Priscilla Rachel Oliveira Bastos

Inflamação sistêmica induzida por LPS em anuros da espécie *Rhinella icterica:* efeito sobre os mediadores inflamatórios citocinas, corticosterona e melatonina

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências, na Área de Fisiologia Geral.

Orientadora: Profª Drª Zulma F. S. Ferreira.
Co-orientador: Prof. Dr. Fernando R. Gomes

São Paulo
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira-Bastos, Priscilla Rachel
Inflamação sistêmica induzida por LPS em anuros da espécie Rhinella icterica: efeito sobre os mediadores citocinas, corticosterona e melatonina.
Priscilla Rachel Oliveira Bastos; orientadora Zulma F. S. Ferreira. São Paulo, 2017.
83 f.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Departamento de Fisiologia.

1. *Rhinella icterica*. 2. Corticosterona. 3. Melatonina.

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia. II. Título.

COMISSÃO JULGADORA

Prof(a). Dr(a)

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a)

Prof(a). Dr(a).

Aos meus pais, Aníbal e Jaciana;
Às minhas filhas, Anita e Tarsila
e às Rhinella icterica que compuseram esse estudo.

"Uso a palavra para compor meus silêncios.
Não gosto das palavras
fatigadas de informar.
Dou mais respeito
às que vivem de barriga no chão
tipo água pedra sapo"

Manoel de Barros

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre guiar os meus planos.

Às duas dádivas a mim confiadas e recebidas durante essa caminhada: Anita e Tarsila.

Em especial ao meu querido, Daniel, que compartilha comigo todos os momentos, me incentiva e vibra junto pelas vitórias conquistadas, fazendo muito bem o seu papel de amigo e esposo; e a minha amada Flora, por todos os lambeijos que fazem eu me sentir a pessoa mais especial do mundo.

Aos meus pais, Aníbal e Jaciana, que amo tanto.

Aos meus irmãos muitissimamente amados: Adolfo, Aníbal Sales e Paulo Guilherme.

À minha avó, Antônia e meu avós, Dorina e seu Sales.

Às minhas queridas tias: Taciana, Penépole, Flaviana, Luciana e Elisabeth.

Aos tios Roberto e Tavares; e primos, Lucas, Davi, Matheus, Ícaro, Luana e Erick.

À minha cunhada Makeli, por ter me dado um presente lindo, meu sobrinho Benício.

À minha madrasta Dodora e ao seu filho, Breno Pontes.

Aos meus sogros, Tadeu e Socorro.

Aos meus cunhados: Emanuel, Monique e Fernanda; e aos sobrinhos Gabriel e Tiago.

À minha orientadora, Profª. Zulma Silva Ferreira, pela confiança e oportunidade, pelo cuidado e generosidade em compartilhar a sua sabedoria de forma tão humilde e alegre; além dos momentos de amizade e, principalmente, compreensão com essa minha rotina de mãe de gêmeas.

Ao meu coorientador, Prof. Fernando Gomes por demonstrar que orientar não é somente elevar o caráter científico, mas também fazer permanecer a ética, a humanidade, a caridade e, sobretudo, a alegria de viver. Um professor-pesquisador admirável a quem tenho como exemplo.

À Profª. Regina Markus e ao Prof. Pedro Fernandes, pelos muitos ensinamentos e disponibilidade.

Ao Prof. Carlos Navas pela importantíssima contribuição na escrita dos esboços do projeto de pesquisa.

Aos técnicos Eduardo Braga e Débora Moura, sempre prestativos e sorridentes.

Aos companheiros do Laboratório de Cronofarmacologia: Débora Silva, Gabi, Érika, Sam, Luiza, Daiane, Marina, Eli, Cláudia, Flávia, Letícia, Luiz, Leila e Marco, por fazerem do ambiente de trabalho um lugar prazeroso e agradável.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Comportamento e Fisiologia Evolutiva, os quais tenho imenso carinho e admiração: Stefanny, Braz, Vânia, Bruna, Carla, Adriana, Jéssica, Popetar e Faride pela cumplicidade e força de sempre.

Aos amigos Benedito e Stefanny, pela importantíssima e necessária ajuda no trabalho de campo em São Luiz do Paraitinga – SP.

Ao Braz, Vânia e, em especial ao Eduardo Braga e Stefanny pelo super auxílio com os experimentos. Sem vocês não seria possível!

Aos amigos do Departamento de Fisiologia: Roseli, Elisa, Antônio, Juan, Mariana, Ananda, Isabel, Gustavo, Camila, Jesus e Dani.

Ao Roberto Kodama, por toda paciência, companheirismo e confiança. Por me ajudar desde quando tudo ainda eram só possibilidades. Foi peça-chave para tudo acontecer!

À Heloísa Matsumoto, Isabela Soriano e Patrícia Lúcio, pela irmandade de sempre.

À Carolina Shecaira, por me dispensar uma amizade comparável ao amor de irmã. Foi uma âncora durante meu puerpério e perda da minha mãe. Nunca terei como agradecer tamanho cuidado.

Aos amigos que fizeram esses cinco anos em São Paulo bem mais fáceis: Murilo Del Grande, Marcela Pontes, Henrique Figueiredo, Leôncio Júnior, Fernanda Becker, Gustavo Fernandes, Fábio Alex, Danilo Mogli, Laura Plens, Roberta Magnelli, Mayna Venturini, Rafael Ramalhoso, Isabella de Carvalho, Viviane Vieira, Lara e Andrea.

Ao Cícero Melo, Ana Paula Guerreiro, Cibelly Brandão e Paula Portela por se mostrarem os amigos mais verdadeiros e disponíveis que alguém poderia ter.

Aos amigos que ficaram no Ceará ou distribuídos por esse mundão de meu Deus, mas, ainda assim, permanecem bem próximos: Natália Serafim, Emanuel Bezerra, Luiz Neto, Marcelo Bezerra, Sarah Araújo, Giseli Bezerra, Denise Barbosa, Ana Synthia, Beth Amaral, Tiago Sobreira, Auriela Azevedo, Sonielly de Almeida, Larissa Rocha, Evelina Lima, Paulo Gomes, Germano Morais, Lissa Melo, Priscila Ximenes, Helane Andrade, Samuel Brandão, Sônia Machado, Michele Forte, Cleuton Portela, Bruna Costa, Adelle Pereira e Maria Gomes.

À CAPES e FAPESP, pelo auxílio financeiro.

A todos vocês, minha sincera gratidão.

Sumário

INTRODUÇÃO 8

Inflamação sistêmica induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em anfíbios

Moduladores de processos de defesa dos organismos

OBJETIVOS 28

MATERIAL E MÉTODOS 29

Animais

Estratégia Experimental

Admnistração de Lipopolissacarídeo (LPS) de Escherichia coli

Variáveis medidas

Citocinas

Corticosterona

Melatonina plasmática e ocular

Análise dos dados

RESULTADOS 35

DISCUSSÃO 41

CONCLUSÕES 48

RESUMO 49

ABSTRACT 51

REFERÊNCIAS 53

SÚMULA CURRICULAR 65

ANEXOS 68

Lista de Abreviaturas

α	alfa
β	beta
ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
AA-NAT	enzima arilalquilamina N-acetiltransferase
AFMK	N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina
AMK	N^1-acetil-5-metoxiquinuramina
ANOVA	análise de variância
ASMT	acetilmetil transferase
ATP	adenosina 5'-trifosfato
CBG	proteína de ligação de corticosterona
CORT	corticosterona
COX-2	ciclo-oxigenase 2
CRH	hormônio liberador de corticotropina
DNA	ácido desoxirribonucléico
DAMPs	padrões moleculares associados a dano
ELISA	ensaio imunoenzimático
epm	erro padrão da média
GM-CSF	fator estimulador de colônia de granulócitos macrófagos
GR	receptor de glicocorticoide
HHA	eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
IBAMA	Inst. Bras. do Meio Ambiente e dos Rec. Naturais Renováveis
IFNϒ	interferon gama

IL-1β	interleucina 1 beta
IL-2	interleucina 2
IL-4	interleucina 4
IL-6	interleucina 6
IL-10	interleucina 10
IL-12p70	interleucina 12p70
IL-17	interleucina 17
IL-17A	interleucina 17 A
iNOS	óxido nítrico sintase
LPS	lipopolissacarídeo
MAP	proteína ativada por mitógenos
MCP1	proteína quimiotáxica de monócito
MCR2	melanocortina 2
MT1	receptor de melatonina 1
MT2	receptor de melatonina 2
Mel1c	receptor de melatonina 1c
NAS	N-acetilserotonina
NF-κB	fator nuclear kappa B
NO	óxido nítrico
P450c11	11 β-hydroxylase
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos
PBS	tampão fosfato salino
PGE2	prostaglandina E2
PNPP	p-nitrofenilfosfato
PVC	policloreto de vinila

RNS	espécies reativas de nitrogênio
ROS	espécies reativas de oxigênio
TLR-4	receptor Toll-4
TLRs	receptores Toll
TNF	fator de necrose tumoral
ZT	*zeitgeber time*
mm e mg	milímetros e miligramas, respectivamente
nm	nanômetro
rpm	rotação por minuto
µL e mL	microlitro e milititro, respectivamente
µM e mM	micromolar e milimolar, respectivamente

INTRODUÇÃO

Os anuros representam o grupo de anfíbios mais abundante, com cerca de 6777 espécies viventes (FROST, 2017) e também que apresenta maior distribuição geografica (VITT & CALDWELL, 2009) são os anuros. Estes são popularmente conhecidos como sapos, rãs e pererecas. A maioria das espécies do grupo necessita da existência de corpos d'água para reproduzir-se e desenvolver-se, apresentando um ciclo de vida bifásico, típico de anfíbios, por possuírem uma fase aquática e outra terrestre (REGUERA, 2012). Cabe destacar que na fase aquática, girinos apresentam hábito diurno de atividade (CONDEZ et al., 2009).

Um declínio populacional de anfíbios vem sendo reportado desde o início da década de 1970. Dentre as causas para esse fenômeno, têm se destacado a destruição do hábitat e a ocorrência de doenças infecciosas causadas por fungos como Chytridiomycota; Chytridiales (BERGER et al., 1998), bactérias patogênicas como *Aeromonas hydrophilla* (TAYLOR et al., 1999) e iridovírus (CUNNINGHAM et al., 1996). É interessante notar também a existência de variações interespecíficas na tolerância e resistência a patógenos (BRADFORD et al., 1994; CAREY, 1993) levantando a questão da necessidade de ampliar o conhecimento dos aspectos da imunidade inata nestes animais.

Neste trabalho, utilizamos como modelo a espécie *Rhinella icterica* (Ordem Anura; Família Bufonidade), cuja nomenclatura antiga é *Bufo icterica* (SPIX, 1982). É um sapo grande do grupo *Rhinella marina* (MACIEL et al., 2010),

onde o macho mede cerca de 98-130 mm e a fêmea, 110-165 mm. Essa espécie apresenta distribuição geográfica associada a ambientes florestados (Mata Atlântica), contudo, indivíduos da espécie são facilmente encontrados em áreas antropomorfizadas (MACIEL et al., 2010). Na América do Sul, podem ser encontrados desde o sudeste e sul do Brasil, até o norte da Argentina e leste do Paraguai. Esses animais possuem hábito terrícola, atividade noturna e como estratégias de defesa, inflam o corpo, se camuflam com o meio e possuem glândulas de veneno. A estação reprodutiva se dá de agosto a janeiro, meses que ocorrem os principais períodos de desova, e quando podemos encontrar animais vocalizando em riachos e em poças de água parada. A desova se dá por grandes cordões gelatinosos, com milhares de ovos escuros depositados em partes rasas da água durante o amplexo. Os indivíduos recém-metamorfoseados, medindo cerca de 9-10 mm, deixam o sítio reprodutivo em meados de novembro e dezembro ao mesmo tempo (MACIEL et al., 2010).

Inflamação sistêmica induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em anfíbios

Pirógenos exógenos, como o lipopolissacarídeo (LPS), endotoxina purificada de um composto da parede celular de bactérias gram-negativas, como *Escherichia coli*, atuam como agentes estressores promovendo ativação da resposta imune inata (KLUGER, 1991).

A etapa inicial de reconhecimento do LPS envolve sua interação com a proteína LBP (do inglês, lypopolysaccharide binding protein), proteína solúvel encontrada no plasma que permite o transporte de LPS para a superfície das

células. LPS exerce seus efeitos intracelulares através da ligação a receptores TLR-4 (do inglês, toll-like receptor 4) expressos na membrana celular (Figura 1). A ativação da casacata de sinalização intracelular envolve inicialmente o recrutamento de proteínas adaptadoras, como MyD-88 (do inglês, myeloid differentiation primary response gene 88) que recrutam adaptadores subsequentes, como IRAK (do inglês: IL-1 receptor-associated kinase) e TRAF6 (do inglês: TNF receptor-associated fator 6), formando complexos regulatórios ancorados ao receptor TLR4 . Como consequência, uma via de sinalização intracelular é iniciada e resulta na ativação do complexo de quinases IKK que catalisa a fosforilação da proteína inibitória IKBα sinalizando para que esta proteína seja degradada por proteassomas. Após a degradação da proteína inibitória, dímeros do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB) ficam livres no citoplasma para translocarem ao núcleo. A translocação nuclear do NF-κB estimula a transcrição de genes que codificam mediadores pró-inflamatórios, como óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE2) e citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 1β (IL-1β), entre outros (LU et al., 2008).

