanoff, S.J. (1995). Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils. **Blood.** 86: 3181.
 128. Herbert, M.J., Takano, T., Holthofer, H., Brady, H.R. (1996). Sequential morphologic events during apoptosis of human neutrophils: modulation by

- lypoxygenase-derived eicosanoids. **J. Immunol.** 157: 3105.
129. Trevani, A.S., Andonegui, G., Giordano, M., Nociari, M., Fontan, P., Dean, G., Geffner, J.R. (1996). Neutrophil apoptosis induced by proteolytic enzymes. **Lab. Invest.** 74: 711.
130. Watson, R.W., Redmond, H.P., Wang, J.H., Condron, C., Bouchier_hayes, D. (1996). Neutrophil undergo apoptosis following ingestion of *Escherichia coli*. **J. Immunol.** 156: 3986.
131. Gamberale, R., Giordano, M., Trevani, A.S., Andonegui, G., Geffner J.R. (1998). Modulation of human neutrophil apoptosis by immune complexes. **J. Immunol.** 161: 3666.
132. Colamussi, M.L., White, M.R., Crouch, E., Hartshorn, K.L. (1999). Influenza A virus accelerates neutrophils apoptosis and markedly potentiates apoptotic effects of bacteria. **Blood.** 93, 2395-2403.
133. Haslett, C. (1997). Granulocyte apoptosis and inflammatory disease. **Br. Med. Bull.** 53, 669-683.
134. Whyte MK, Meagher LC, MacDermot J, Haslett C. (1993). Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. **J Immunol.** 150, 5124-5134.
135. Dransfield I, Buckle AM, Savill JS, McDowall A, Haslett C, Hogg N. (1994). Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc gamma RIII) expression. **J Immunol.** 153, 1254-1263.
136. Meagher, L.C., Savill, J.S., Baker, A., Fuller, R.W., Haslett, C. (1992). Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B2. **J Leukoc Biol.** 52, 269-273.
137. Sainz, R.M., Mayo, J.C., Rodriguez, C., Tan, D.X., Lopez-Burillo, S., Reiter, R.J. (2003). Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. **Cell Mol Life Sci.** 60, 1407-1426.
138. 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, 12-15.
139. Tan, D.X., Manchester, L.C., Reiter, R.J., Plummer, B.F., Limson, J.S.T. Weintraub W. Qi. 2000. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: A potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. **Free**

- Radical Biol. Med.** 29, 1177–1185.
140. Boyum, A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.** 21, 77-89.
141. Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P.M., McGahon, A.J., Rader, J., van Schie, R.C.A.A., LaFace, D.M., Green, D.R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* 182, 1–12.
142. 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, 271–279.
143. Takino, M., Daishima, S., Nakahara, T. (2003). Determination of perfluorooctane sulfonate in river water by liquid chromatography/atmospheric pressure photoionization mass spectrometry by automated on-line extraction using turbulent flow chromatography. **Rapid Commun. Mass Spectrom.** 17, 383-390.
144. Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. (1994). Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase. **Methods Enzymol.** 233, 502-512.
145. Torano, J.S., Verbon, A., Guchelaar, H.J. (1999). Quantitative determination of thalidomide in human serum with high-performance liquid chromatography using protein precipitation with trichloroacetic acid and ultraviolet detection. **J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.** 734, 203-210
146. de Brum-Fernandes, A.J., Rodrigues, C.J., Cossermelli, W. (1987). Arthritis induced by antigen in rabbits: standardization of induction methods and evaluation of the articular inflammatory process. **Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.** 42, 164-72.
147. Cochrane, C.G. (1977). Role of granulocytes in immune complex-induced tissue injuries. **Inflammation.** 2, 319-333. Review.
148. Sugahara, M., de Tolosa, E.M., Goffi, F.S., Behmer, O.A. (1976). Histopathological aspects of the liver of rats subjected to subtotal jejunoileal resection. **AMB Rev Assoc Med Bras.** 22, 289-95.

