

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – UFTM
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Aletéia Marieta da Silva Seabra

Efeito da melatonina sobre a migração de leucócitos, produção de óxido nítrico,
citocinas e substâncias oxidantes na endotoxemia.

Uberaba - MG

2012

ALETÉIA MARIETA DA SILVA SEABRA

Efeito da melatonina sobre a migração de leucócitos, produção de óxido nítrico, citocinas e substâncias oxidantes na endotoxemia.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas. Área de Concentração I: Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Martins Tavares Murta.

Co-orientadora: Profa. Dra. Karina Ferrazolli Devienne Vicentine

Uberaba – MG

2012

ALETÉIA MARIETA DA SILVA SEABRA

Efeito da melatonina sobre a migração de leucócitos e produção de óxido nítrico, citocinas e substâncias oxidantes na endotoxemia.

Esta dissertação foi submetida ao processo de avaliação da Banca Examinadora para a obtenção do Título de:

MESTRE EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

e aprovada na sua versão final em 01/03/2012, atendendo às normas da legislação vigente da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Área de concentração I: Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia.

Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva
Coordenador do CPGCF/UFTM

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Beatriz Martins Tavares Murta
- Orientadora –
Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM / MG

Profa. Dra. Maria Angélica O. Mendonça
Universidade Federal de Uberlândia
UFU / MG

Profa. Dra. Marcia Benedita de O. Silva
Universidade Federal do Triângulo Mineiro
UFTM / MG

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, pelo dom da vida e pela oportunidade de realizar este trabalho, dando-me forças nos momentos mais difíceis.

À Dra. Beatriz Martins Tavares Murta, pela orientação, confiança, paciência, amizade e principalmente, pelas preciosas oportunidades de desenvolvimento profissional e pessoal. Palavras não conseguirão exprimir todo o meu agradecimento, mas tenha a certeza que lhe devoto uma grande admiração e profunda gratidão.

À Dra. Karina Ferrazolli Devienne Vicentine, pela co-orientação, contribuição imensurável em meu crescimento científico na área de farmacologia, estímulo, compreensão, sugestões na elaboração desta dissertação e pelo agradável convívio diário.

Ao Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva, pela disponibilidade, paciência, confiança e oportunidade de aprendizagem profissional oferecida inicialmente, sem as quais a concretização desse sonho seria com certeza, impossível.

À equipe de desenvolvimento técnico: Beatriz Cibele Resende Gerolin, Douglas Còbo Micheli, Januário Barbosa dos Santos Jr., pois sem ela nada teria sido possível. Pelos ensinamentos das técnicas, pela paciência, amizade, pelas palavras de conforto nos momentos de aflição e pela forma carinhosa que sempre me trataram dentro e fora do laboratório.

Minha gratidão ao revisor textual, Sérgio Manoel Rosa, pela amizade, disponibilidade e agilidade.

À Elisabete Perez Caramori Ambrósio, pelo receptivo sorriso e sempre presente boa vontade em auxiliar em tudo o que era possível e, até mais.

Aos professores André Luís Pedrosa e Virgínia Oliveira Crema (banca de qualificação) pelo profissionalismo, atenção, dedicação e carinho com que fizeram suas colocações.

À minha mãe pela compreensão quanto à minha ausência, só tenho a agradecer tudo que faz por mim.

Aos colegas de trabalho, pelas trocas de plantão e horas de serviço nas quais ficaram sobrecarregados para me auxiliar.

A todos que direta e indiretamente colaboraram para que eu desse mais esse passo a caminho do meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Por último, e de modo especial ao meu esposo, pela paciência, apoio, compreensão pela companhia nas noites mal dormidas ou não dormidas e tudo o mais que seria indescritível em palavras.

A permanência é uma ilusão, apenas a mudança é real.

Heráclito de Éfeso

RESUMO

A melatonina, principal hormônio produzido pela pineal, pode também ser produzida por outros tecidos e células. Diversos estudos relacionam a melatonina a funções imunomodulatórias, de forma dose-dependente. Considerando sua ação antioxidante e anti-inflamatória, avaliou-se o efeito protetor da melatonina na endotoxemia grave, induzida pela administração intraperitoneal de LPS (10 mg/kg) em camundongos. O tratamento com a melatonina (10 e 20 mg/kg, via subcutânea) foi realizado 30 min antes e 1h após o LPS. A endotoxina causou 80% de mortalidade após uma semana, e a melatonina aumentou a sobrevivência para 80%, por até 7 dias para o grupo tratado com a menor dose. Para identificar mecanismos envolvidos no efeito protetor da melatonina, foram avaliados parâmetros inflamatórios após a inflamação peritoneal induzida por tioglicolato. Os resultados demonstraram efeito diferencial da melatonina sobre a infiltração de neutrófilos, dependendo do período de observação. Em 6 h houve intensa redução no número de neutrófilos emigrados para o sítio inflamatório, nos animais com endotoxemia, comparado ao controle, e também nos grupos da melatonina. Porém, a dose de 10 mg/kg aumentou parcialmente ($p=0,052$), a migração de neutrófilos comparado ao LPS. Já após 24 h esta migração não apresentou diferenças entre os grupos controle e LPS. A comparação do grupo do LPS mostra recuperação da capacidade de migração de neutrófilos após 24 h da endotoxemia. Ainda, neste tempo a melatonina inibiu a migração de neutrófilos estimulada pelo tioglicolato, comparado ao controle e ao LPS. Considerando que o efeito inibitório do LPS sobre a migração de neutrófilos pode ser mediado pelo NO, os metabólitos de NO foram quantificados no soro e lavado peritoneal, através da reação de Griess. Houve aumento nas concentrações de NO no soro após 6 e 24 h, no grupo do LPS comparado ao controle, reduzido significativamente pela melatonina (10 mg/kg) após 24 h. No lavado peritoneal não foram detectadas diferenças significativas na produção de nitrito entre os grupos controle e LPS. A melatonina, na dose de 20 mg/kg e após 24 h, reduziu a concentração local de nitrito, comparado ao LPS. Houve redução desta produção ao longo dos tempos de avaliação, significativa para o grupo da melatonina 20 mg/kg. A atividade antioxidante local e sistêmica foi determinada através do teste do DPPH. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto à atividade presente no soro nos tempos avaliados. Observou-se redução da atividade antioxidante sistêmica em todos os grupos após 24h da endotoxemia. A atividade antioxidante no lavado peritoneal aumentou significativamente no grupo do LPS, comparado ao PBS, após 24 h, sem diferenças nos grupos da melatonina. Observou-se aumento da atividade antioxidante local em todos os grupos após 24 h. Nossos resultados demonstraram aumentotanto da resposta pró-inflamatória, quanto da anti-inflamatória nos animais administrados com a endotoxina. A melatonina nas duas doses utilizadas, reduziu significativamente as concentrações sistêmicas de TNF- α , mas não de IL-10. A endotoxemia grave foi acompanhada de aumento da produção sistêmica de NO e intensa inibição da migração de neutrófilos seguida de recuperação desta função após 24 h. A melatonina aumentou a sobrevivência, em parte por efeito modulador sobre a migração de neutrófilos e produção sistêmica de NO e TNF- α . Outros mecanismos devem contribuir para o efeito protetor da melatonina em modelo de endotoxemia.