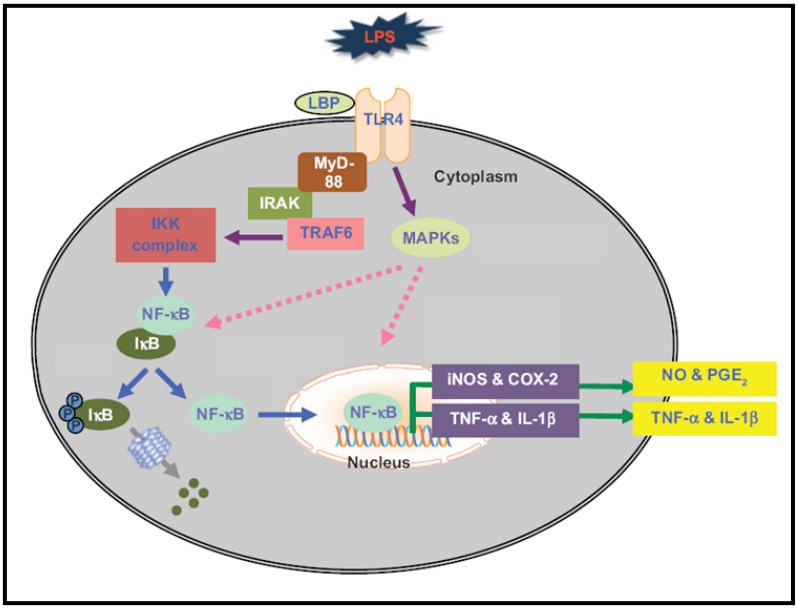

Figura 1 – Representação esquemática do mecanismo intracelular desencadeado pela ativação do receptor Toll-4 (TLR-4) por LPS. MyD88: (do inglês, myeloid differentiation primary response gene 88; IRAK: do inglês: IL-1 receptor-associated kinase; TRAF6: TNF receptor-associated fator 6; IKK: proteína quinase de IKB; IkB: proteína inibitória kappa B; NF-kB: fator de transcrição nuclear kappa B; iNOS: sintase de óxido nítrico induzida; COX-2: cicloxigenase-2, TNF: fator de necrose tumoral; IL-1β: interleucina 1β; NO: óxido nítrico; PGE2: prostaglandina E2. Modificado de LU et al., 2008.

Estudos realizados com *Rhinella paracnemis* demonstraram que após a administração de LPS via sacos linfáticos, observa-se o desenvolvimento de febre comportamental - fenômeno relacionado a mudanças no sítio de termorregulação - por um mecanismo dependente da síntese de prostaglandinas (BICEGO et al., 2002; BICEGO-NAHAS et al., 2000; BRANCO & MALVIN, 1996; BRANCO & STEINER, 1999; VALGHN et al., 1974). Outros estudos realizados com anfíbios também demonstraram que a admnistração de

LPS pode acarretar uma elevação de 24% a 100% da taxa metabólica desses indivíduos, o que poderia representar custo energético significativo e uma potencial fonte de compromissos funcionais de investimento em outras funções de relevância para o valor adaptativo (MUCHLINSKI, 1985; SHERMAM & STEPHENS, 1998; LLEWELLYN et al., 2011). Neste sentido, recentemente demosntramos que o tratamento de machos com LPS elevou a temperatura preferencial de 23ºC para 26ºC, caracterizando fenômeno de febre comportamental (MORETTI et al., 2016). Interessantemente, as taxas metabólicas de sapos administrados com LPS e deixados nestas duas temperaturas (23ºC e 26ºC) foram equivalentes, sugerindo menor custo energético da resposta imune na temperatura febril (MORETTI et al., 2016)

Por fim, mudanças comportamentais são também identificadas na presença de citocinas pró-inflamatórias, como a inibição do comportamento reprodutivo, diminuição na atividade de forrageamento, anorexia e redução de ingestão de água (ASHLEY et al, 2012). Indivíduos de *Rhinella marina* apresentaram redução de ingestão de grilos e da atividade locomotora quando tratados com LPS (LLEWELLYN et al., 2011).

Moduladores de processos de defesa dos organismos

Glicocorticóides

A dinâmica de um processo de defesa envolve a ativação do eixo hipotálamo – hipófise - adrenal/interrenal. Em anfíbios, não há a formação de um córtex adrenal como ocorre em mamíferos. As células produtoras dos

hormônios se misturam com os tecidos dos rins e células produtoras de catecolaminas, gerando dificuldade em isolar células adrenocorticais de células dos rins. Por esse motivo, o termo "glândula interrenal" se tornou bastante utilizado quando se trata de anfíbios (CARR & NORRIS, 2005).

Em resposta a variações circadianas, estresse fisiológico e citocinas inflamatórias (IL-1β , por exemplo), o hipotálamo é estimulado a produzir o hormônio liberador de corticotropina (CRH) e arginina vasopressina (AVP) (Fgura 2). Estes hormônios atuam na hipófise anterior e induzem a síntese e secreção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) que, lançados na circulação sanguínea, se ligam a receptores de melanocotina MC_2, receptores de membrana acoplado à proteína Gs, cuja estimulação nas células adrenocorticais resulta em um aumento nos níveis intracelulares de AMPc e esteroidogênese (FONG et al., 2015). Durante o processo de síntese, a molécula de colesterol passa por uma série de transformações enzimáticas que são determinantes na produção de glicocorticoides, sendo o cortisol encontrado em humanos e a corticosterona em roedores e outros vertebrados. Os glicocorticoides, através da circulação sistêmica, se distribuem por todo o organismo e regulam negativamente o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal através de um mecanismo de *feedback* sobre hipotálamo e hipófise e diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β, IL-6 e TNF (CAIN & CIDLOWSKI, 2017).

Em anfíbios adultos, corticosterona e aldosterona são os principais esteroides presentes na circulação (CARR & NORRIS, 2005). Além disso,

quantidades mensuráveis de epinefrina e norepinefrina são detectadas, com predomimância da norepinefrina (CARR & ZOZZARO, 2004).

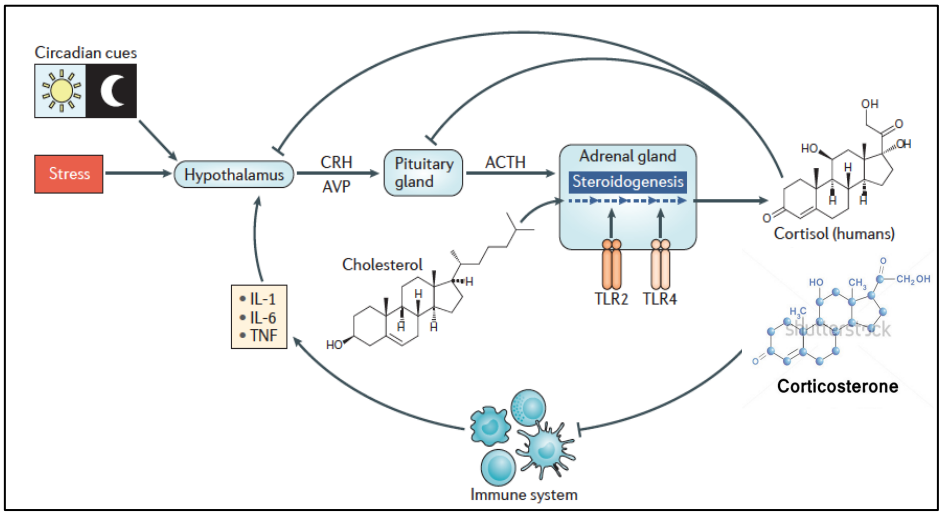

Figura 2 – Regulação do eixo hipotálamo-hipóse-adrenal sobre a produção de glicocorticóides pelo cótex da glândula adrenal/interrenal. CRH: hormônio liberador de corticotropina; AVP: arginina vasopressina; ACTH: hormônio adrenocorticotrópico; TLR2: receptor Toll2; TLR4: receptor Toll4; TNF: fator de necrose tumoral; IL-1: interleucina 1; IL-6: interleucina 6. Modificado de CAIN & CIDLOWSKI (2017).

No espaço extracelular, os glicocorticoides endógenos são inativos devido à ligação com a proteína ligadora de corticosteróides (CBG; do inglês, corticosteroid-binding globulin). Cortisol/corticosterona não ligado é lipossolúvel e difunde-se através das membranas celulares. O glicocorticoide que entra no citoplasma pode ser convertido em cortisona inativa através de modificações enzimáticas pelas enzimas 11β-hidroxiesteroide desidrogenase 2 (11βHSD2) e 11βHSD1 que favorece a reação inversa. A intercalação de cortisol nas membranas plasmáticas pode exercer efeitos não genômicos. O cortisol

citoplasmático liga-se ao receptor de glicocorticoide (GR) formando um complexo chaperona. O GR ligado se transloca para o núcleo para exercer efeitos genômicos, ou tem efeitos não genômicos no citoplasma e mitocôndrias. No interior do núcleo, o GR ligado altera a expressão gênica através de três mecanismos básicos: ligação direta aos elementos de resposta do glicocorticoide (GRE; do inglês, glicocorticoid responsive elements) positivos ou negativos; interações proteína-proteína com outros fatores de transcrição (TFs) que afetam sua atividade transcricional; e ligação composta ao DNA e proteínas. Cada um desses mecanismos permite uma regulação gênica positiva e negativa (CAIN & CIDLOWSKI, 2017) (Figura 3).

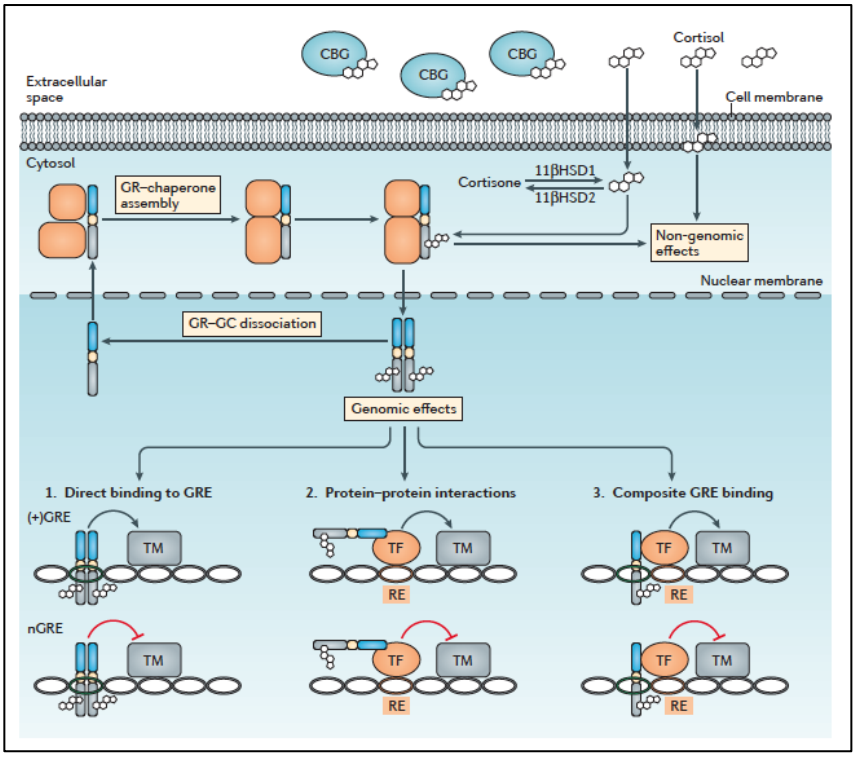

Figura 3 – Mecanismo de ação de glicocorticóides. CBG: proteína ligadora de corticosteroides; 11β-HSD: 11β-hidroxiesteroide desidrogenase; GRE: elemento responsivo ao glicocorticoide; TM: maquinaria transcricional; TF: fator de transcrição. CAIN & CIDLOWSKI (2017).

O aumento da secreção de glicocorticoides é uma clássica resposta endócrina ao estresse. Em resposta a agentes estressores, a secreção de glicocorticoides aumenta aproximadamente uma ordem de magnitude. O tipo e a duração do agente estressor utilizado varia consideravelmente e, sob essa perspectiva, define-se "estresse agudo" a forma de estresse causada por submissão a agente estressor por poucas horas. Se o agente estressor for repetido diariamente e por diversos dias – "estresse subagudo" e, se o mesmo persistir por semanas ou meses, caracteriza-se um estresse crônico (SAPOLSKY et al., 2000). Uma ativação temporária do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal pode ter efeitos benéficos (WINGFIELD et al. 1997; WINGFIELD & ROMERO, 2001), enquanto que, a ativação por longos períodos traz consequências nocivas e uma supressão da resposta imune passa a ser observada (SAPOLSKY, 1992; ROMERO & WINGFIELD, 2001). Dentre os efeitos imunossupressores, podemos destacar a inibição da síntese e liberação de diversas citocinas e outros mediadores que promovem a resposta imune e reações inflamatórias, bem como a atrofia de tecidos linfoides, como o timo (WIEGERS & REUL, 1998; SAPOLSKY et al. 2000).

Ativando o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal a curto prazo e em baixa intensidade, alguns efeitos de reforço do sistema imune são observados, como o aumento da expressão de receptores para diferentes citocinas (WIEGERS & REUL, 1998), bem como a redistribuição de células imunes no organismo, o que leva a um aumento de leucócitos na circulação, com eventual melhoramento na função imune de alguns órgãos (DHABHAR, 2009; MCCORMICK &

LANGKILDE, 2014). Esses estudos também detectaram mecanismos nos quais estressores agudos podem não só aumentar a imunidade inata, mas também a adaptativa. Tais mecanismos envolvem células dendríticas, neutrófilos, macrófagos e tráfico, maturação e função de linfócitos (DHABHAR, 2009; MCCORMICK & LANGKILDE, 2014).

Em concordância com o exposto, Assis e colaboradores (2015) investigaram os efeitos da retenção por longo período em cativeiro, com ou sem restrição de movimentos, sobre a imunocompetência inata em *Rhinella icterica.* Os resultados demonstraram que 24 h de restrição de movimentos é uma situação estressante com induz o aumento dos níveis de corticosterona plasmática em três vezes, sem a constatação de mudanças imunológicas consistentes. Contudo, em animais que tiveram seus movimentos restritos em bolsas por 24 h, houve a potenciação dessa resposta, com aumento de nove vezes dos níveis plasmáticos de corticosterona, além do aumento da relação neutrófilo/linfócito e diminuição da capacidade bactericida plasmática. A aplicação transdérmica de corticosterona, mimetizou os eventos de resposta aguda ao estresse, não sendo observadas mudanças nos parâmetros imunes mesmo após treze dias de tratamento. Este mesmo estudo demonstrou também que longo tempo em cativeiro não levou à diminuição da resposta ao estresse, sendo detectados níveis elevados de corticosterona mesmo depois de noventa dias em cativeiro. Cabe destacar que, um longo tempo em cativeiro nas mesmas condições, levou a um aumento da contagem total de leucócitos e um decréscimo na capacidade bactericida plasmática. Estes achados demonstram,

portanto, que as consequências da resposta ao estresse para esta espécie podem, de fato, ser agravadas pelo tempo em cativeiro (ASSIS et al., 2015).

