Marco Antonio Pires Camilo Lapa

Vias de transdução envolvidas na síntese de melatonina por fagócitos do colostro humano

São Paulo

2010

Àqueles que fizeram de mim não apenas o que sou,

mas aquilo que pretendo me tornar...

À minha querida família e amigos.

BUSHIDO

"Não tenho Pais, Faço do Céu e da Terra meus Pais.

Não tenho Lar, Faço do Saika Tandem meu Lar.

Não tenho Poder Divino, Faço da Honestidade meu Poder.

Não tenho condutas, Faço da Humildade minha maneira de relacionamento.

Não tenho Poder Mágico, Faço da minha Personalidade minha magia.

Não tenho vida nem morte, Faço da eternidade a minha vida e a minha morte.

Não tenho Corpo, Faço da Coragem meu corpo.

Não tenho Olhos, Faço do Relâmpago meus olhos.

Não tenho Ouvidos, Faço da sensibilidade meus ouvidos.

Não tenho Membros, Faço da vivacidade meus membros.

Não tenho Leis, Faço da auto proteção minha lei.

Não tenho Projetos, Faço da Oportunidade meus planos.

Não tenho estratégia, Faço da Liberdade de matar e de ressuscitar minha estratégia.

Não sou um Prodígio, Faço do Respeito à verdadeira Doutrina meu milagre.

Não tenho Dogmas Rígidos, Faço da Adaptabilidade a todas as coisas o meu Princípio.

Não tenho Forma, Faço da Astúcia minha forma.

Não tenho Milagres, Faço da Justiça meus milagres.

Não tenho Tática, Faço da rapidez minha tática.

Não tenho amigos, Faço da Mente meu amigo.

Não tenho Inimigo, Faço da Imprudência meu inimigo.

Não tenho Armadura, Faço da minha sinceridade e retidão minha armadura.

Não tenho castelo fortificado para me defender, Faço da minha sabedoria meu castelo.

Não tenho espada, faço da minha calma e silêncio espiritual minha espada".

Antigo poema japonês de autor desconhecido

"Assim são os caminhos do mundo...
onde o poder e a riqueza não trazem um único sorriso...
a felicidade se encerra no suave toque de uma Brisa..."

Autor desconhecido

"Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes."

Sir Isaac Newton

"E cada homem é um livro onde o próprio Deus escreve."

Victor Hugo

AGRADECIMENTOS

"Sem passarinhos que cantem,
a montanha fica ainda mais silenciosa"

Provérbio Zen Budista

Agradecer não é difícil, o difícil é ser justo nos agradecimentos...

Começarei pelo óbvio, agradecendo minha família, aqueles que me deram suporte em todos os aspectos possíveis ao longo do caminho que trilhei. Minha mãe querida, Profª Iara Aparecida Pires, que sempre me deu amor incondicional e compartilhou comigo sua sabedoria, encorajou-me para fazer o que fiz, e me deu o gosto pelo conhecimento. Minha avó materna, vovó Quinha, que fez parte da minha criação e me mostrou a gentileza e o zelo como nenhum outro ser humano. Minha irmãzinha Virgínia, que sempre acreditou que eu era alguma espécie de herói (coitadinha...), e isso me fez desejar que ela sempre se orgulhasse de mim, me conduzindo por um caminho onde procurei sempre ter honra. Minha tia e madrinha Jussara, que além de dezenas de conversas esclarecedoras me deu um suporte inestimável. Agradeço também meu primo, que é na verdade um irmão, André Gustavo, por ser aquele que segurei nos braços quando pequeno, e que eu vi crescer e tornar-se meu amigo, e que cuida dos meus tesouros em minha ausência.

Agradeço meu pai Antônio Carlos, pelos exemplos que ele foi, e por ter me ensinado, na marra, a nunca recuar de uma briga.

Agradeço agora a toda minha família, em especial aos meus tios Alberto e Josana, e seus filhos Gregório, Mariana e Luísa, pois todos são muito especiais e me ajudaram muitíssimo, principalmente sendo companhia inestimável e extremamente alegre nestes últimos anos.

Muito obrigado a todos e que Deus os abençoe sempre.

Gostaria de agradecer também aos meus amigos, que nesse caso, e para minha absoluta sorte, foram e são muitos! Citarei estes irmãos em ordem cronológica apenas para facilitar esta exposição.

Começarei pelos irmãos queridos de São Lourenço: Lucas e Diogo Bacha (irmãos que se tornaram meus irmãos também); João Felipe "Lamen" Flori (pelas conversas e disputas infindáveis); Júlio César "Julin da Farma"; ao senhor Paulo Nogueira ("*in memoriam*"); Gustavo e Matheus Geraldino; Diogo "Scop"; e Rafael Mendes (grande irmão). Vocês são parte do que sou hoje, e mesmo a distância não diminui nossa amizade.