Palavras-chave: Melatonina. Migração de neutrófilos. Óxido nítrico. Atividade antioxidante. Endotoxemia.

ABSTRACT

Melatonin, the main hormone produced by the pineal gland, can also be produced by other tissues and cells. Several studies relate melatonin immunomodulatory functions of form dose-dependent. Considering its antioxidant and anti-inflammatory action, the protective effect of melatonin in the serious, induced endotoxemia was evaluated for the intraperitoneal of LPS (10mg/kg) in mice. Treatment with melatonin (10 and 20 mg / kg, sc) was performed 30 min before and 1 h after LPS. The endotoxin caused 80% mortality after one week and melatonin increased survival to 80% for up to 7 days for the group treated with the lower dose. To identify involved mechanisms in the protective effect of melatonin, inflammatory parameters had been evaluated after the induced peritoneal inflammation for thioglycollate. The results had showed differential effects of melatonin on the infiltration of neutrophils, depending on the period of observation. In 6h had intense reduction in the number of emigrated neutrophils to the inflammatory site, in animals with endotoxemia, compared to control, and also in groups of melatonin. However, the dose of 10 mg / kg increased significantly, but partially, the migration of neutrophils compared to LPS. After 24h, this migration did not present differences between the control groups and LPS. The comparison of the recovery of LPS shows the ability of neutrophil migration after 24 h of endotoxemia. Still, at this time melatonin inhibited neutrophil migration stimulated by thioglycollate, compared to control and LPS. Considering that the inhibitory effect of LPS on neutrophil migration may be mediated by NO, the metabolites had been quantified serum and washed peritoneal, through the Griess reaction. Increases in serum concentrations of NO after 6 and 24 h in the LPS group compared to control, significantly reduced by melatonin (10 mg / kg) after 24 h. In the peritoneal washed one, had not been detected significant differences in the production of nitrite between LPS an control groups. The melatonin in the dose of 20 mg / kg and after 24 h, reduced the local concentration of nitrite, compared to LPS. There was a reduction of production over the time of evaluation, significant for the group of melatonin 20 mg / kg. The local and systemic antioxidant activity was determined through the DPPH test. There was no significant difference between groups in terms of activity present in serum in the evaluated times. 24h of the endotoxemia was after observed reduction of the systemic antioxidant activity in all the groups. The antioxidant activity in peritoneal washed increased significantly in LPS group compared to PBS after 24 h, without differences in the groups of melatonin. There was an increase of local antioxidant activity in all groups after 24 h. Our results showed increases in the pro-inflammatory response, as anti-inflammatory in animals administered endotoxin. The melatonin, In the two used doses, significantly reduced the systemic concentrations of TNF- α , but not of IL-10. The severe endotoxemia was accompanied by increased systemic production of NO and intense inhibition of neutrophil migration followed by recovery of function after 24 h. Melatonin increased the survival, in part by modulating effect on the migration of neutrophils and systemic production of NO and TNF- α . Other mechanisms must contribute to the protective effect of melatonin in a endotoxemia model.