Em outro estudo, Gomes e colaboradores (2012) compararam os níveis de corticosterona basais e pós-estresse de contenção em três espécies de Bufonídeos, sendo elas *Rhinella icterica*, *R. ornata* e *R. schneideri*. Essas espécies são caracterizadas por diferentes graus de dependência a ambientes florestados. De acordo com essa pesquisa, *R. ornata* – espécie com maior grau de dependência de ambientes florestados – apresentou os maiores níveis de costicosterona basais e pós-estresse de contenção. *R. schneideri* – espécie com distribuição geográfica mais associada a áreas naturalmente abertas ou desmatadas – apresentou a maior capacidade bactericida plasmática. Os autores demonstraram também uma associação negativa interespecífica entre capacidade bactericida plasmática e os níveis basais de corticosterona nesses animais. Isso sugere que a menor imunocompetência das espécies de ambientes florestados poderia estar associada ao efeito imunosupressor da corticosterona, reduzindo suas chances de ocupar áreas naturalmente abertas ou desmatadas. Nesse mesmo estudo, verificou-se que, em *R. ornata*, os níveis basais de corticosterona são equivalentes ao encontrado em *R. schneideri* após estresse experimental de contenção.

Os glicocorticoides possuem, portanto, um efeito bimodal na resposta imune, onde esta poderá ser mediada por diferentes concentrações deste hormônio e, possivelmente, por diferentes receptores (WIEGERS et al. 1993; WIEGERS et al. 1995; WIEGERS & REUL, 1998).

Portanto, em resumo, os glicocorticoides, quando liberados, levam a alterações fisiológicas, metabólicas e comportamentais em resposta ao agente estressor (CARR & NORRIS, 2005).

Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) tem se revelado como uma molécula de distribuição ubíqua e funcionalidade diversa. Em mamíferos, os mecanismos que controlam sua síntese na glândula pineal tem sido bem caracterizados e podem ser acompanhados na figura 4. Específicos comprimentos de onda são detectados através do fotopigmento melanopsina, presente em uma pequena proporção de células ganglionares da retina (1 a 2%) cujos axônios projetam-se para os núcleos supraquiasmáticos (SCN) através do trato retinohipotlâmico (RHT). Estes neurônios liberam glutamato e polipeptídeo ativador de adenilil ciclase da pituitária (PACAP), os quais causam entrainment da expressão de genes do relógio no SCN. A atividade circadiana de células no SCN é uma função de mecanismos de retroalimentação autoregulatórios. Para modular a produção de melatonina pela pineal, neurônios do SCN projetam axônios para o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) do hipotálamo onde liberam ácido aminogamabutírico (GABA). Corpos celulares de neurônios do PVN possuem axônios que descem através de tronco cerebral e coluna intermédio lateral (ILCC), que são neurônios pré-ganglionares simpáticos cujos terminais inervam os pinealócitos após uma sinapse no gânglio cervical superior. A liberação noturna de noradrenalina

estimula a síntese e liberação de melatonina. A melatonina é liberada no sistema vascular sanguíneo e também no fluido cefalorraquidiano (CSF) do terceiro ventrículo. A melatonina sanguínea e do líquor tem livre acesso aos neurônios do SCN onde atuam em receptores metabotrópicos de melatonina MT1 e MT2, influenciando os disparos dos neurônios do SCN ajustando o relógio biológico e regulando os diversos ritmos endógenos dos organismos. (REITER et al., 2010)

A melatonina é sintetizada pela acetilação e metilação da serotonina, através da ação das enzimas arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT) e acetilserotonina-metil-transferase (ASMT), que levam à formação do precursor N-acetilserotonina (NAS) e melatonina, respectivamente (Figura 4). Em todos os vertebrados, a enzima-chave AA-NAT responde às informações fotoperiódicas e, em ectotérmicos, esta enzima é também responsiva à alterações de temperatura. De fato, em algumas espécies de vertebrados ectotérmicos, a temperatura é o principal regulador dos ritmos diário e sazonal de melatonina (DELGADO & VIVIEN-ROELS, 1989; MASUDA et al., 2003).

Uma característica especial da melatonina está na variedade de mecanismos empregados para modular a fisiologia celular. A melatonina exerce suas ações fisiológicas pela interação com receptores de membrana MT1, MT2, MEL1c e proteínas intracelulares, como calmodulina, calreticulina e tubulina, além de uma relevante atividade antioxidante em várias células (BENITEZ-KING et al., 1993; DUBOCOVICH et al., 2005; PANDI-PERUMAL et al., 2008; JOCKERS et al., 2016).

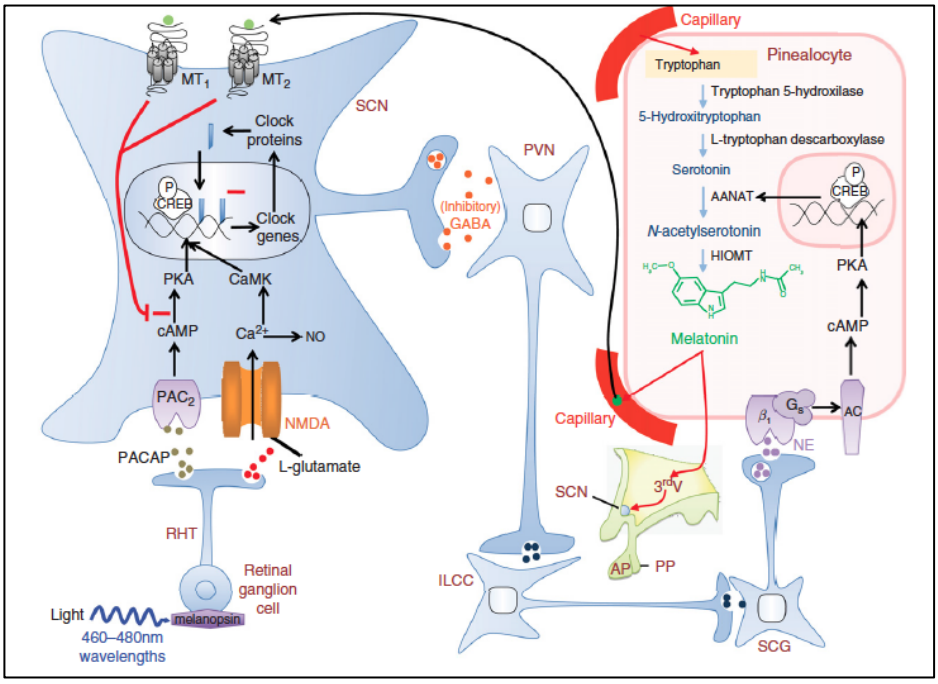

Figura 4 – Síntese de melatonina pela glândula pineal. AANAT: arilaquilamina N-acetil transferase; AC: adeniliciclase; AP: hipófise anterior; β1: receptor beta-1 adrenérgico; CaMK: calmodulina quinase; cAMP: AMP cíclico; CREB: cAMP response-element-binding protein; GS =G stimulatory protein; HIOMT/ASMT: hidroxi-indol-O-metiltransferase/acetil-serotonina-metiltransferase; NO: óxido nítrico; PKA: proteína quinase A; PP: hipófise posterior. Retirado de REITER et al., 2010.

Em anuros o sistema de temporização interna que controla a produção rítmica de melatonina é caracterizado por uma rede de sistemas interconectados que incluem: olhos, regiões encefálicas e a glândula pineal. Vários estudos anatômicos e estruturais indicam que a glândula pineal localiza-se numa área onde a calota óssea é fina sendo também envolta por tecidos menos pigmentados que facilitam, portanto, a percepção luminosa em ectotérmicos (Figura 5).

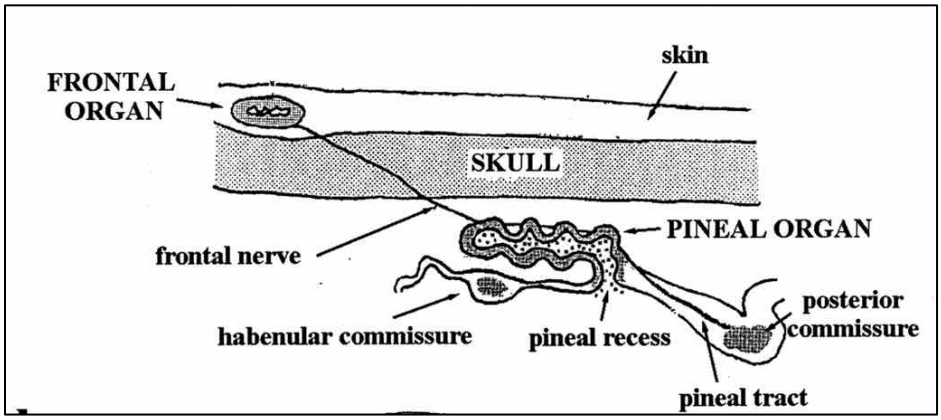

Figura 5 – Glândula pineal e estruturas associadas em anfíbios. Modificado de NORRIS, 2007.

Outra particularidade em relação à síntese de melatonina em ectotérmicos, refere-se ao fato de que a enzima chave na síntese de melatonina – AA-NAT, cuja sequencia de aminoácidos já foi clonada em anfíbios, responde à informação fotoperiódica como em todos os vertebrados e também a alterações de temperatura.

Por este amplo espectro de ações e ausência de toxicidade, a melatonina contribui para a melhora da fisiologia celular e dos organismos encontrando aplicações na medicina humana e veterinária (REITER et al., 2010). Além das ações já citadas, a melatonina atua também na inibição da translocação nuclear de fatores de transcrição (CECON et al., 2010); em processos inflamatórios, potenciando a produção de interleucina 2 (IL-2), interleucina 6 (IL-6) e interferon gama (IFNϒ) em linfócitos e monócitos humanos (GARCIA-MAURIÑO et al., 1997) e participa ativamente na montagem e resolução de respostas inflamatórias (MARKUS et al., 2007). Como

antioxidante, a melatonina possui capacidade tanto de sequestrar diretamente radicais livres quanto de potenciar a atividade de enzimas antioxidantes. Estes efeitos são gerados também por seus metabólitos, N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) e N^1-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK), moléculas com maior atividade antioxidante do que a própria melatonina, capazes de reagir diretamente com moléculas reativas, ROS e RNS (TAN et al., 2007).

A existência de uma interrelação entre as glândulas adrenal e pineal ficou estabelecida com a demonstração de um efeito dual da corticosterona ativando ou inibindo a síntese de melatonina pela pineal, na dependência dos níveis circulantes de corticosterona, ativação de GR e do padrão de ativação de receptores adrenérgicos (FERREIRA et al., 2005; FERNANDES et al., 2009; FERNANDES et. al., 2017). Uma análise de dados de vários laboratórios permitiu hipotetizar que, sob um estresse moderado, a informação hormonal noturna é reforçada, enquanto que sob um grande estresse o organismo perde a diferença hormonal entre o dia e a noite, reduzindo ou mesmo abolindo o pico noturno de melatonina (Figura 6). Os efeitos duais da corticosterona sobre a glândula pineal dependende do padrão de estimulação dos receptores adrenérgicos (FERNANDES et al., 2017). Altas concentrações de glicocorticoides aumentam a produção de melatonina quando a glândula está sob estimulação (FERREIRA et al., 2005, FERNANDES et al., 2009) e inibe a produção deste hormônio quando a estimulação é suficiente para ativar receptores α e β-adrenérgicos (YUWILLER et., 1989, FERNANDES et al., 2017). O mecanismo

que envolve o efeito dual de glicocorticoides sobre a síntese de melatonina é, provavelmente, a habilidade deste hormônio em potenciar ou inibir a atividade da enzima-chave na síntese de melatonina (FERREIRA et al., 2005; YUWILER, 1989).

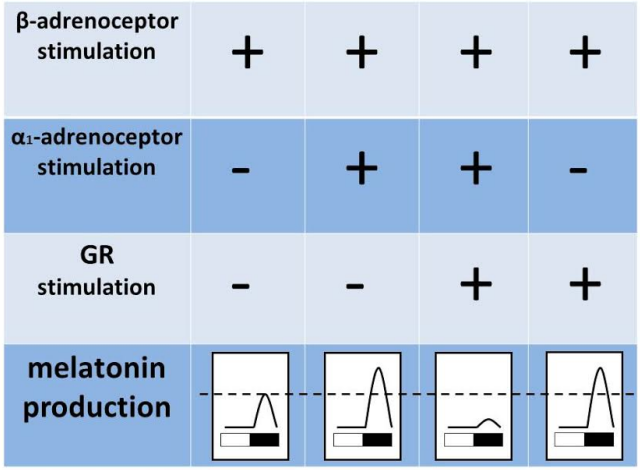

Figura 6 – Efeito da ativação de receptores adrenégicos e de glicocorticoide sobre a síntese de melatonina pela glândula pineal de mamíferos.

Outros agentes inflamatórios também são capazes de modular a via biossintética da melatonina. A citocina TNF, por exemplo, inibe a produção de melatonina e seu precursor N-acetilserotonina em glândulas pineais em cultura por um mecanismo dependente da ativação da translocação nuclear de NF-κB e consequente bloqueio da transcrição da enzima AA-NAT (FERNANDES et al., 2006; CARVALHO–SOUSA et al., 2011).