149. Carvalho, S.R.Q. (2003). Quinurenaminas: reações de deformilação, oxidação por peroxidases e efeito na atividade microbicida de neutrófilos. **Dissertação Mestrado**. FCF/USP 80p.
150. Adams, D.H., Lloyd, A.R. (1997). Chemokines: leukocyte recruitment and activation cytokines. **Lancet**. 349, 490–495.
151. DeLeo FR, Renee J, McCormick S, Nakamura M, Apicella M, Weiss JP, Nauseef WM. Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly.
152. Silva, S.O., Rodrigues, M.R., Carvalho, S.R.Q., Catalani, L.H., Campa, A. Ximenes, V.F. (2004). Oxidation of melatonin and its catabolites, N^1 -acetyl- N^2 -formyl-5-methoxykynuramine and N^1 -acetyl-5-methoxykynuramine, by activated leukocytes. **J. Pneal Research** 37, 171-175.
153. Kettle, A.J., Candaeis, L.P. (2000). Oxidation of tryptophan by redox intermediates of myeloperoxidase and inhibition of hypochlorous acid production. **Redox Rep**. 5, 179-184.
154. Edwards, S.W., Say, J.E. and Hart, C.A. (1987). Oxygen-dependent killing of *Staphylococcus aureus* by human neutrophils. *J Gen Microbiol*. 133 (Pt 12), 3591-3597.
155. 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, 1231-1242.
156. Beni, S.M., Kohen, R., Reiter, R.J., Tan, D.X., 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, 149-151.
157. Kroemer, G. (1997). The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. **Nat Med**. 3, 614-620. Review.
158. Moulding, D.A., Quayle, J.A., Hart, C.A., Edwards, S.W. (1998). Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival. **Blood**. 92, 2495-2502.
159. Maianski, N.A., Roos, D., Kuijpers, T.W. (2004). Bid truncation, bid/bax targeting to the mitochondria, and caspase activation associated with neutrophil apoptosis are inhibited by granulocyte colony-stimulating factor. **J Immunol**. 172, 7024-7030

160. Fabris, C., Soardo, G., Falletti, E., Toniutto, P., Vitulli, D., Federico, E., Del Forno, M., Mattiuzzo, M., Gonano, F., Pirisi, M. (1998). Relationship among hepatic inflammatory changes, circulating levels of cytokines, and response to IFN-alpha in chronic hepatitis C. **J. Interferon Cytokine Res.** 18, 705-709.
161. Costantino, G., Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Caputi, A.P. (1998). Protective effects of melatonin in zymosan-activated plasma-induced paw inflammation. **Eur. J. Pharmacol.** 363, 57-63.
162. Cuzzocrea, S., Zingarelli, B., Costantino, G., Caputi, A.P. (1998). Protective effect of melatonin in a non-septic model induced by zymosan in the rat. **J. Pineal Res.** 25, 24-33.
163. Cuzzocrea, S., Tan, D-X., Costantino, G., Mazzon, E., Caputi, A.P., Reiter, R.J. (1999). The protective role of endogenous melatonin in carrageenan-induced pleurisy in the rat. **FASEB J.** 13, 1930-1938.
164. Gitto, E., Karbownik, M., Reiter, R.J., Tan, D.X., Cuzzocrea, S., Chiurazzi, P., Cordaro, S., Corona, G., Trimarchi, G., Barberi, I. (2001). Effects of melatonin treatment in septic newborns. **Pediatr Res.** 50, 756-60.
165. Raghavendra, V., Agrewala, J.N., Kulkarni, S.K. (2000). Melatonin reversal of lipopolysaccharides-induced thermal and behavioral hyperalgesia in mice. **Eur J Pharmacol.** 395, 15-21.
166. Wu, C.C., Chiao, C.W., Hsiao, G., Chen, A., Yen, M.H. (2001). Melatonin prevents endotoxin-induced circulatory failure in rats. **J. Pineal Res.** 30, 147-56.
167. Lissoni, P., Rovelli, F., Malugani, F., Bucovec, R., Conti, A., Maestroni, G.J. (2001). Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. **Neuroendocrinol Lett.** 22, 45-47.
168. Reiter, R.J., Tan, D.X. (2003). What constitutes a physiological concentration of melatonin? **J Pineal Res.** 34, 79-80.
169. Tricoire, H., Locatelli, A., Chemineau, P., Malpoux, B. (2002). Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. **Endocrinology.** 143, 84-90.
170. Almeida, E.A., Klitzke, C.F., Martinez, G.R., Medeiros, M.H., Di Mascio, P. (2004). Synthesis of internal labeled standards of melatonin and its metabolite N^1 -acetyl- N^2 -formyl-5-methoxykynuramine for their quantification

using an on-line liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry system. **J Pineal Res.** 36, 64-71.