Keywords: Melatonin. Migration of neutrophils. Nitric oxide. Antioxidant activity. Endotoxemia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Sobrevida após endotoxemia.....	32
Figura 2	Migração de neutrófilos em diferentes tempos após a endotoxemia.....	34
Figura 3	Migração de neutrófilos comparando-se os tempos de 6 e 24 h após a endotoxemia.....	35
Figura 4	Produção sistêmica de óxido nítrico após endotoxemia.....	36
Figura 5	Produção sistêmica de óxido nítrico comparando-se os tempos de 6 e 24 h após endotoxemia.....	37
Figura 6	Produção local de óxido nítrico após endotoxemia.....	38
Figura 7	Produção local de óxido nítrico comparando-se os tempos de 6 e 24 h após endotoxemia.....	39
Figura 8	Atividade antioxidante sistêmica após endotoxemia.....	40
Figura 9	Atividade antioxidante sistêmica comparando-se os tempos de 6 e 24 h após endotoxemia.....	41
Figura 10	Atividade antioxidante local após endotoxemia.....	42
Figura 11	Atividade antioxidante local comparando-se os tempos de 6 e 24 h após endotoxemia.....	43
Figura 12	Produção sistêmica de TNF- α após endotoxemia.....	44
Figura 13	Produção sistêmica de TNF- α comparando-se os tempos de 6 e 24 h após endotoxemia.....	45
Figura 14	Produção sistêmica de IL-10 após endotoxemia.....	46
Figura 15	Produção sistêmica de IL-10 comparando-se os tempos de 6 e 24 h após endotoxemia.....	47
Figura 16	Produção local de TNF- α após endotoxemia.....	48
Figura 17	Produção local de TNF- α comparando-se os tempos de 6 e 24 h após endotoxemia.....	49
Figura 18	Produção local de IL-10 após endotoxemia.....	50
Figura 19	Produção local de IL-10 comparando-se os tempos de 6 e 24 h após endotoxemia.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CI₅₀	Concentração inibitória
DPPH	1,1-difenil – 2 – picril – hidralazila
DPPH-H	Hidrazina
e NOS	Óxido nítrico sintase endotelial
GPx	Glutaciona peroxidase
IFN-α	Interferon alfa
IL-IB	Interleucina I Beta
IL-10	Interleucina 10
IL-1Ra	Receptor antagonista de interleucina 1
IL-8	Interleucina 8
IP	Intraperitoneal
LPS	Lipopolissacarídeo
MT	Melatonina
MT1	Melatonina 1
MT1A	Melatonina 1 ^a
MT1B	Melatonina 1B
MT2	Melatonina 2
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF-KB	Fator nuclear Kappa B
NO	Óxido nítrico
NO₂⁻	Nitrito
NO₃⁻	Nitrato
NOS	Óxido nítrico síntese
NOS2	Óxido nítrico sintase induzida
NOS3	Óxido nítrico sintase 3
O₂⁻	Ânion superóxido
PBS	Tampão fosfato salino
Ph	Potencial hidrogeniônico
PKC	Proteína quinase C
RN	Recém-nascidos
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SC	Subcutânea
SOD	Superóxido dismutase
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	MELATONINA.....	14
1.1.1	Características gerais e síntese.....	14
1.1.2	Funções e mecanismos de ação.....	15
1.1.3	Resposta inflamatória.....	16
1.1.3.1	Migração celular.....	16
1.1.3.2	Mediadores inflamatórios.....	17
1.1.3.3	Óxido nítrico e substâncias oxidantes derivadas do metabolismo do oxigênio.....	18
1.1.3.4	Sepse e endotoxemia.....	19
2	HIPÓTESE.....	22
3	OBJETIVOS.....	24
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1	MANUSEIO DOS ANIMAIS.....	27
4.2	INDUÇÃO DA ENDOTOXEMIA.....	27
4.3	AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA.....	27
4.4	TRATAMENTO DOS ANIMAIS COM MELATONINA.....	27
4.5	COLETA DE SANGUE PARA OBTENÇÃO DO SORO.....	28
4.6	QUANTIFICAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL.....	28
4.7	DOSAGEM DE CITOCINAS: TNF- α e IL-10.....	28
4.8	DOSAGEM DE METABÓLITOS DE NO.....	29
4.9	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO.....	29
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
5	RESULTADOS.....	31
5.1	SOBREVIDA DOS ANIMAIS APÓS A INDUÇÃO DA ENDOTOXEMIA E	

	EFEITO DA MELATONINA.....	32
5.2	MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL INDUZIDA POR TIOGLICOLATO EM ANIMAIS COM ENDOTOXEMIA: EFEITO DA MELATONINA.....	33
5.3	QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS DE ÓXIDO NÍTRICO NO SORO DE ANIMAIS COM ENDOTOXEMIA E EFEITO DA MELATONINA.....	36
5.4	QUANTIFICAÇÃO DE NITRITO NO LAVADO PERITONEAL DE ANIMAIS COM ENDOTOXEMIA E EFEITO DA MELATONINA.....	37
5.5	QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NO SORO DE ANIMAIS COM ENDOTOXEMIA E EFEITO DA MELATONINA.....	39
5.6	QUANTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NO LAVADO PERITONEAL DE ANIMAIS COM ENDOTOXEMIA E EFEITO DA MELATONINA.....	41
5.7	QUANTIFICAÇÃO DE TNF- α E DE IL-10 NO SORO DE ANIMAIS COM ENDOTOXEMIA E EFEITO DA MELATONINA.....	43
5.8	QUANTIFICAÇÃO DE TNF- α E DE IL-10 NO LAVADO PERITONEAL DE ANIMAIS COM ENDOTOXEMIA E EFEITO DA MELATONINA.....	47
6	DISCUSSÃO.....	52
7	REFERÊNCIAS.....	61
8	APÊNDICES.....	72

1 INTRODUÇÃO



“A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos, mas sim em levantarmo-nos sempre depois de cada queda.”

[Confúcio](#)

1.1 MELATONINA

1.1.1 Características gerais e síntese

A melatonina é um metoxiindro (N-acetil-5-metoxitriptamina), identificado nos extratos da pineal, por Lerner e seus colaboradores, em 1958 (CINGOLANI e ALBERTO, 2004). É derivada do aminoácido triptofano, via síntese da serotonina, por enzimas catalisadoras (AXELROD e WEISSBACH, 1960). É o principal hormônio produzido pela pineal, e responsável por suas funções. No entanto, a pineal produz outros metoxiindóis e vários neuropeptídeos, cuja importância fisiológica ainda é desconhecida. (CINGOLANI e ALBERTO 2004). A melatonina pode também ser produzida por diversos tecidos e sua síntese foi demonstrada na retina, trato gastrointestinal, órgãos linfóides incluindo a medula óssea, timo e células imunocompetentes (GERN e RALPH, 2002; CARRILO-VICO et al., 2004).