O fator de transcrição NF-κB participa também na mediação dos efeitos de LPS, via receptores TLR-4 presentes na glândula pineal, levando à inibição da produção de melatonina induzida por noradrenalina em glândulas pineais em cultura (da SILVEIRA CRUZ-MACHADO et al., 2010). Recentemente, nosso

grupo de pesquisa demonstrou também a participação desta via de sinalização na inibição da produção de melatonina por glândulas pineais em cultura estimuladas por peptídeo β-amiloide (CECON et al., 2015). Estes dados demonstram, portanto, a importância da sinalização NF-κB na modulação do sistema melatonérgico por diferentes padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) envolvidos em quadros infecciosos, presentes em bactérias (LPS), fungos e parasitas e a padrões moleculares associados a danos (DAMPs), moléculas endógenas como as citocinas pró-inflamatórias, moléculas da matriz extracelular apresentadas em concentração exacerbada, moléculas intracelulares, como DNA e proteínas chaperonas, dentre outras (MARKUS & CECON, 2013). O entendimento dos mecanismos envolvidos com esta comunicação bidirecional entre o sistema melatonérgico e o sistema imunológico permitiu a descrição do eixo imune pineal (MARKUS et al., 2007). Neste contexto, o controle da produção de melatonina pela pineal por mediadores imunológicos resulta em um controle fino da migração de células imunocompetentes pelo endotélio vascular. Além disso, no local da lesão, a produção de melatonina por células imunológicas aumenta a capacidade destas células em regular a resposta de defesa (Figura 7).

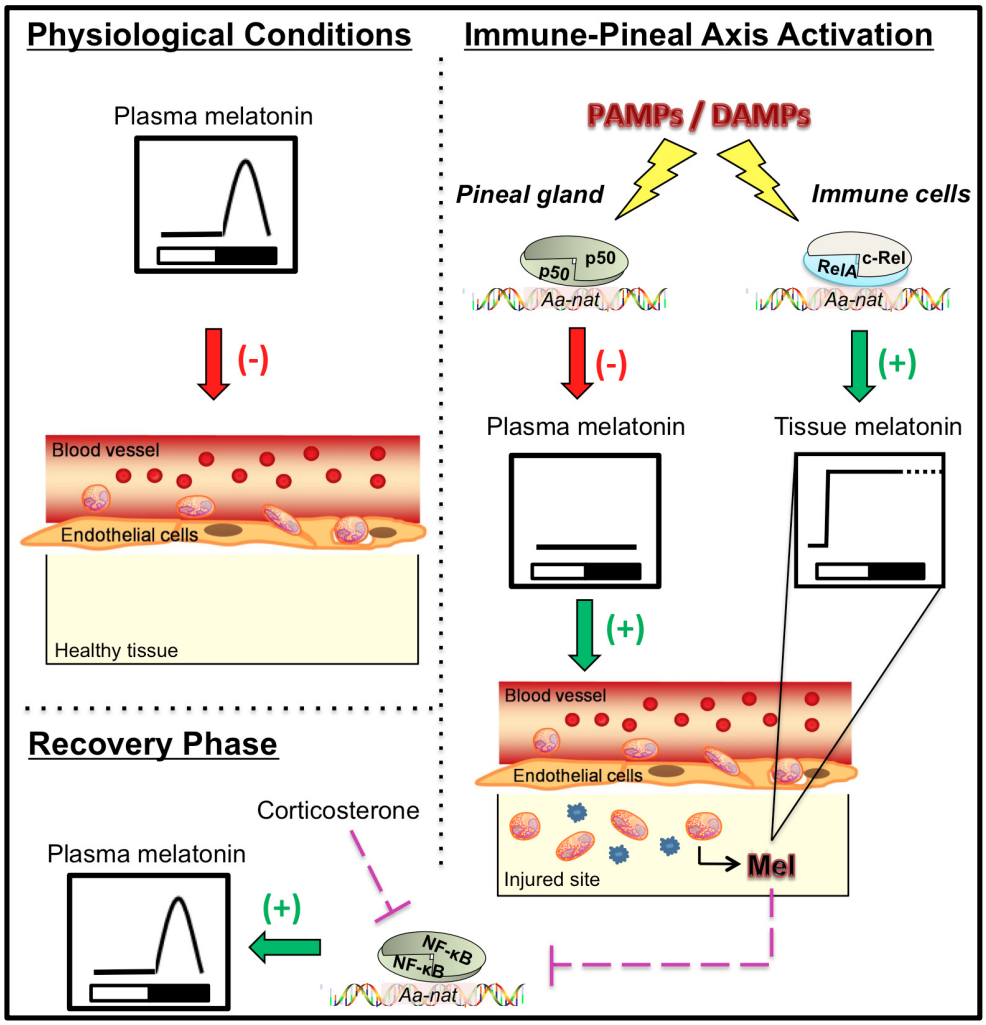

Figura 7 – Modulação do sistema melatonérgico por diferentes padrões moleculares associados PAMPs e DAMPs – participação da via de NF-κB.

Mecanismos de defesa associados à ativação de receptores de TLR4 regulam a resposta imune inata desde insetos até vertebrados (VILCEK & LE, 1994, AKIRA & TAKEDA, 2004; FAHEY et al., 2005; WIRA et al., 2005). Portanto, percebendo a importância da resposta ao estresse em anuros e conhecendo a ação inibitória do agente infeccioso LPS sobre a síntese de melatonina pela pineal de mamíferos, o objetivo do presente trabalho foi

investigar os efeitos da inflamação sistêmica induzida por LPS sobre os níveis circulantes de citocinas, corticosterona e melatonina (neste caso também foi avaliado o conteúdo ocular) em machos de *Rhinella icterica*. O perfil circadiano de secreção hormonal de corticosterona e melatonina plasmática também foram determinados de modo a caracterizar a produção destes hormônios em indivíduos saudáveis. Sendo assim, as hipóteses levantadas neste trabalho acerca dos efeitos da inflamação sistêmica induzida pelo agente LPS foram:

1 – o aumento dos níveis plasmáticos de citocinas pro-inflamatórias;

2 - a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal analisada através do aumento da produção de glicocorticoides pelas glândulas interrenais;

3 – a inibição da síntese de melatonina pela glândula pineal (mensuração no plasma) e também da melatonina ocular.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Determinar o efeito de uma inflamação sistêmica induzida por LPS sobre os mediadores inflamatórios: citocinas, corticosterona e melatonina em *Rhinella icterica* (Amphibia, Anura, Bufonidae; SPIX, 1824).

Plano de Trabalho:

1. Determinar o perfil temporal de liberação plasmática dos hormônios melatonina e corticosterona na espécie *Rhinella icterica;*
2. Determinar a produção de mediadores inflamatórios e hormonais na vigência de um processo inflamatório induzido pela administração de LPS. Serão determinados os níveis de citocinas, corticosterona e melatonina (plasmática e ocular) após o tratamento dos animais com LPS.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Indivíduos machos de *Rhinella icterica* foram capturados nas imediações do município de São Luiz do Paraitinga – São Paulo (23^0 13′ 32′′ S. 45^0 18′ 58′′ W). A saída para coleta, realizada em propriedade particular, ocorria por volta das 17:30 h. Após a autorização prévia do proprietário, iniciavam-se as buscas que prolongavam-se por aproximadamente 5 h. No decorrer do período de 21 a 25 de janeiro de 2015, foram capturados 40 espécimes, conforme solicitação ao IBAMA (licença: 29896). Estes foram mantidos em caixas de polipropileno, com água ad libitum, em total de oito animais por caixa para o transporte. Ao dar entrada na câmara climática, os animais foram identificados e mantidos individualmente em caixas de polipropileno com dimensões 16x26x18cm, dispostas em prateleiras de ferro, com água ad libitum oferecida em um pote plástico e abrigo confeccionado com cano de PVC. A inspeção dos recintos dos animais foi realizada três vezes por semana, a fim de verificar a presença de fezes, quantidade de água, bem como o estado físico dos anfíbios. Os recintos foram higienizados com detergente neutro e o oferecimento da alimentação, constituída por baratas, foi realizado uma vez por semana.

Estratégia Experimental:

Perfil temporal de variação diária dos hormônios melatonina e corticosterona

Os animais foram mantidos na câmara climática em ciclo claro/escuro (12:00/12:00 h) e temperatura (~20ºC) controlados. *Zeitgeber time* 0 (ZT 0) foi definido como o início do período de claro (acender das luzes) e ZT 12 o início do período de escuro (apagar das luzes). Os animais foram escolhidos aleatoriamente para a composição dos grupos onde o número de animais variou entre 3 e 5 espécimes. As amostras de sangue foram coletadas durante 24 h a intervalos regulares de 3 h. O material era obtido através de punção cardíaca com seringas de 1 mL e agulhas 26Gx1/2'' previamente heparinizadas. Foram consideradas somente as amostras de sangue coletadas dentro de 3 minutos após a manipulação do animal, pois é sabido que, após 3 minutos da captura, os níveis de corticosterona passam a ser influenciados pelo estresse da captura e manipulação, não havendo mais representatividade do nível hormonal basal (ROMERO & REED, 2005). As amostras de sangue foram identificadas e mantidas em gelo até serem transferidas para tubos eppendorf e submetidas à centrifugação para separação do plasma. Este foi dividido em duas alíquotas para as dosagens de melatonina e corticosterona para, em seguida, serem armazenadas em freezer a -80ºC e 20ºC, respectivamente.

Admnistração de Lipopolissacarídeo (LPS) de Escherichia coli

Os indivíduos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, assegurando que houvesse uma distribuição homogênea de massa corpórea individual entre eles. LPS (2 mg/Kg, *Escherichia coli*, Serotype 0127:B8, Sigma, St Louis, Mo) foi administrado via sacos linfáticos no período de escuro (ZT 15).

Amostras de sangue foram coletadas através de punção cardíaca após 2 h (ZT 17) e, a seguir, os animais foram eutanasiados por decaptação para remoção dos olhos, os quais foram armazenados em freezer -80ºC para a análise do conteúdo de melatonina.

Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos para pesquisa com animais, cujo protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais Vertebrados em Experimentação (CEA) do Instituto de Biociências, registrada com o nº 262/2016 (protocolo 16.1.395.41.0, anexo I).

Variáveis Medidas:

Citocinas

O conteúdo de citocinas foi determinado no plasma através do kit de alta sensibilidade denominado Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (RECYTMAG-65K11 MILLIPLEX MAP; GM-CSF, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, MCP1, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IFNϒ, TNF). As amostras foram eluídas com 60 µl de tampão fornecido no kit sob agitação por 30 min, e centrifugadas (10.000 rpm, 10 min). Esse kit permitiu a dosagem das seguintes citocinas: GM-CSF, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, MCP1, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IFNϒ, TNF. Os ensaios foram realizados numa placa de 96 poços que contém uma membrana de filtração na sua base, conforme instruções do fabricante. Resumidamente, microesferas revestidas com anticorpos monoclonais contra as onze citocinas analisadas foram adicionados aos poços da placa pré-umidecida. As amostras e padrões

foram pipetados e incubados por 2 h à temperatura ambiente (20ºC a 25ºC). Os poços foram lavados e uma mistura de anticorpos secundários biotinilados foi adicionada. Após a incubação por 1 hora, estreptavidina conjugada com a proteína fluorescente R-ficoeritrina (estreptavidina-PE) foi adicionada às esferas e incubado por 30 min. Após a lavagem para remoção dos reagentes não aderidos, foram adicionado aos poços e às microesferas uma solução tampão *sheath fluid* (Luminex®, MiraiBio, Alameda, CA) para serem analisadas no analisador de microesferas (Luminex 200™, HTS, FLEXMAP 3D™, Luminex®, MiraiBio, Alameda, CA), que analisou a quantidade de fluorescência emitida pelas microesferas associadas a R-21 ficoeritrina, relatada como a intensidade média de fluorescência.

O uso do sistema Luminex se justifica por sua capacidade de mensuração de várias citocinas numa mesma amostra de fluido. O Luminex é um sistema de citometria de fluxo que utiliza 2 raios laser: um vermelho, que excita corantes internos nas microsferas e possibilita a distinção entre diferentes tipos de microsferas, e um verde, que excita o corante fluorescente utilizado na etapa de detecção. Cada uma das microsferas é coberta com anticorpos monoclonais de captura para um antígeno específico. Teoricamente, os ensaios multianalíticos de microsferas oferecem vantagens em relação aos tradicionais métodos de detecção colorimétricos uma vez que vários analitos podem ser analisados de uma vez em cada amostra (VIGNALI, 2000). Quanto à sensibilidade, a leitura fluorescente do Luminex é mais direta, estável e sensível que a leitura colorimétrica do ELISA.

Corticosterona plasmática

O conteúdo de corticosterona foi determinado no plasma por Kit comercial (ELISA, Cayman Chemicals, cat no 500655) conforme as instruções do fabricante. As amostras foram ressuspensas em tampão de ensaio e 50 μL de calibradores e amostras (em duplicata) foram utilizados para a análise. A seguir, foram adicionados 50 μL de traçador e 50 μL de antissoro específicos para o hormônio e a placa incubada à temperatura ambiente em um agitador orbital por 2 h. Após cinco sucessivas lavagens com o tampão indicado, foram pipetados 200 μL de reagente Ellman, seguindo-se de incubação em um agitador orbital por 50 minutos. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro (Molecular Devices- Spectra Max 250) em comprimento de onda 412 nm.

Melatonina plasmática e ocular

O conteúdo de melatonina foi determinado no plasma através de Kit comercial (ELISA , IBL – RE54021) conforme as instruções do fabricante. Amostras de plasma foram extraídas através de coluna de extração de sílica (Waters Sep- Pak® Vac). Após a preparo da coluna, 500 μL do padrão, controle e amostras de plasma, juntamente com 500 μL de água ultrapura foram adicionados na coluna e centrifugados por 5 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de metanol 10% com centrifugação de 5 minutos por 2 vezes, seguido de adição de 1 mL de metanol 100% e posterior centrifugação durante 5 minutos. Após evaporação do metanol este extrato foi reconstituído com água

bidestilada estando pronto para ser utilizado o ensaio. Para tanto, 50 μL de cada extrato padrão, controle e amostras foram adicionados à placa na presença de 50 μL de melatonina biotina e 50 μL do antissoro de melatonina. Após incubação (18 h, 2 - 8º C) a placa foi lavada em tampão apropriado e acrescida de 200 μL de solução de substrato PNPP. Após incubação à temperatura ambiente por 40 minutos em agitador orbital, a reação foi finalizada com a adição de 50 μL de solução 'stop' PNPP. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 405 nm.