171. Rozov, S.V., Filatova, E.V., Orlov, A.A., Volkova, A.V., Zhloba, A.R., Blashko, E.L., Pozdeyev, N.V. (2003). *N*¹-acetyl-*N*²-formyl-5-methoxykynuramine is a product of melatonin oxidation in rats. **J Pineal Res.** 35, 245-250.

ANEXO 2: Termo de Consentimento Pós-Informação

São Paulo, _____ de _____ de 20__

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS - INFORMAÇÃO

Eu _____, RG nº _____, declaro que após convenientemente esclarecido e tendo entendido o que me foi explicado, consinto em participar do protocolo de pesquisa **“Oxidação de melatonina e formação de N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina: possíveis efeitos biológicos”**, que utilizará amostras de sangue total ou de liquor (obtido por punção lombar). As amostras de sangue total serão coletadas de indivíduos aparentemente saudáveis e as amostras de liquor serão coletadas somente se houver indicação médica e uma alíquota será utilizada se o diagnóstico for confirmado para meningite viral. O objetivo deste estudo é avaliar o efeito de melatonina, AFMK e AMK em neutrófilos do sangue total e avaliar a presença de melatonina e AFMK nas amostras de liquor. Também serão avaliados no liquor o número de leucócitos e a distribuição diferencial e a concentração de proteínas e citocinas proinflamatórias. Tendo sido devidamente esclarecido que tal participação não apresenta dano à saúde e podendo retirar o consentimento a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo à continuidade de assistência.

Assinatura do Paciente ou do Responsável Legal

Sueli de Oliveira Silva

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
Telefone: 3091-3637

ANEXO 3: LCR de Pacientes com Meningite Viral.

LCR	Idade (anos)	Sexo	Celularidade (mm³)	Citomorfologia	Proteínas Totais (mg/dL)
1	9	F	14 células	L06; M07; N83; MΦ01	28
2	5	M	92 células	L04; M03; N90; MΦ03	41
3	6	M	232 células	L14; M17; N67; MΦ02	46
4	13	M	105 células	L33; M01; N66; MΦ01	32
5	29	F	02 células	L00; M00; N00; MΦ00	20
6	4	M	120 células	L03; M02; N94; MΦ01	48
7	9	F	790 células	L02; M01; N95; MΦ02	55
8	10	M	138 células	L19; M30; N46; MΦ04	34
9	35	F	429 células	L78; M06; N16; MΦ02	70
10	6	F	298 células	L12; M31; N55; MΦ01	43
11	4	M	592 células	L20; M18; N53; MΦ02	55
12	7	M	5,7 células	L08; M15; N72; MΦ05	33
13	3	M	176 células	L90; M04; N06; MΦ05	67
14	8	M	1.088 células	L01; M01; N97; MΦ01	105
15	14	M	274 células	L07; M01; N92; MΦ01	43
16	3	F	70 células	L05; M03; N90; MΦ02	36
17	3	M	300 células	L05; M03; N90; MΦ02	47
18	1	M	6970 células	L11; M11; N78; MΦ03	191
19	33	M	60 células	L14; M08; N77; MΦ05	145
20	5	F	1.070 células	L02; M04; N92; MΦ01	56

L= linfócitos;

M= Monócitos;

N= Neutrófilos;

MΦ= Macrófagos;

ANEXO 4: LCR de Pacientes Usado como Amostras Controle.

LCR	Idade	Sexo	Celularidade (mm³)	Proteínas Totais (mg/dL)
1	2 meses	F	5,0 células	11
2	2 meses	M	20 células	42
3	27 anos	M	1,0 célula	25
4	61 anos	F	2,7 células	23
5	1 anos	F	1,7 células	17
6	52 anos	M	36 células	36
7	19 anos	F	2,0 células	29
8	21 anos	M	1,0 célula	23

ANEXO 5: Trabalhos Publicados e Submetidos no Período**Trabalhos Publicados no Período**

Myeloperoxidase-catalyzed oxidation of melatonin by activated neutrophils.

Oxidation of melatonin and its catabolites, *N*¹-acetyl-*N*²-formyl-5-methoxykynuramine and *N*¹-acetyl-5-methoxykynuramine, by activated leukocytes.

Neutrophils as a specific target for melatonin and kynuramines: effects on cytokine release.