Para a biossíntese da melatonina o triptofano é convertido em 5-hidroxitriptofano, por ação da triptofano-hidroxilase, e depois em serotonina, por meio de descarboxilação. Parte da serotonina é oxidada em ácido 5-hidroxiindolacético pela monoamino oxidase; outra parte é captada pelas terminações simpáticas na glândula, e o restante da serotonina é N-acetilada nos pinealócitos a N-acetilserotonina. Esta transforma-se em melatonina por ação de uma enzima metoxilante, a hidroxindoloxoimetiltransferase (CINGOLANI e ALBERTO 2004).

A melatonina é secretada em resposta ao escuro, sendo necessária para a regulação circadiana e vários aspectos fisiológicos e neuroendócrinos (REITER, 1993; PEVET et al., 2002). Esse ritmo não é intrínseco da pineal, pois decorre da atividade rítmica do núcleo supraquiasmático do hipotálamo (REITER, 1991), transmitido à pineal por sua inervação simpática. Ele pode ser abolido pela destruição do núcleo supraquiasmático ou pela denervação simpática da pineal (MACHADO, 2006).

O padrão de secreção da melatonina é alterado quando uma pessoa trabalha à noite ou viaja para lugares de fuso horário diferentes. Há evidências de que a melatonina exógena possa ser benéfica nesta condição, mas a dosagem ideal ainda é desconhecida (STUART, 2002). Durante o dia há pouca atividade e o nível de melatonina na pineal e na circulação são baixos. Durante a noite, a inervação simpática da pineal é ativada, liberando noradrenalina, e os níveis de melatonina circulante aumentam cerca de dez vezes (MACHADO, 2006). A

concentração plasmática de melatonina no homem é de 10 a 300 pg/ml, e sua concentração máxima se observa na época pré-puberal (CINGOLANI e ALBERTO, 2004).

O ritmo circadiano da produção de melatonina pela pineal desaparece pela iluminação contínua, porém não é afetado pelo escuro constante ou pela ablação dos olhos. Ou seja, é influenciado pela iluminação externa, mas regulados por um sincronizador interno, ou “relógio biológico” (CINGOLANI e ALBERTO, 2004).

1.1.2 Funções e mecanismos de ação

A função mais conhecida da melatonina é o controle do ritmo circadiano. Porém, diversos estudos tem demonstrado que ela pode também exercer efeitos imunomodulatório, anti-inflamatório e antioxidante, por meio de diferentes mecanismos. É capaz de inibir a atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) bem como de inativar os efeitos do óxido nítrico, peroxinitrito, e outros radicais derivados do metabolismo do oxigênio (AYODOGAN, YESER, GROKTAS, 2006) e do nitrogênio (REITER, TAN, BURKHARDT, 2002; SUDNIROVICH et al., 2007). Ainda, a melatonina reduz o estresse celular e a peroxidação lipídica (HARA et al., 1996; CARLONI et al., 2008), estimula a atividade e aumenta a expressão genética de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase, aumentando a capacidade de defesa antioxidante total do organismo (SUBRAMANIAN et al., 2007; TAN et al., 2007).

Em estudos *in vivo* a melatonina foi mais efetiva na função antioxidante que a vitamina E (MONTILLA et al., 2001; BAYDAS, CANATAN, TURKOGLU, 2002), beta caroteno (HSU et al., 2000) e vitamina C (HSU et al., 2000; ROSALES-CORRAL et al., 2003),

A melatonina previne a translocação do fator nuclear kappa B (NF-KB), reduzindo a regulação crescente de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e o TNF- α (REITER, 2000; LI et al., 2005; GITTO et al., 2005; KIREEV, *et al*, 2008; CABALLERO et al., 2008). Também pode inibir a produção de moléculas de adesão, reduzindo a migração celular e o edema inflamatório (MALDONADO et al., 2007; MALDONADO, MURILLO-CABEZAS, CALVO, 2009), além de reduzir a apoptose (MEKI, ABEL-GHAFFAR, EL-GIBALY, 2001; RODOGNA et al., 2007; JOU et al., 2007).

A melatonina atua através de receptores MT1 e MT2, de modo direto ou indireto. Foram identificados dois tipos de receptores: 1) MT1A, encontrados no núcleo supraquiasmático e *par tuberalis* da adenohipófise e, 2) MT1B, identificado na retina,

hipocampo e em todo o cérebro. Mas há também receptores para melatonina na pineal, gânglio cervical superior, gônadas, células do sistema imune e células ósseas (LATINEN e SAAVEDRA, 1990; KRAUSE, DUBOCOVICH, 1991; DUBOCOVICH, 1998). Os receptores MT são receptores acoplados à proteína G, sendo que a ativação desta proteína leva à inibição da atividade da adenilciclase em diversos tecidos como retina e gônadas (MALDONADO et al., 2009).

1.1.3 Resposta inflamatória

1.1.3.1 Migração celular

A inflamação é uma reação dos tecidos vascularizados do hospedeiro frente a um agente agressor, cuja finalidade é a reparação de estruturas e funções, com consequente manutenção da homeostasia tecidual (DEJANA et al., 1995; STITES et al., 2000). Existem vias inflamatórias distintas, e cada uma delas segue uma cascata de eventos biológicos. Muitas dessas etapas são controladas por moléculas regulatórias solúveis, conhecidas como mediadores da inflamação. Um mediador pode produzir efeito definido e/ou estimular a produção de outros mediadores, dando origem a uma resposta integrada (STITES, 2000).

As células que participam da resposta inflamatória, isto é, células inflamatórias, podem ser circulantes, tais como linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, plaquetas, monócitos ou células residentes, como mastócitos e macrófagos. As células endoteliais também participam ativamente deste processo, promovendo a migração e modulando as respostas das células circulantes (STITES et al., 2000).