Para a análise do conteúdo ocular de melatonina, os olhos já dissecados e congelados em freezer -80^{0}C segundo protocolo de Wright e colaboradores (1999), foram homogeneizados em 700 μL de PBS. Este homogenato foi então centrifugado a 3000 rpm por 20 minutos a 4^{0}C e processado como descrito no parágrafo anterior.

Análise dos Dados

Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média (e.p.m.). A análise estatística entre dois grupos foi realizada por teste t Student e entre mais grupos pela análise de variância (ANOVA) com post test de Newman-Keuls, por meio do software GraphPad Prism® versão 5.00 (GraphPad Software©).

RESULTADOS

1. Níveis plasmáticos de corticosterona em *Rhinella icterica*

Os níveis plasmáticos de corticosterona foram inicialmente quantificados em animais mantidos em condições controladas de temperatura e iluminação claro-escuro (12/12 h) submetidos à punção cardiaca em dois horários: no período de claro em ZT 6 (6 horas após o acender das luzes) e no período de escuro em ZT 15 (3 horas após o apagar das luzes). O resultado desta análise demonstrou um aumento significativo de corticosterona no plasma de animais puncionados no período de escuro (ZT 6: 5,46 ± 1.25 ng/ml (n=3); ZT 15: 12,51 ± 0,79 ng/ml (n=3), $p < 0.05$).

Posteriormente, uma análise completa de amostras obtidas de animais submetidos à punção cardiaca a intervalos regulares de 3 h ao longo de 24 h evidenciou o padrão temporal de liberação deste hormônio marcador do período de atividade na espécie estudada (Figura 8). Com a entrada do período de iluminação (ZT 0), os valores obtidos de corticosterona plasmática permaneceram inalterados por até 6 h (ZT 6) quando então passaram a apresentar um aumento gradativo e valor máximo na transição claro/escuro (ZT 12). Durante o período de escuro, uma queda gradativa nos níveis plasmáticos de corticosterona foram observados até o final do período de escuro (ZT 24) quando os níveis de corticosterona não diferiram dos valores basais encontrados no início do período de claro (ZT 0 a ZT 6).

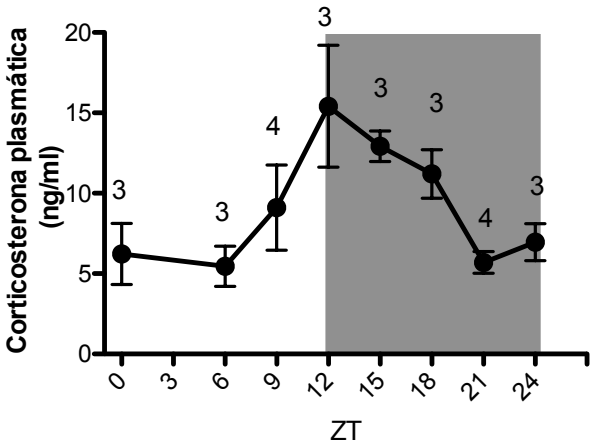

Figura 8 – Padrão temporal de variação plasmática de corticosterona em *Rhinella icterica*. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro 12/12 h e a coleta de sangue realizada a intervalos regulares de 3 h através de punção cardíaca. O conteúdo de corticosterona foi quantificado como descrito em Materiais e Métodos. Os dados representam a média ± epm do número de animais indicados em cada ponto.

2. Níveis plasmáticos de melatonina em *Rhinella icterica*

A análise de amostras de plasma de animais mantidos em condições controladas de temperatura e iluminação claro-escuro (12/12 h) coletadas por punção cardíaca a intervalos regulares de 3 h ao longo de 24 h revelou a existência de um ritmo circadiano de produção e liberação de melatonina (Figura 9). Os níveis de melatonina apresentaram-se baixo durante todo o período em que os animais estavam submetidos `a iluminação (ZT 0 a ZT 12) e no início do período de escuro (ZT 15). Seis horas após o apagar das luzes (ZT 18) um pico de produção de melatonina foi observado seguindo-se uma

diminuição gradativa, até o final do período de escuro (ZT 24), aos níveis basais de melatonina quantificados no período de claro (ZT 0 a ZT 12).

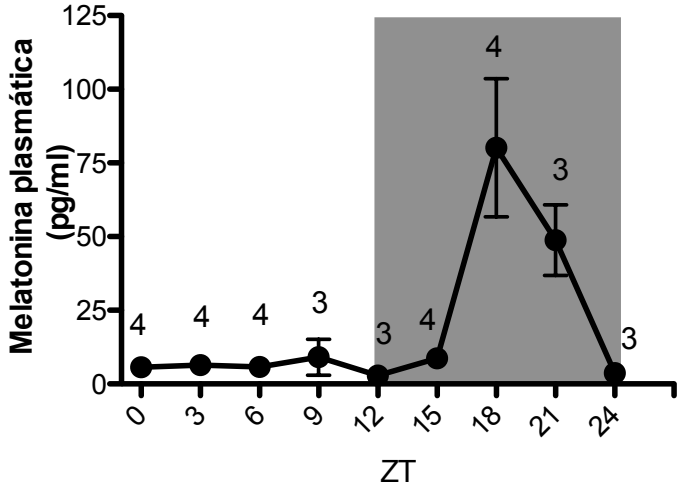

Figura 9 – Padrão temporal de variação plasmática de melatonina em *Rhinella icterica*. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro 12/12 h e a coleta de sangue realizada a intervalos regulares de 3 h através de punção cardíaca. O conteúdo de melatonina foi medido conforme descrito em Materiais e Métodos. Os dados representam a média ± epm do número de animais indicados em cada ponto.

3 - Efeito da inflamação sistêmica por LPS sobre a produção de citocinas em *Rhinella icterica*

A inflamação sistêmica induzida por LPS (2 mg/Kg, ZT 15, via sacos linfáticos) levou a um aumento da produção da citocina IL-1β (salina: 14,6 ± 6,3 pg/ml; LPS: 37,4 ± 1,2 pg/ml, n=3). As citocinas IL-10, IL-12p70, IL-17, IL-17A, IFNϒ e TNF não foram detectadas, enquanto que as demais citocinas não apresentaram alterações após o tratamento com LPS (Figura 10).

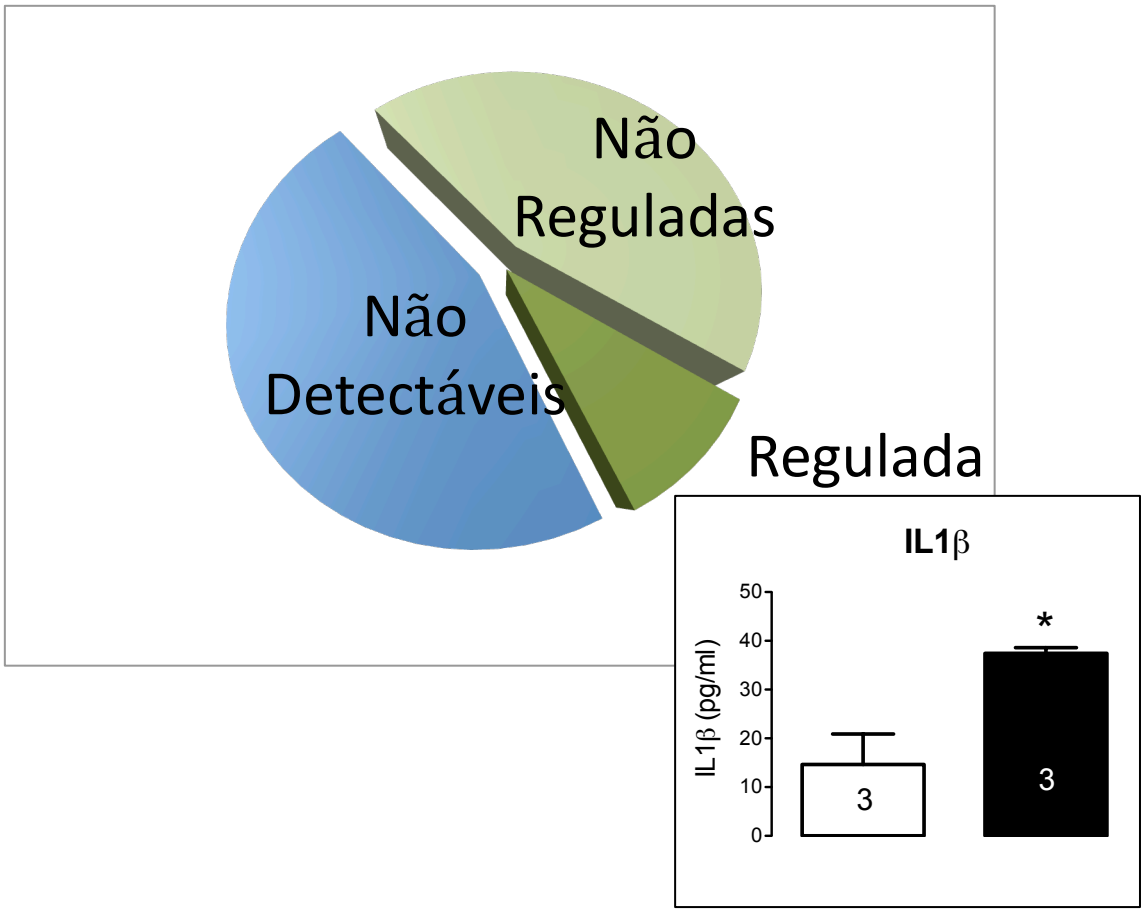

Figura 10 – Efeito da administração de LPS sobre a produção de citocinas. Os animais, mantidos em ciclo claro-escuro 12/12 h, foram administrados com LPS via sacos linfáticos (2mg/Kg, ZT 15) e sacrificados após 2 h. As citocinas foram analisadas conforme descrito em Materiais e Métodos. Os dados representam a média ± epm do número de animais indicados na figura. * $p < 0.01$ quando comparado à salina.

4. Efeito da inflamação por LPS sobre a produção de corticosterona em *Rhinella icterica*

A inflamação sistêmica induzida por LPS (2 mg/Kg, ZT 15, via sacos linfáticos) levou a um aumento significativo nos níveis de corticosterona mensurados no plasma de animais sacrificados 2 h após o insulto (Figura 11).

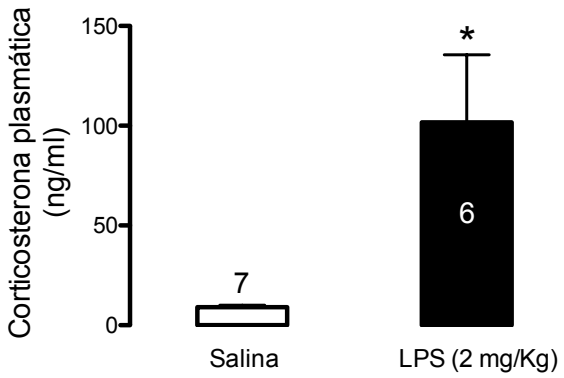

Figura 11 – Efeito do tratamento in vivo com LPS sobre a produção de corticosterona. Os animais, mantidos em ciclo claro-escuro 12/12 h, foram administrados com LPS via sacos linfáticos (2 mg/Kg, ZT 15) e sacrificados após 2 h. O conteúdo de corticosterona foi quantificado como descrito em Materiais e Métodos. Os dados representam a média ± epm do número de animais indicados na figura. * $p < 0.01$ quando comparado à salina.

5. Efeito da inflamação por LPS sobre a produção de melatonina plasmática e ocular em *Rhinella icterica*

A inflamação sistêmica induzida por LPS (2 mg/Kg, ZT 15, via sacos linfáticos) levou a uma diminuição significativa nos níveis de melatonina mensurados no plasma de animais sacrificados 2 h após o insulto (Figura 12A),

sendo o mesmo efeito observado sobre o conteúdo de melatonina ocular (Figura 12B). Nos grupos controle, administrados com salina, a quantificação do conteúdo de melatonina plasmática e ocular não diferrem entre si.

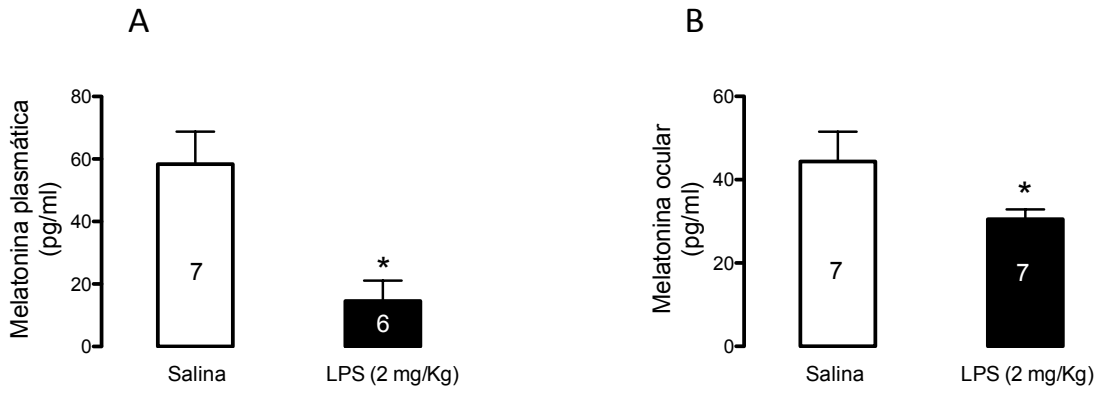

Figura 12 – Efeito do tratamento in vivo com LPS sobre a produção de melatonina plasmática (A) e ocular (B). Os animais, mantidos em ciclo claro-escuro 12/12 h, foram administrados com LPS via sacos linfáticos (2mg/Kg, ZT 15) e sacrificados após 2 h. O conteúdo de melatonina foi medido conforme descrito em Materiais e Métodos. Os dados representam a média ± epm do número de animais indicados na figura. * $p < 0.01$ quando comparado à salina.

.

DISCUSSÃO

Este trabalho, que teve por objetivo estudar em anuros da espécie *Rhinella icterica* a existência de uma comunicação bidirecional entre os sistemas imune e endócrino através das interações entre seus mediadores, demonstrou inicialmente o padrão temporal de variação plasmática dos hormônios corticosterona e melatonina, produzidos pelas glândulas interrenais e pineal respectivamente. A seguir, os dados obtidos permitiram evidenciar que uma inflamação sistêmica induzida por LPS leva a um aumento da liberação da citocina IL-1β, ativa o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal aumentando a produção de corticosterona pela glândula interrenal e inibe a síntese de melatonina pela glândula pineal bem como a produção ocular desta indoleamina.

Níveis basais de corticosterona apresentam variações diárias com pico de liberação antes ou durante a fase de atividade dos animais (BREUNER et al., 1999; JESSOP et al., 2002). Este pico de liberação de corticosterona é responsável pela regulação de diversos fenômenos fisiológicos e comportamentais consistentes com o despertar e o metabolismo associados ao periodo de atividade do ciclo sono-vigília (JESSOP et al., 2014). Os resultados obtidos neste trabalho vão ao encontro com a noturnalidade da espécie estudada, ja que a corticosterona plasmática encontra-se mais elevada justamente na transição claro-escuro, preparando estes animais para a entrada em atividade no período noturno.

Em relação à melatonina, os mecanismos que regulam a secreção rítmica circadiana de melatonina nos vertebrados são altamente sofisticados e envolvem fotorrecepção retiniana, transformação neuroeletroquímica, transmissão e transdução de um estímulo neural em um *output* químico (TAN et al., 2010).

Em todas as espécies investigadas até hoje, os níveis plasmaticos de melatonina são altos durante a noite e baixos durante o dia, provendo os organismos com esta consistente marcação dos períodos do dia e da noite. No nosso estudo com machos de *Rhinella icterica*, um típico aumento da melatonina plasmática no período da noite foi observado. Esse resultado corrobora com vários estudos feitos com diversas espécies de animais de hábito diurno ou noturno (JESSOP et al., 2002; 2014).

É interessante notar que, apesar da glândula pineal ter passado por alterações anatômicas e funcionais durante a evolução, o padrão noturno de produção de melatonina é mantido em todas as espécies de vertebrados estudadas, enfatizando a importância desta consistente indicação da duração dos períodos de claro e escuro para a regulação de vários processos fisiológicos. Alterações sazonais no ciclo de iluminação claro/escuro e temperatura refletem-se na amplitude e duração do pico noturno (ISORNA et al., 2006).

O aumento dos níveis de IL-1β no plasma dos animais experimentais corroboram a indução da resposta inflamatória por LPS em *Rhinella icterica*. LPS, importante indutor de respostas inflamatórias, é um agente eficiente na ativação de células através do receptor TLR-4, receptores inatos que

reconhecem PAMPs e estimulam a produção de citocinas pro-inflamatórias como TNF, IL-1β e IL-8, dentre outras (QIN et al., 2005). A interleucina IL-1β possui propriedades pró-inflamatórias potentes (TATAKIS, 1993), sendo uma glicoproteína de 17 KDa produzida majoritariamente por monócitos e macrófagos. No entanto, essa citocina também pode ser produzida por fibroblastos e células ósseas, sendo ainda induzida por microorganismos, produtos microbianos e agentes (HOROWITS, 1993; MATSUKI et al., 1991, 1992).

Considerando que a maioria das espécies de anfíbios e répteis responde a estressores elevando os níveis plasmáticos de corticosterona (GUILLETTE et al., 1995; LANCE, 1990; TYRRELL & CREE, 1998; MOORE & JESSOP, 2003), o aumento deste hormônio em resposta à admnistração de LPS estpa de acordo coma clássica resposta endócrina ao estresse inflamatório (SAPOLSKY, 2000).

Considerando que o efeito de corticosterona na presença de alta estimulação catecolaminérgica, observada em situações de grande estresse, leva a uma redução da síntese de melatonina (FERNANDES et al., 2017), os dados com este modelo de inflamação sistêmica induzido por LPS neste trabalho corroboram os efeitos sobre a ativação do eixo HPA com consequente aumento da produção de corticosterona e redução significativa da concentração plasmática de melatonina. Este foi portanto um fenômeno dependente da resposta inflamatória e atingiu também a maquinaria de síntese de melatonina ocular.

Em relação à melatonina ocular, WRIGHT e colaboradores (1999) validaram que girinos de *Rana catesbeiana*, ao receberem injeções de hidrocortisona, reagiram apresentando uma disposição a um efeito dual da resposta da melatonina ocular à injeção. Nesse estudo, os indivíduos apresentaram uma diminuição da melatonina ocular 6 h após a injeção, elevando a concentração local deste hormônio somente 15 h após o desafio a hidrocortisona.

É interessante também notar que o efeito da corticosterona sobre a síntese de melatonina ocular observado em *Rhinella icterica* neste estudo foi recentemente observado em nosso laboratório em anuros da espécie *Hypsiboas faber* após o tratamento com ACTH. Neste trabalho, avaliou-se os níveis plasmáticos de corticosterna e testosterona, e o conteúdo ocular de melatonina em amostras coletadas 1 h, 3 h e 6 h após o tratamento com ACTH. Esse desafio ocasionou um aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona 1 h após o tratamento. Contudo, após 6 h do apagar das luzes e aplicação das injeções, o grupo que recebeu a injeção de ACTH exibiu um aumento nos níveis de melatonina ocular quando comparado ao grupo que recebeu injeção de salina (BARSOTTI, 2017). Os autores também observaram que, concomitante ao aumento da melatonina ocular, houve uma diminuição da corticosterona plasmática para níveis próximos ao normal (BARSOTTI, 2017).

Em anuros se faz necessário destacar os achados encontrados em adultos da espécie *Rana perezi* onde o conteúdo de melatonina é maior na retina que na glândula pineal e o perfil plasmático de melatonina é o mesmo que na retina,

levando os autores a sugerirem que a melatonina ocular pode ser a principal fonte de melatonina circulante nesta espécie (DELGADO & VIVIEN-ROELS, 1989). Contudo, muitos órgãos possuem a capacidade de produzir melatonina dado os altos níveis que a contêm (HARDELAND, 2009), sendo plenamente estabelecido que o ritmo diário de melatonina plasmática é exclusivamente função de sua secreção pela pineal. Além do sangue, melatonina é detectável na câmara anterior dos olhos (YU et al., 1990), no liquor (SKINNER and MALPAUX, 1999), na bile (TAN et al., 1999), no fluido folicular ovariano (NAKAMURA et al., 2003), entre outros. Alem disso, esses fluidos apresentam concentrações maiores que no soro, sugerindo que a melatonina é concentrada contra um gradiente ou que a melatonina presente nesses fluidos não seja proveniente do sistema vascular sanguíneo.

Em nosso estudo, a quantificação do conteúdo de melatonina ocular em animais controle tratados com salina não foi maior que a quantificação de melatonina plasmática nestes mesmos animais.

Um dado interessante a se destacar é a demonstração de alterações no ritmo de secreção de melatonina junto à mudanças do estágio de vida. Foi verificada, através da medida dos níveis plasmático e ocular de melatonina, uma inversão do ritmo desta indolamina após a metamorfose (WRIGHT & BRUNI, 2004).

Sabe-se que a inflamação é essencial para a proteção do organismo contra invasores, tais como vírus, bactérias e parasitas, porém uma reação exacerbada pode gerar sérios danos a órgãos e tecidos. A melatonina, por sua vez,

aparentemente desempenha um hábil papel em balancear uma reação inflamatória normal de uma excessiva, além de reduzir a injúria causada em órgãos e tecidos por reações inflamatórias exageradas (TAN et al., 2010).

Vários estudos demonstram que, em roedores, a melatonina é frequentemente usada para suprimir as reações sistêmicas inflamatórias induzidas por LPS (CHEN et al., 2006; PERREAU et al., 2007), agindo basicamente na regulação da expressão gênica da enzima pró-inflamatória ciclo-oxigenase 2 (COX-2), além de reduzir os níveis de TNF e diminuir o conteúdo de óxido nítrico sintase (iNOS) (ESCAMES et al., 2003; MAYO et al., 2005). No nosso trabalho, a inflamação sistêmica induzida por LPS levou à estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal, elevando os níveis de corticosterona plasmática e descrescendo os níveis de melatonina plasmática.

Concomitante com a elevação da corticosterona, a melatonina declinou em resposta à injeção de LPS. Estudos do nosso grupo sugerem que a corticosterona pode ter uma ação direta sobre a glândula pineal, modulando a produção de melatonina (LOPES et al., 2001; FERNANDES, 2009). Em seu trabalho, FERNANDES e colaboradores (2017) demonstram que este hormônio exerce um efeito dual sobre a glândula pineal, podendo estimular ou inibir a produção de melatonina.

O efeito dual que a corticosterona exerce na sítense da melatonina se dá em decorrência da ativação do eixo HHA, responsável pela liberação dos peptídeos CRH e ACTH, sendo esses capazes de elevar a secreção de noradrenalina (SABBAN, et al., 2004; FERNANDES et al., 2017). Esse fato

estimula paralelamente os adrenoceptores α e β, que na presença de altos níveis de glicocorticoides, levam à redução na síntese de melatonina. Entretando, a corticosterona, potencia a produção do precursor N-acetilserotonina e da própria melatonina induzida por concentrações regulares de noradrenalina, que ativam somente adrenoceptores β (FERNANDES et al., 2017).

Deste modo, o perfil similar à rodeores (TAMURA et al., 2010) da produção de citocinas, corticosterona e melatonina observado em *Rhinella ictérica* frente um desafio inflamatório sistêmico, abre possibilidade de que novas abordagens sejam feitas no sentido de entender de forma mais ampla a importância das integrações imuno-endócrinas em diferentes grupos de vertebrados.

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho evidenciam em anuros da espécie *Rhinella icterica*:

1- O padrão temporal de produção e liberação dos hormônios corticosterona e melatonina, hormônios marcadores do período de atividade e escuro, respectivamente;

2- LPS é um importante indutor da resposta inflamatória levando a um aumento da liberação da citocina IL-1β;

3- A indução da inflamação sistêmica por LPS ativa o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal aumentando a produção de corticosterona pela glândula interrenal;

4- LPS atua como um PAMP e leva à inibição da síntese de melatonina plasmática e ocular.

Esses resultados sugerem existência de uma comunicação bidirecional entre os sistemas neuro-imuno-endócrino através das interações entre seus mediadores apontando, desta forma, para a existência do eixo imune-pineal ativo em anuros da espécie *Rhinella icterica*. Estímulos estressores como PAMPs/DAMPs modulam a atividade da glândula pineal ativando o eixo imune-pineal com conseguinte diminuição da síntese de melatonina e montagem da resposta inflamatória.

RESUMO

Vários estressores, incluindo poluição e patógenos, têm contribuído para o declínio/extinção da população de anfíbios levantando a questão da necessidade de ampliar o conhecimento dos aspectos da imunidade inata destes animais. Este trabalho teve por objetivo investigar os efeitos da inflamação sistêmica induzida por LPS na produção de mediadores que participam da montagem e resolução de respostas inflamatórias em anfíbios anuros. Adultos machos da espécie Rhinella icterica coletados em Janeiro de 2015 (São Luiz do Paraitinga, SP, Brazil (Licença do IBAMA: 29896) foram mantidos individualmente em caixas plásticas com circulação de ar, 22±2°C, LD 12:12h, água ad libitum e alimentados uma vez por semana com grilos e baratas. As variações diárias de CORT e MEL foram determinadas no plasma coletado durante 24 h por punção cardíaca. Para a indução de uma inflamação sistêmica, os animais foram injetados no saco linfático dorsal com solução salina ou LPS (de *Escherichia coli*, serotype 0127:B8; 2.0mg/Kg; ZT15) e eutanaziados após duas horas. O padrão temporal de liberação de CORT foi evidenciado pelos níveis aumentados no período de atividade dos animais, com pico de liberação na transição claro-escuro. O padrão temporal noturno de produção de MEL foi evidenciado atingindo um pico de liberação 6 h após a entrada do escuro. A inflamação sistêmica induzida por LPS levou a um aumento nos níveis da citocina IL-1β, ativação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal com aumento de 10x nos níveis de CORT e uma diminuição no conteúdo de MEL plasmática e

ocular. Desta forma, os dados apresentados evidenciam uma variação circadiana na produção dos hormônios CORT e MEL, ainda não demonstrados em *Rhinella icterica*, bem como a existência de um mecanismo regulatório bidirecional entre os sistemas imune e endócrino em anfíbios, apontando para a presença de um Eixo Imune-Pineal ativo no controle de processos patológicos em anfíbios tal como já demonstrado em mamíferos.