Em princípios gerais, um agente agressor, que pode ser químico (ex: drogas), físico (ex: calor), biológico (ex: microorganismos), autoimune, ou célula tumoral, age sobre as células residentes induzindo a liberação de mediadores solúveis que, via receptores de membrana, produzem aumento da permeabilidade vascular e exsudação de plasma e células sanguíneas para o meio extravascular (HENSON, 2005). A migração celular é um evento chave na resposta inflamatória de qualquer etiologia e envolve complexos mecanismos moleculares e celulares (BAGGIOLINI et al., 1994).

Dentre os leucócitos circulantes, os neutrófilos são as principais células recrutadas para o sítio da inflamação, em resposta à infecção ou qualquer injúria tecidual, visto que são

os granulócitos mais comumente presentes no sangue periférico, representando cerca de 50 a 60% dos leucócitos circulantes (BOKOCH, 1995).

A migração de neutrófilos até o sítio inflamatório depende da liberação de fatores quimiotáticos locais, como as quimiocinas, capazes de orientar o movimento das células através de um gradiente de concentração (JANEWAY et al., 2000). Os quimioatraentes não apenas direcionam os leucócitos como também ativam essas células. A ativação é um pré-requisito para a migração celular uma vez que determina a capacidade pró-adesiva dessas células ao endotélio, via receptores de membrana e sinalização intracelular, e subsequente extravasamento de neutrófilos (MOSER, WILLIMAN, 2004).

O processo de passagem de leucócitos para o foco inflamatório apresenta-se em três fases: (1) o reconhecimento e adesão transitória do leucócito circulante às células endoteliais; (2) a adesão firme às células endoteliais e, (3) a transmigração através do vaso, num processo coordenado por uma variedade de moléculas, incluindo proteínas de adesão presentes na superfície dos leucócitos e células endoteliais (GRANGER, KUBES, 1994).

Uma vez presentes no sítio de lesão, o tempo máximo de permanência dessas células é de 2 a 4 dias. Os neutrófilos são capazes de fagocitar e de produzir grandes quantidades de mediadores responsáveis por sua atividade microbicida (MALAWISTA et al., 1992; FIERRO et al., 1999), bem como podem ser efetores da lesão tecidual (KEEL et al., 1997).

1.1.3.2 Mediadores inflamatórios

Os mediadores inflamatórios são substâncias químicas derivadas do hospedeiro, secretadas por células ativadas, que modulam a resposta inflamatória (STITES et al., 2000). Dentre os mediadores inflamatórios destacam-se as citocinas, caracterizadas como proteínas (ou glicoproteínas) solúveis de baixo peso molecular (OBERHOLZER et al., 2000). São células produtoras de citocinas os linfócitos, macrófagos, monócitos, células endoteliais, neutrófilos, fibroblastos, hepatócitos, células nervosas e células do músculo liso, dentre outras (KILPATRICK, HARRIS, 1998; GOLDMAN et al., 1998). Esses mediadores não são estocados permanentemente, sua síntese e secreção ocorrem em resposta a um estímulo e, uma vez liberados, apresentam curta meia vida (BELLANTI et al., 1994; ANDERSON, BLUMER, 1997).

O conceito de resposta pró e anti-inflamatória é baseado na codificação de genes para a síntese de citocinas que se autorregulam durante a inflamação, dependendo do estímulo recebido pelas células imunes (DINARELLO, 2000). A resposta imune humana a infecções

graves é mediada principalmente por citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-8 (IL-8). Porém, essas citocinas também ativam a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e o antagonista do receptor de IL-1, IL-1Ra, produzidos por macrófagos e células dendríticas, que estão envolvidos no controle da reação imune inata, sendo que esta resposta de feedback negativo colabora com o controle da resposta imune (DINARELLO, 1997; LOISE et al., 2003).

As citocinas pró-inflamatórias têm amplo espectro de atividades biológicas que coordenam as respostas do organismo contra a infecção. São capazes de estimular a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório e, em consequência, amplificar a resposta inflamatória. Estimulam a síntese de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos, que atuam como opsoninas para a ativação do sistema complemento. A eliminação de micro-organismos opsonizados é aumentada pelo recrutamento dos neutrófilos da medula óssea. Ativam as células endoteliais que induzem a expressão de moléculas de adesão, iniciando-se a interação dos leucócitos com as células endoteliais (DINARELLO, 1991; McKAY, 1993; STRIETER et al., 1993, JANEWAY et al, 2002). Ainda atuam sobre o hipotálamo, como pirógeno endógeno, e sobre as células musculares e adiposas promovendo a mobilização de energia para aumentar a temperatura corporal. Em temperaturas elevadas a replicação bacteriana e viral é reduzida e a resposta imune específica é aumentada (JANEWAY et al., 2002).

1.1.3.3 Óxido nítrico e substâncias oxidantes derivadas do metabolismo do oxigênio

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa de baixo peso molecular, instável, que apresenta meia-vida de 3 a 5 segundos em solução aquosa, em condições fisiológicas de temperatura, pH e tensão de oxigênio (IGNARRO, 1990 e ALDERTON et al, 2001). Difunde-se facilmente através da membrana plasmática e é produzido a partir da conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina mediada pela ação de uma família de enzimas, as NO sintases (NOS). Três isoformas de NOS foram bem descritas. Duas destas, NOS1 (nNOS) e NOS3 (eNOS) sintetizam NO constitutivamente em uma grande variedade de células. A terceira isoforma, NOS2 ou enzima induzida (iNOS), é induzida por vários estímulos imunológicos, sendo capaz de produzir grandes quantidades de NO (KNOWLES, MONCADA, 1994). Este NO é liberado como parte do mecanismo de defesa do hospedeiro, possuindo efeitos citotóxicos e citostáticos sobre células tumorais e organismos invasivos (FORSTERMANN et al., 1994; NATHAN, XIE, 1994).