ABSTRACT

Several stressors, including pollution and pathogens, have contributed to the decline/extinction of the amphibian population raising the question of the need to increase knowledge of the aspects of the innate immunity of these animals. This work aimed to investigate the effects of systemic inflammation induced by LPS on the production of mediators that participate in the assembly and resolution of inflammatory responses in amphibians. Male adults of the specie Rhinella icterica collected in January 2015 (São Luiz do Paraitinga, SP, Brazil (IBAMA License: 29896) were individually kept in plastic boxes with air circulation, 22 ± 2 ° C, LD 12: 12h, water ad libitum and fed once a week with crickets and cockroaches.The daily variations of CORT and MEL were determined in plasma collected for 24 h by cardiac puncture.In order to induce a systemic inflammation, the animals were injected into the dorsal lymph sac with LPS (Escherichia coli, serotype 0127: B8, 2.0 mg/kg, ZT15) and euthanized after two hours. The temporal pattern of CORT release was evidenced by the increased levels in the period of activity of the animals, with a peak release at the transition light/dark cycle. The nocturnal temporal pattern of MEL production was evidenced reaching a peak of release 6 h after the dark entrance. LPS-induced systemic inflammation led to an increase in the cytokine IL-1β levels, activation of the hypothalamic-pituitary-interrenal axis with a 10x increase in CORT levels and a decrease in plasma and ocular MEL content. Thus, the data presented evidence a circadian variation in the production of

CORT and MEL hormones, not yet demonstrated in *Rhinella icterica*, as well as the existence of a bidirectional regulatory mechanism between the immune and endocrine systems in amphibians, pointing to the presence of an Immune-Pineal Axis active in the control of pathological processes in amphibians as already demonstrated in mammals.

REFERÊNCIAS

AKIRA, S.; TAKEDA, K.. Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**. v. 4, n. 7, p. 499-511. 2004.

AOYAMA, H.; MORI, N. & MORI, W. Anti-glucorticoid effects of melatonin on adult rats. **Acta Pathol. Jpn**. v. 37, p. 1143-1148. 1987.

ASHLEY, N.T.; WEIL, Z.M. & NELSON, R.J. Inflammation: mechanisms, costs and natural variation. **Annu Rev Ecol Evol Syst.** v. 43, p. 385-406. 2012.

ASSIS, V.R.; TITON, S.C.M; BARSOTTI, A.M.G.; TITON JR, B.; GOMES, F.R. Effects of Acute Restraint Stress, Prolonged Captivity Stress and Transdermal Corticosterone Application on Immunocompetence and Plasma Levels of Corticosterone on the Cururu Toad (*Rhinella icterica*). **PLoS One** 10 (4): e0121005. doi:10.137/joumal.pone.0121005. 2015.

BARSANO. C.P. & BAUMANN, G. Editorial: simple algebraic and graphic methods for the apportionment of hormone (and receptor) into bound and free hormone? **Endocrinology.** v. 124, p. 1101-1106. 1989.

BARSOTTI, A.M.G. Modulação dos níveis plasmáticos de corticosterona e imunocompetência em resposta ao tratamente exógeno com ACTH em *Hypsiboas faber*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, USP, 2014.

BARSOTTI, A.M.G.; ASSIS, V.R.; TITON, S.C.M.; TITON JR, B.; FERREIRAZ, Z.F.S. & GOMES, F.R. ACTH modulation on corticosterone, melatonin, testosterone and innate immune response in the tree frog *Hypsiboas faber*. **Comparative Biochemistry and Physiology.** v. 204(A), p. 177-184. 2017.

BENÍTEZ-KING, G.; HUERTO-DELGADILLO, L. & ANTÓN-TAY, F. Binding of 3H-melatonin to calmodulin. **Life Sci.** v.53, p.201-207, 1993.

BERGER, L.; SPEARE, R.; DASZAK, P.; GREEN, D.E.; CUNNINGHAM, A.A.; GOGGIN, C.L., SLOCOMBE, R.; RAGAN, M.A.; HYATT, A.D.;

McDONALD, K.R.; HINES, H.B., LIPS, K.R.; MARANTELLI, G. & PARKES, H. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rainforests of Australia and Central America. **Proc Natl Acad Sci.** v.95, p. 9031-9036. 1998.

BICEGO, K.C.; STEINER, A.A.; ANTUNES-RODRIGUES, J. & BRANCO, L.G.S. Indomethacin impairs LPS-induced behavioral ferver in toads. **J Appl Physiol.** v.93, p.512-516. 2002.

BICEGO-NAHAS, K.C.; STEINER, A.A.; CARNIO, E.C.; ANTUNES-RODRIGUES, J & BRANCO, L.G.S. Antipyretic effect of arginine vasotocin in toads. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.** v.278, p. R1408–R1414. 2000.

BRADFORD, D.F.; GRABER, D.M. & TABATABAI, F. Populations declines of the native frog, *Rana muscosa*, in Sequoia and Kings Canyon National Parks, California. **Southwestern Nat.** v.39, p. 323-327. 1994.

BRANCO, L.G.S. & MALVIN, G.M. Thermoregulatory effects of cyanide and azide in the toad, *Bufo marinus*. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol**. v.270, p. R169–R173. 1996.

BRANCO, L.G.S. & STEINER, A.A. Central thermoregulatory effects of lactate in the toad *Bufo paracnemis*. **Comp Biochem Physiol**. v.122A, p. 457–461. 1999.

CAIN, D.W. & CIDLOWSKI, J.A. Immune regulation by glucocorticoids. **Nat Rev Immunol.** v.17, p. 233-247, 2017.

CARR, J.A & NORRIS, D.O. Immunohistochemical localization of corticotropin-releasing factor- and arginine vasotocin-like immunoreactivities in the brain and pituitary of the American bullfrog (*Rana catesbeiana*) during development and metamorphosis. **Gen Comp Endocrinol**. v. 78, p. 180-188. 1990.

CARR, J.A & NORRIS, D.O. The hypothalamus-pituitary Axis. NORRIS, D.O. & CARR, J.A (Eds.). *"Endocrine Disruption: Biologic Bases for Health Effects in Wildlife and Humans"*. p. 58-86. Oxford University Press. 2005.

CARR, J.A. & ZOZZARO, P.E. The toad iris assay: a simple method for evaluating CRH action on the sympathetic nervous system. **Gen Com Endocrinol.** v. 135, p. 134-141. 2004.

CARVALHO-SOUSA C.E; DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S; TAMURA E.K; FERNANDES, P.A; PINATO, L.; MUXEL, S.M; CECON, E. & MARKUS, R.P. Molecular basis for defining the pineal gland and pinealocytes as targets for tumor necrosis factor. **Front Endocrinol** (Lausanne). v.2, p.10. 2011.

CAREY, C. Hypothesis concerning the cause f the disappearance of boreal toads from the mountains of Colorado. **Cons Biol.** v.7, p. 355-362. 1993.

CECON, E.; FERNANDES, P.A.; PINATO, L.; FERREIRA, Z.S. & MARKUS, R.P. Daily variation of constitutively activated nuclear factor kappa B (NF-kappaB) in rat pineal gland. **Chronobiol Int**. v.27, p.52-67, 2010.

CECON, E.; CHEN, M.; MARÇOLA, M.; FERNANDES, P.A; JOCKERS, R. & MARKUS, R.P. Amyloid peptide directly impairs pineal gland melatonin synthesis and melatonin receptor signaling through the ERK pathway. **FASEB J**. v.29, p. 2566-82. 2015.

CHEN, H.Y.; CHEN, T.Y.; LEE, M.Y.; CHEN, S.T.; HSU, Y.S.; KUO, Y.L.; ... & LEE, E.J. Melatonin decreases neurovascular oxidative/nitrosative damage and protects against early increases in the blood-brain barrier permeability after transient focal cerebral ischemia in mice. **Journal of Pineal Research.** v. 41(2), p. 175-182. 2006.

CONDEZ, T. H, SAWAYA, R.J. & DIXO, M. Herpetofauna of the Atlantic Forest remmants of Tapiraí and Piedade region, São Paulo, southeastern Brazil. **Biota Neotrop**. v.9(1). 2009.

CUNNINGHAM, A.A.; LANGTON, T.E.S.; BENNET, P.M.; LEWIN, J.F.; DRURY, S.E.N.; GOUGH, R.E. & MACGREGOR, S.K. Pathological and microbiological findings form incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*). **Phil Trans R Soc Lond B.** v. 351, p. 1539-1557. 1996.

DELGADO, M.J. & VIVIEN-ROELS, B. Effect of environmental temperature and photoperiod on the melatonin levels in the pineal, lateral eye, and plasma of the frog, *Rana perezi*: importance of ocular melatonin. **Gen. Comp. Endocrinol**. v.75, p.46–53. 1989.

DHABHAR, F.S. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: Implications for immunoprotection ande immunopathology. **Neuroimmunomodul.** v16, p.300-317. 2009.

DUBOCOVICH, M.L. & MARKOWSKA, M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. **Endocrine**. v.27(2), p.101-10. 2005.

ESCAMES, G., LEÓN, J., MACÍAS, M., KHALDY, H. & ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. **FASEB Journal** v.17, p. 932-934. 2003.

FAHEY, J.V; SCHAEFER, T.M; CHANNON, J.Y & WIRA, C.R. Secretion of cytokines and chemokines by polarized human epithelial cells from the female reproductive tract. **Hum Reprod**. v. 20. p. 1439-1446. 2005.

FERNANDES, P.A.C.M. Regulação da produção hormonal da glândula pineal de ratos por moduladores do processo inflamatório. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, USP, 2009.

FERNANDES, P.A.; CECON, E.; MARKUS, R.P. & FERREIRA, Z.S. Effect of TNF-alpha on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a "feedback" of the immune response on circadian timing. **J Pineal Res**. v.41, p. 344-350. 2006.

FERNANDES, P.A.; BOTHOREL, B.; CLESSE, D.; MONTEIRO, A.W.; CALGARI, C.; RAISON, S.; SIMONNEAUX, V. & MARKUS, R.P. Local corticosterone infusion enhances nocturnal pineal melatonin production in vivo. **J Neuroendocrinol**. v. 21, p. 90-97. 2009.

FERREIRA, Z.S.; FERNANDES, P.A.C.M.; DUMA, D.; ASSREUY, J.; AVELLAR, M.C.W. & MARKUS, R.P. Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappaB. **J Pineal Res**. v.38, p.182-88. 2005.

FONG, T. M.; SCHIOTH, H.; GANTZ, I.; CONE, R. D.; FAROOQI, S.; HASKELL-LUEVANO, C.; HRUBY, V. J.; MOUNTJOY, K. G.; TATRO, J. B.; WISKBERG, J. E. S.. Melanocortin receptors: MC2 receptor. Last modified on 16/06/2015. Accessed on 30/08/2017. IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY. http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/ObjectDisplayForward?objectId=283

FROST, D. R. 2017. Amphibian Species of the World: an online reference. Version 6 (28/08/2017). Electronic Database accessible at http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html. American Museum of Natural History, New York, USA.

GARCIA-MAURIÑO, S.; GONZALEZ-HABA, M.G.; CALVO, J.R.; RAFII-EL-IDRISSI, M.; SANCHEZ-MARGALET, V.; GOBERNA, R. & GUERREIRO, J.M. 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**. v.159, p.574-81. 1997.

GOMES, F.R.; OLIVEIRA, R.V.; ASSIS, V.R; TITON JR, B.; MORETTI, E.H. & MENDONÇA, M.T. Interespecific variation in innate immune defenses and stress response of toads from Botucatu (São, Paulo, Brazil). **South Amer J Herpet.** v.7, p.1-8. 2012.

GUILLETTE, L.; CREE, A; ROONEY, A. Biology of stress: interactions with reproduction, immunology and intermediary metabolism. In: Warwick, C.; Frye, F; Murphy, J. (Eds.) *Health and welfare of captive reptiles*. **Chapman and Hall**, London. p. 32-81. 1995.

HOROWITZ, M.C. Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. **Science.** v. 260, p. 626-627. 1993.

ISORNA, E.; BESSEAU, L.; BOEUF, G.; DESDEVISES, Y.; VUILLEUMIER, R.; ALONSO-GÓMEZ, A.L.; DELGADO, M.J. & FALCÓN, J. Retinal, pineal and diencephalic expression of frog arylalkylamine N-acetyltransferase-1. **Mol Cell Endocrinol**. v.252 (1-2), p.11-8. 2006.

JESSOP, T.S; COLIN, J.L; WHITTIER, J.M. Nocturnal activity in the green sea turtle alters daily profiles of melatonin and corticosterone. **Horm Behav**. v.41, p. 357-365. 2002.

JESSOP, T.S.; DEMPSTER, T.; LETNIC, M. & WEBB, J.K. Interplay among nocturnal activity, melatonin, corticosterone and performance in the invasive cane toad (*Rhinella marinus*). **Gen Comp Endocrinol**. v. 206, p. 43-50. 2014.

JOCKERS R, DELAGRANGE P, DUBOCOVICH ML, MARKUS RP, RENAULT N, TOSINI G, CECON E, ZLOTOS DP. Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20. **Br J Pharmacol**. v.173, p. 2702-25. 2016.

KLUGER, M.J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiol Rev.** v.71, p. 93–127. 1991.

LANCE, V. A; Stress in reptiles. In: Epple, A.; Scanes, C.G.; Stetson, M.H. (Eds.) *Prospects in Comparative Endocrinology*, **Wiley-Liss**, New York. p. 461-466. 1990.

LLEWLLYN, D.; BROWN, G.P.; THOMPSON, M.B. & SHINE, R. Behavioral responses to immune-system activation in an anuran (the cane toad, *Bufo marinus*) field and laboratory studies. **Physiol Biochem Zoo.** v. 84, p. 77-86. 2012.

LOPES, C.; MARIANO, M. & MARKUS, R.P. Interaccion between the adrenal ande the pineal gland in chronic experimental inflammation induced by BCG in mice. **Inflamm Res**. v.50, p. 6-11. 2001.

MACIEL, N.M.; COLLEVATTI, R.G.; COLLI, G.R. & SCHWARTZ, E.F. Late Miocene diversification and phylogenetic relationships of the huge toads in the *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) species group (Anura: Bufonidae). **Mol Phylogenet Evol.** v. 57, p. 787-797. DOI 10.1016/J.YMPEV.2010.08.025 PMID 20813190. 2010.

MARKUS, R.P. & CECON, E. O tempo biológico e a defesa do organismo: uma conversa bidirecional entre a glâdula pineal e o sistema imunológico. **Ciência e Cultura.** v.61(1), p.52-55. 2013.

MARKUS, R.P.; FERREIRA, Z.S.; FERNANDES, P.A. & CECON, E. The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. **Neuroimmunomodulation**. v. 14, p. 126-133. 2007.