A expressão da iNOS, e a conseqüente produção de altas concentrações de NO, está associada a processos inflamatórios localizados ou generalizados e/ou injúria tecidual. Mais especificamente, a sinalização da expressão desta enzima pode ser induzida por citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IFN- α , e endotoxinas, como o lipopolissacarídeo (MONCADA, 1992; MORRIS, BILLIAR, 1994).

O NO é um importante modulador do recrutamento de neutrófilos, atuando via inibição da interação leucócito-endotélio (IALENTI et al., 2000; BENJAMIN et al., 2002). Estudos mostram que a inibição da NOS aumenta a adesão de leucócitos a vênulas pós-capilares, enquanto que a administração de NO exógeno diminui a adesão de leucócitos, a infiltração e a injúria tecidual em diferentes modelos de inflamação (KUBES et al., 1991; TAKAHASHI et al., 1992; SPIECKER *et al.*, 1997; SATO et al., 1995; NEILY et al., 1995). Inibidores da NOS aumentam a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório induzido por vários estímulos (TAVARES-MURTA, 2001; BENJAMIN et al., 2002), assim como observado em animais deficientes para NOSi (BENJAMIN, 2002).

Na sepse, o NO é principalmente produzido pela iNOS ativada por TNF- α e IL-8 (ALDERTON et al., 2001). Os mecanismos moleculares pelos quais o LPS leva à produção de citocinas, à expressão de moléculas de adesão e à indução da iNOS etc, requer a ativação de vários fatores de transcrição, dentre eles o fator de transcrição nuclear KB (NF-KB) (LI, KARIN, 1999; PFEIFFER et al., 2000).

A ativação e o recrutamento de leucócitos induz a mecanismos intracelulares que geram produtos tóxicos tais como enzimas proteolíticas, proteínas catiônicas e espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio sendo esses radicais importantes na destruição do agente invasor (ALI et al., 1997). Quando ROS se associam com NO resultam na formação de peroxinitrito, que contribui para o aumento do dano celular (HOLMES; RUSSEL; WALLEY, 2003).

Certos estímulos solúveis ou particulados são capazes de ativar o consumo abrupto de grande quantidade de oxigênio por leucócitos, com conseqüente geração de ROS (IYER *et al.*, 1961). O processo se dá pela ativação, via proteína quinase C (PKC), da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, um complexo multiprotéico com constituintes ligados à membrana plasmática (flavocitocromo b558) e citoplasmáticos (p47phox, p67phox, p40phox e Rac) (CHANOCK *et al.*, 1994).

O flavocitocromo b558 é o responsável pela transferência de elétrons do NADPH citossólico para o O₂ no meio extracelular ou fagossomal, gerando então o ânion superóxido (O₂⁻). Além de lesar patógenos, as ROS também promovem dano à célula endotelial

aumentando assim a permeabilidade vascular, através da destruição da matriz extracelular (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2000).

1.1.3.4 Seps e endotoxemia

A seps é uma síndrome clínica complexa resultante da incapacidade do organismo em regular a resposta inflamatória a um agente infeccioso, com mortalidade variável entre 30 a 70%. Este desequilíbrio pode levar a um quadro clínico leve a grave, até o choque séptico e disfunção múltipla de órgãos (RIEDEMANN et al., 2003). Em um quadro de seps, devem ser avaliados e combatidos três processos distintos, porém interligados, que acontecem concomitantemente: o foco infeccioso, as alterações hemodinâmicas e a resposta inflamatória sistêmica (QUEZADO et al., 1995).

A seps pode ser causada pela produção de endotoxinas como o LPS, e sua interação com receptores específicos na superfície de leucócitos, induzindo à produção de mediadores como citocinas e outras substâncias como ROS e NO (RIETSCHEL, BRADE, 1992; FAHMI, CHABY, 1993; RANDOW et al., 1995; ESKANDARI et al., 1999; CALATAYUD et al., 2002).

O risco de morte e a gravidade da seps podem se correlacionar com a efetividade do tratamento anti-inflamatório (EICHACKER et al., 2002). Pois há uma maciça liberação de mediadores inflamatórios que levam à hipotensão, hipóxia tissular e morte, caracterizando o choque séptico (TITHERADGE, 1999). Ainda, a cascata de inflamação e a ativação do sistema de coagulação associados com a deficiente fibrólise levam a alterações na circulação microvascular podendo ocasionar a síndrome da disfunção múltipla de órgãos e até a morte (SCHLICHTING; MCCOLLAN, 2007).

Até hoje o tratamento de pacientes com seps e choque séptico é feito principalmente por meio de antibióticos e fármacos que atuam sobre as alterações cardiovasculares, não interferindo na resposta inflamatória, podendo ser esse um dos motivos da alta mortalidade (BONE et al., 1992; RIEDEMANN et al., 2003). Sendo um potente antioxidante, a melatonina pode apresentar papel protetor em doenças onde ocorre excesso de produção de radicais livres, como na seps (FULIA et al., 2001; AYDOGAN et al., 2006; GITTO et al., 2009). A melatonina poderia ser opção terapêutica coadjuvante na seps em recém-nascidos e adultos, pela ausência de toxicidade, limitação da resposta inflamatória e da lesão oxidativa (ESCAMES et al., 2006). Em RN ocorre aumento da produção de substâncias oxidantes e o

uso de melatonina pode ser eficaz para reduzir complicações no período neonatal (GITTO et al., 2009).

A importância do LPS como fator de virulência de bactérias gram-negativas baseia-se em estudos que mostram que a administração de LPS em humanos e animais é capaz de reproduzir várias manifestações similares àquelas induzidas por essas bactérias (RIETSCHEL et al., 1994). As atividades biológicas do LPS provêm da ativação de células residentes, células endoteliais e leucócitos. Conseqüentemente, ocorre a síntese e/ou a liberação de outros mediadores endógenos, já citados anteriormente, sendo a ativação das células inflamatórias o fator predominante para o desenvolvimento da endotoxemia (GALANOS, FREUNDENBERG, 1993).

A melatonina é capaz de inibir a atividade da NOS bem como de inativar os efeitos do NO, peroxinitrito e outros radicais derivados do metabolismo do oxigênio (AYDOGAN et al., 2006). Em camundongos com sepse induzida por ligadura e perfuração cecal, a melatonina reduziu o estresse oxidativo nos tecidos, melhorando a função desses órgãos (PASKALOGLU et al., 2004; SENER et al., 2005). Em ratos, a administração de melatonina em diferentes tempos após a peritonite induzida por... reduziu a hipotensão, acompanhado de redução do infiltrado de neutrófilos e de substâncias oxidantes (WU et al., 2008). Na endotoxemia em ratos, o pré-tratamento com melatonina preveniu a hiporeatividade vascular, cujo mecanismo envolveu a redução da produção de NO (BIANCA et al., 2004), assim como preveniu a lesão intestinal oxidativa em ratos recém-nascidos (OZDEMIR et al., 2007). Em camundongos, a melatonina reverteu os distúrbios de motilidade gastrointestinal induzidos pela endotoxina (DE FILIPPIS et al., 2008).

2 HIPÓTESE



“É fazendo que se aprende a fazer aquilo que se deve aprender a fazer.”

Aristóteles

HIPÓTESE

Sendo a melatonina uma substância com ação antioxidante e anti-inflamatória, é possível que apresente efeito protetor em modelo de endotoxemia letal em camundongos. Este efeito poderia ser decorrente da modulação da migração de neutrófilos e redução da produção de NO, modulação de TNF- α , IL-10 e substâncias oxidantes.

3 OBJETIVOS



“Não basta conquistar a sabedoria, é preciso usá-la.”

Cícero

3 OBJETIVOS

Avaliar o efeito da melatonina sobre a resposta inflamatória em camundongos administrados com dose letal de endotoxina, através dos seguintes parâmetros:

- 1) avaliação da sobrevida,
- 2) quantificação da migração de neutrófilos para o sítio de inflamação,
- 3) quantificação da produção local e sistêmica de NO,
- 4) quantificação da porcentagem de atividade antioxidante local e sistêmica.
- 5) Quantificação da produção local e sistêmica de $\text{TNF}\alpha$ e de IL-10

4 MATERIAL E MÉTODOS



“Não há fatos eternos, como não há verdades absolutas.”

Friedrich Nietzsche

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MANUSEIO DOS ANIMAIS

Foram utilizados camundongos C57BL/6 (peso médio: 25 g), sexo masculino, provenientes do biotério da Disciplina de Farmacologia.

O projeto foi aprovado pela CEUA-UFTM, protocolo número 119, em ... (apêndice X). Os animais receberam água e ração *ad libitum* e foram mantidos em gaiolas (410 x 340 x 160 mm - 5 camundongos por caixa), sob fotoperíodo de 12/12h e temperatura ambiente de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Durante os dias de observação da sobrevivência, os animais foram mantidos no biotério anexo à Disciplina de Farmacologia, sob as mesmas condições, até o final do experimento, quando os animais foram então eutanasiados.

4.2 INDUÇÃO DA ENDOTOXEMIA

A endotoxemia foi induzida através da administração de endotoxina (LPS *E. coli* 0111:B4) por via intraperitoneal (i.p.), na dose de 10 mg/kg, diluída em 0,2 ml de PBS. Após 30 min, os animais receberam administração i.p. do estímulo inflamatório tioglicolato 3%, 0,2 ml, para induzir a inflamação peritoneal.

4.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após a indução da endotoxemia, os seguintes parâmetros foram avaliados:

a) sobrevivência, b) quantificação da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, c) níveis de NO no lavado peritoneal e no soro, d) quantificação de atividade anti-oxidante no lavado peritoneal e no soro, e) níveis de TNF- α e de IL-10 no lavado peritoneal e no soro e, f) efeito do tratamento com a melatonina sobre os parâmetros descritos nos itens acima (de a até e). Nos procedimentos descritos nos itens b) até f), os animais foram eutanasiados nos tempos de 6 e 24 h após a endotoxemia.

4.4. TRATAMENTO DOS ANIMAIS COM MELATONINA

Em cada série de experimentos, grupos de animais (n=3 a 10 animais/grupo) foram tratados por via subcutânea (s.c.), 30 min antes e 1 h após a administração da endotoxina, com 0,2 ml de melatonina, nas doses de 10 e 20 mg/kg.

4.5. AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA

Após a indução de endotoxemia a sobrevivência foi avaliada diariamente através da observação dos animais durante 7 dias.

Os animais foram mantidos no biotério da disciplina de farmacologia, em ambiente climatizado ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), recebendo a mesma ração e água.

4.6. COLETA DE SANGUE PARA OBTENÇÃO DO SORO

Nos períodos de 6 e 24 horas após a endotoxemia, e imediatamente antes de serem eutanasiados, os animais foram anestesiados (quetamina, 50 mg/kg, i.p.) para coleta de sangue do plexo orbital, que foi a seguir centrifugado (2000 rpm, 15 min). Os soros obtidos foram estocados a -20°C até a dosagem de metabólitos do NO, de citocinas e de atividade antioxidante.