MASUDA, T.; IIGO, M.; MIZUSAWA, K.; NARUSE, M.; OISHI, T.; AIDA, K. & TABATA, M. Variations in plasma melatonin levels of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under various light and temperature conditions. **Zool. Sci**. v.20, p.1011–1016. 2003.

MATSUKI, Y.; YAMAMOTO, T. & HARA, K. Interleukin-1 mRNA-expressing macrophages in human chronically inflamed gingival tissues. **Am J Pathol.** v. 138, p. 1299-1305. 1991.

MATSUKI, Y.; YAMAMOTO, T. & HARA, K. Detection of inflammatory cytokine messenger RNS (mRNA) – expressing cells in human inflamed gingiva by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. **Immunology.** v. 76, p. 42-47. 1992.

MAYO, J.C, SAINZ, R.M, TAN, D.X, HARDELAND, R., LEÓN, J., RODRIGUEZ, C. &REITER, R.J. Anti-inflamatory actions of melatonin and its metabolities, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and

N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK) in macrophages. **J. Neuroimmunology**. v. 165, p.139-149. 2005.

McCORMICK, G.L. & LANGKILDE, T. Immune responses of eastern fence lizards (*Sceloporus undulatus*) to repeated acute elevation of Corticosterone. **Gen Comp Endocrionol**. v.204, p. 135-140, DOI 10.1016/j.ygcen.2014.04.037 PMID 24852352. 2014.

MENAKER, M. Eyes – the second (and third) pineal glands? **Ciba Foundation Symposium** v. 117, p. 78-92. 1985.

MOORE, I.T. & JESSOP, T.S. Stress, reproduction and adrecortical modulation in amphibians and reptiles. **Horm Beh**. v.43, p. 39-47. 2003.

MORETTI, E.H. Relação entre preferência termal, taxa metabólica e desafio imunológico por lipopolissacarídeo de bactéria gram-negativa (LPS) em Rhinella icterica (Anura: Bufonidae). Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, USP, 2016.

MUCHLINSKI, A.E. The enrgetic cost of the fever response in three species of ectothermic vertebrates. **Comp Biochem Physiol A Comp Physiol.** v. 81, p. 577-579. 1985.

NORRIS, D.O. Comparative aspects of vertebrate reproduction. In: Norris, D.O. (Ed.), *Vertebrate Endocrinology*, **4ª Ed Elsevier**, p. 371-426. 2007.

PANDI-PERUMAL, S.R.; TRAKHT, I.; SRINIVASAN, V.; SPENCE, D.W.; MAESTRONI, G.J.; ZISAPEL, N. & CARDINALI, D.P. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. **Prog Neurobiol**. v.85(3), p. 335-53. 2008.

PERREAU, V.M; BONDY, S.C; COTMAN, C.W; SHARMAN, K.G & SHARMAN, E.H. Melatonin treatment in old mice enables a more youthful response to LPS in the brain. **J of Neuroimmunology** v. 182, p. 22-31, 2007.

PETRILLI, C.L. Regulação da atividade da glândula pineal por estimulação purinérgica. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, USP, 2012.

QIN, H.; WILSON, C.A; LEE, S.J; ZHAO, X & BENVENISTE, E.N. LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF-kappaB and STAT-1alpha in macrophages and microglia. **Blood** v. 106(9), p. 3114-3122. 2005.

REGUERA, E. Regulación de las variaciones estacionales en la sensibilidad testicular a la acción de los glucorticoides en *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). Interrrelación testículo-interrenal. Tese de Doutorado, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, 2012.

REITER, R.J., TAN, D.X., FUENTES-BROTO, L. Melatonin: a multitasking molecule. **Prog. Brain Res.** v. 181, p.127–51. 2010.

ROMERO, L.M & REED, J.M. Collecting baseline corticosterone samples in the field: is under 3 min good enough? **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**. v. 140, p.73-9. 2005.

SABBAN, E.L.; NAKOVA, B.B.; SEROVA, L.I.; KVETNANSKY, R. & LIU, X. Molecular regulation of gene expression of catecholamine biosynthetic enzymes by stress: sympathetic ganglia versus adrenal medulla. **Ann N Y Acad Sci.** v. 1018(1), p. 370-377. 2004.

SAPOLSKY, R. M. Stress, the aging brain and the mechanisms of neuron death. Cambridge, MA: **MIT Press**. 1992.

SAPOLSKY, R.M.; ROMERO, L.M. & MUCK, A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrinol. Rev**. v21, p. 55-89. 2000.

SHERMAN, E. & STEPHENS, A. Fever and metabolic rate in the toad *Bufo marinus*. **J Therm Biol.** v. 23, p. 49-52. 1998.

da SILVEIRA CRUZ-MACHADO S, CARVALHO-SOUSA CE, TAMURA EK, PINATO L, CECON E, FERNANDES PA, DE AVELLAR MC, FERREIRA ZS, MARKUS RP. TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFKB pathway. **J Pineal Res**. v.49, p. 183-92. 2010.

SOUZA-TEODORO, L. Caracterização do receptor P2X7 na fisiologia e na fisiopatologia da glândula pineal de ratos. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, USP, 2013.

TAN, D.X.; MANCHESTER, L.C.; TERRON, M.P.; FLORES, L.J. & REITER, R.J. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? **J Pineal Res**. v.42, p.28-42. 2007.

TAN, D.X; HARDELAND, R.; MANCHESTER, L.C; PAREDES, S.D; KORKMAZ, A.; SAINZ, R.R; MAYO, J.C; FUENTES-BROTO, L. & REITER, R.J. The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. **Biol.Rev**. v. 85, p. 607-623. 2010.

TATAKIS, D.N. Interleukin-1 and bone metabolism: a review. **J Periodontol.** v. 64, p. 416-431. 1993.

TAYLOR, S.K.; WILLIAMS, E.S.; THORNE, E.T.; MILLS, K.W. & WITHERS, D.I. Causes of mortality of the Wyoming toad (*Bufo baxteri*). **J Wildlife Diseases.** v.35, p.49-57. 1999.

TSAI, S.Y. & MCNULTY, J.A. Interleukin-1beta expression in the pineal gland of the rat. **J Pineal Res**. v.27, p. 42-48. 1999.

TSAI, S.Y; SCHLUNS, K.S; LE, P.T & MCNULTY, J.A. TGF-beta1 and IL-6 expression in rat pineal gland is regulated by norepinephrine and interleukin-1beta. **Histol Histopathol**. v. 16, p. 1135-1141. 2001a.

TSAI, S.Y.; O'BRIEN, T.E. & MCNULTY, J.A. Microglia play a role in mediating the effects of citokines on the structure and function of the rat pineal gland. **Cell Tissue Res**. v. 303, p.423-431. 2001b.

TYRELL, C.L. & CREE, A. Relationship between corticosterone concentration and season, time of day and confinement in a wild reptile (tuatara, *Sphenodon punctatus*). **Gen Comp Endocrinol**. v.110, p. 97-108. 1998.

VAUGHN, L.K.; BERNHEIM, H.A. & KLUGER, M.J. Fever in the lizard *Dipsosaurus dorsalis*. **Nature** v.252, p. 474–475. 1974.

VIGNALI, D.A. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. **J Immunol Methods.** v. 243, p. 243-255. 2000.

VILCEK, J. & LE, J. Immunology of cytokines: an introduction. In: Thomson, A. (Ed.). *The Cytokine Handbook*. **Academy Press London**. p. 1-19. 1994.

VITT, L.J & CALDWELL, J.P. Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles. 3ª edição. **Academic Press**. Burlington Massachusetts, EUA. 2009.

YUWILER, A. Effects of steroids on serotonin-N-acetyltransferase activity of pineals in organ culture. **J Neurochem**. v.52, p. 46-53. 1989.

WIEGERS, G.J.; CROISET, G.; REUL, J.M.H.M.; HOLSBOER, F. & DE KLOET, E.R. Differential effects of corticosteroids on rat peripheral blood T-lymphocyte mitogenesis in vivo and in vitro. Am J Physiol v.265, p. E825-E830. PMID 8279536. 1993.

WIEGERS, G.J.; LABEUR, M.S.; STEC, I.E.M.; KLINKERT, W.E.F.; HOLSBOER, F. & REUL, M.H.M. Glucocorticoids accelerate anti-T cell receptor-inducetT cell growth. J Immunol. v. 155, p.1893-1902. PMID 7636240. 1995.

WIEGERS, G.J. & REUL, J.M.H.M. Induction of cytokine receptors by glucocorticoids: functional and pathological significance. **Trends Pharmacol. Sci.** v.19, p. 317–321. 1998.

WINGFIELD, J.C; HUNT, K.; BREUNER, C.; DUNLOP, K.; FOWLER, G.S; FREED, L. & LEPSON, J. Environmental stress, field endocrinology, and conservation biology. In: *Behavioral approaches to conservation in the wild*: p. 95–131. **Clemmons, J. R. & Buchholz, R. (Eds.)**. Cambridge: Cambridge University Press. 1997.

WINGFIELD, J.C & ROMERO, L.M. Adrenocortical responses to stress and their modulation in free-living vertebrates. **Comprehensive Physiology**. p. 211-234. 2001.

WIRA, CR.R; GRANT-TSCHUDY, K.S & CRANE-GODREAU, M.A. Epithelial cells in the female reproductive tract: a central role as sentinels of immune protection. **Am J Reprod Immunol**. v.53, p. 65-76. 2005.

WITHYACHUMNARNKUL, B.; NONAKA, K.O; ATTIA, A.M & REITER, R.J. Changes in indole metabolism in organ cultured rat pineal glands induced by interferon-gamma. **J Pineal Res**. v.8, p. 313-322. 1990.

WITHYACHUMNARNKUL, B.; REITER, R.J.; LERCHL, A.; NONAKA, K.O & STOKKAN, K.A. Evidence that interferon-gamma alters pineal metabolism both indirectly via sympathetic nerves and directly on the pinealocytes. **Int. J. Biochem**. v. 23, p. 1397-1401. 1991.

WRIGHT, M.L. & BRUNI, N.K. Influence of the photocycle and termocycle on rhythms of the plasma thyroxine and plasma and ocular melatonin in late metamorphic stages of the bullfrog tadpole, *Rana castesbeiana*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.139(A), p.33-40. 2004.

WRIGHT, M.L.; RZASA, B.A.; WEIR, R.J.; BABSKI, A.M. Influence of cortisol on the larval bullfrog thyroid axis in vitro and in vivo and on plasma and ocular melatonin. **Gen Comp Endocrinol**. v. 116, p. 249-60. 1999.

SÚMULA CURRICULAR

Nome: Priscilla Rachel Oliveira Bastos

Data de nascimento: 17/08/1986

Local de nascimento: Fortaleza – CE, Brasil

Endereço eletrônico: srta_priscillabastos@hotmail.com

Formação Acadêmica/Titulação

2014 – : Mestrado em Fisiologia.

Instituição: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.

Título da dissertação: Inflamação sistêmica induzida por LPS em *Rhinella icterica*: corticosterona, melatonina e citocinas

Orientação: Profa. Drª Zulma F. S. Ferreira.

Bolsa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, vigência: 02/2014 – 08/2016).

2004 – 2009: Licenciatura em Biologia.

Instituição: UVA – Universidade Estadual Vale do Acaraú

Título da iniciação a docência: Proposta educativa do Laboratório Virtual de Anantomia – CCS/UVA sobre anatomia básica do sistema reprodutor e prevenção de gravidez precoce e doenças sexualmente transmissíveis para alunas do 2º ano do Colégio Dom José Tupinambá da Frota no município de Sobral – CE.

Orientação: Profª. Danielle Félix Arruda

Publicação

GUERRA-FUENTES, RICARDO ARTURO; ROSCITO, JULIANA G.; NUNES, PEDRO M. SALES; **OLIVEIRA-BASTOS, PRISCILLA RACHEL** ; ANTONIAZZI, MARTA MARIA; CARLOS, JARED; RODRIGUES, MIGUEL TREFAUT . Through the Looking Glass: The Spectacle in Gymnophthalmid Lizards. The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology, 297: 496-504, 2014. DOI: 10.1002/ar.22861. Special Issue: New Advances In Morphology and Evolution of Living and Extinct Squamates

1.1) Participação em Eventos

- 17ª Semana Temática da Biologia, Instituto de Biociências - USP. Participação no minicurso "Drogas de abuso: conceitos, padrões de uso, tipos de drogas, epidemiologia e políticas", com carga horária de 12h/a.

  Apresentação, sob a forma de painel, o trabalho: *"Through the looking glass: the spetacle in gymnophthalmid lizards"*. 06 a 10 de Outubro de 2014;

- Simpósio *"Diversidade, Sistemática e Biogeografia de Anfíbios e Répteis Brasileiros"*, promovido pela Sociedade Brasileira de Herpetologia em parceria com o Instituto Butantan, São Paulo. 13 - 14 de Dezembro de 2014;

- *V Brazilian Purine Club Meeting – II Internacional Congress of Purinergic Signalling in South America*, em Maresias, São Paulo, Brasil. 30 de Maio - 02 de Junho de 2015.

Resumos Apresentados em Anais de Eventos Nacionais

OLIVEIRA-BASTOS, P.R.; DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.; MARKUS, R.P.; GOMES, F.R. & FERREIRA, Z.S. CORTICOSTERONE AND MELATONIN CROSSTALK IN CROTROLLING INFLAMATORY PROCESS IN TOADS (*Rhinella icterica*). In: 49º Congresso Brasileiro de Farmacologia Terapêutica – SBFTE, 2017, Ribeirão Preto – SP.

Outras Atividades Acadêmicas Relevantes

Atividades Didáticas

2014: Estágio supervisionado realizado dentro do Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino (PAE), referente a atividades didáticas junto à disciplina BIF0214 - Fisiologia animal: controle interno e reprodução, ministrada no curso de graduação em Ciências Biológicas da USP, com supervisão do Profª. Drª. Débora Fior Chadi.

ANEXOS