4.7. QUANTIFICAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL

Após 6 h e 24 h da indução da endotoxemia, os animais foram eutanasiados por uso de éter anestésico inalado em câmara fechada. Para o lavado peritoneal, a pele do abdome foi aberta, sem lesão do músculo, e foram administrados 2 ml de PBS (i.p.) contendo heparina (5 UI/ml) e logo a seguir aspirados e colocados em tubo de ensaio. A contagem total de células foi realizada em microscópio de luz e a contagem diferencial foi feita em lâminas de citocentrífuga, coradas pelo método May-Grunwald-Giemsa. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos $\times 10^6/\text{cavidade}$ (REF TAVARES-MURTA et al., 2001).

4.8. DOSAGEM DE CITOCINAS: TNF- α e IL-10

Após 6 e 24 horas da endotoxemia, os níveis de TNF- α e de IL-10 nas amostras de lavado peritoneal e de soro foram determinados através de ensaio imunoenzimático (ELISA).

As amostras de soro foram obtidas por centrifugação (1500 rpm durante 10 min.) do sangue total (amostras sem anticoagulante) e estocadas em alíquotas de 200 µl em freezer (-20° C), até o dia do experimento. Para a captura de anticorpos, placas de 96 poços foram revestidas com 50 µl/poço do anticorpo específico para TNF-α ou IL-8, diluídos (1 a 3 µg/µl, checar) em solução tampão de ligação (Na₂HPO₄) e incubados por 16-24 h em temperatura de 4°C. As placas foram então lavadas (PBS/Tween 20 0,05%) três vezes e a ligação não específica foi bloqueada (2 h, 37° C) com PBS/BSA 1% (100 µl/ poço). As amostras padrão (curva padrão) foram colocadas nas placas (50 µl/ poço) e incubados por 16-24 h a 4° C. Para a curva-padrão foram utilizadas citocinas recombinantes murinas previamente diluídas em PBS/Tween 20 (2,5 a 10 mg/ml) (TEM ERRO AQUI). As placas foram lavadas e, em seguida, foi adicionado anticorpo anti-citocina biotilado (0,5 a 1 mg/mL ???) diluído em tampão de bloqueio (PBS/BSA 1%). Após 1 h de incubação (37° C), as placas foram lavadas (PBS/Tween 20) e o conjugado avidina-peroxidase previamente diluído em tampão de bloqueio (1:5000) foi adicionado (100 µl/ poço). A placa foi novamente incubada por 30 min em temperatura ambiente. Após este período de tempo as placas foram lavadas e, em seguida, foi realizada a reação de coloração adicionando-se o substrato 0-fenilenediamina dihidroclorato – OPD (100 µl). As placas foram então incubadas em temperatura ambiente por 15 a 20 min. A reação foi interrompida com H₂SO₄ (50 µl 1M) e a absorbância medida a 490 nm em leitor de placa de ELISA. Os resultados foram expressos em picogramas de cada citocina por mililitro de soro ou lavado peritoneal (BENJAMIM *et al.*, 2000).

4.9. DOSAGEM DE METABÓLITOS DE NO

A quantificação de metabólitos de NO em amostras de soro obtidas dos grupos de animais foi determinada por meio da redução enzimática do nitrato com a nitrato redutase, conforme descrito (SCHMIDT *et al.*, 1989). As amostras (40 µl) foram incubadas com o mesmo volume de tampão redutase (fosfato de potássio 0,1M, pH 7,5; contendo 1 mM de fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo-NADPH, 10 mM de flavina adenina dinucleotídeo-FAD e 4U de nitrato redutase/ml) durante 20 h a 37°C. Uma curva padrão de nitrato foi determinada por incubação de nitrato sódico (10 a 200 µM) com tampão. A quantidade total de metabólitos de NO foi então determinada pelo ensaio colorimétrico baseado na reação de Griess (GREEN *et al.*, 1981). O mesmo procedimento foi utilizado para a quantificação de nitrito em amostras de lavado peritoneal, exceto pela utilização da enzima

nitrito redutase. A absorbância foi medida a 546 nm. Os resultados foram expressos como μM de nitrato (NO_3^-) + nitrito (NO_2^-).

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO

Teste do DPPH: A atividade antioxidante presente nas amostras de soro e lavado peritoneal foi determinada por espectrofotometria utilizando o radical livre DPPH (1,1 – difenil-2-picril-hidrazila), que na presença de um antioxidante ou espécie radicalar é reduzido a hidrazina (DPPH-H), produto estável de coloração amarela. Foram utilizados 80 μL de solução de DPPH e 40 μL de soro em diferentes diluições e, após 30 min, a absorbância foi determinada em 515-518 nm. Como referência de absorção máxima foi utilizada a leitura obtida com 80 μL da solução de DPPH adicionado de 40 μL de água. A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) foi determinada através da equação: $\%AA = \{(A_0 - A)/A_0\} \times 100$; onde A_0 é a absorbância do DPPH sem a substância teste, e A corresponde à absorbância verificada com a adição da amostra teste. A concentração eficiente (CE_{50}) ou concentração inibitória (CI_{50}), quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%, foi determinada por regressão linear. Os testes foram realizados em triplicata e acompanhados de substância antioxidante controle (ácido gálico) (MENSOR et al, 2001).

4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram avaliados pelo programa Sigma Stat 3.1®. A distribuição foi determinada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As médias entre os diferentes tratamentos foram comparadas através de análise de variância seguida do teste de Bonferroni para múltiplas comparações, em caso de distribuição normal, ou Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, em caso de distribuição não normal. Para comparação entre dois grupos foi utilizado o teste t de Student ou Mann-Whitney, respectivamente, em caso de distribuição normal ou não. A sobrevida foi avaliada através do teste exato de Fisher. Os resultados foram expressos em medianas e percentis e as diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.