Quero agradecer também aos amigos inestimáveis que fiz durante a faculdade, período onde estive longe de minha família por muito tempo, e eles foram grandes companheiros: Marcos Freires Farias (foi um "grilo falante" por diversas vezes); Ramira Yuri Ribeiro (gosto tanto que carrego para onde vou); Rodrigo "Abacate"; Rodrigo "Bombado" Bamtim; Luís Antônio Pereira Motonio; Thiago "Evoluído", Gustavo "Zagaia"; Juliana "Jú"; Daniel "Magrelo" e José Alfredo Ramos Valverde. Amigos queridos, obrigado por tudo.

Entre os amigos, estes, são hoje, aqueles com o qual tenho mais contato, e que são grandes amigos além de colegas de trabalho. A equipe do laboratório de Cronofarmacologia (alguns presentes, outros já seguiram seus caminhos para outras paragens), que atua exatamente assim, como uma equipe. Agradeço: Alex, Ariana, Camila, Cláudia, Cecília, Daiane, Débora, Érika, Kelly, Mara, Marina, Pedroca, Renato e San.

Um agradecimento especial ao Eduardo Koji Tamura, amigo prestativo desde que pisei no departamento de fisiologia, agradeço pelas conversas em momentos difíceis, em momentos alegres, pelas conversas científicas e por aquelas jogadas fora. Obrigado pelas ajudas com o confocal, especialmente nas sextas feiras de noite, quando todos estavam se divertindo, eu te fiz trabalhar. Obrigado pelas incontáveis

cervejas que tomamos, e que acompanharam a maior parte das conversas que mencionei.

Ainda agradecendo às pessoas do laboratório de Cronofarmacologia, quero agradecer especialmente a Profª Drª Zulma, por todo o auxílio dentro do laboratório, pela atitude sempre gentil e prestativa, e por me ajudar a obter um meio que muito ajudou meu trabalho.

Um agradecimento especial e sincero à minha orientadora Profª Drª Regina Pekelmann Markus. Obrigado pela paciência, confiança, e pelos necessários "puxões de orelha". Pelas conversas e por sempre ouvir minhas idéias e opiniões. Tudo foi de grande valia para meu crescimento. Obrigado.

Agradeço à Drª Gerlândia Pontes e Drª Magda M. S. Carneiro-Sampaio, pela contribuição inicial ao projeto.

E finalizando os agradecimentos pessoais, devo agradecer a todo pessoal do Alojamento Conjunto, da Maternidade do Hospital Universitário da USP. As enfermeiras: Ana Paula, Atsuko, Bianca, Adriana, Caterina, Cleusa, Gilcéria, Luciana, Marcia, Mayra, Suzete e Vanessa. E também a todas as técnicas e auxiliares de enfermagem, assim como as oficiais administrativas. Muito obrigado por sanarem dúvidas diversas, auxiliarem em algumas das coletas, e pela constante gentileza. Agradeço especialmente a Enfermeira Chefe de Seção, Ilva Marico Mizumoto Aragaki, que desde o início me recebeu muito bem, e me deu acesso livre ao AC. Muito obrigado.

Gostaria de agradecer a todas as mães que gentilmente doaram colostro para nosso projeto, e ao auxílio financeiro da FAPESP, CAPES e CNPq, cuja contribuição foi fundamental para a realização deste trabalho.

Índice

RESUMO ..... **VIII**
ABSTRACT ..... **IX**
INTRODUÇÃO **1**
COLOSTRO HUMANO 4
PROCESSOS DE RECONHECIMENTO E ELIMINAÇÃO DE PATÓGENOS 7
Reconhecimento de partículas/microorganismos invasores por receptores do tipo Toll 8
Fagocitose 11
A VIA DE TRANSDUÇÃO DE SINAL NFKB 16
MELATONINA 19
Funções 19
Produção de Melatonina pela Glândula Pineal 23
Produção Extra-pineal de Melatonina 25
O EIXO IMUNE-PINEAL 27
OBJETIVOS **29**
DISCUSSÃO **31**
CONCLUSÕES **42**
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **84**

Lista de Abreviaturas

AA-NAT	enzima alril-alquilamina-N-acetil-transferase
Ac2LP	diacil polipeptídeos
Ac3LP	triacil polipeptídeos
AFMK	N-acetil-N-formil-5-metoxi-quinuramina
ALLN	N-acetil-L-leucil-L-leucil-L-norleucina
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico
ATP	trifosfato de adenosina
BCG	Bacilo Calmette-Guerín
CARD	domínio de recrutamento de caspase
CRE	elementos responsivos a AMPc
CREB	proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc
DMSO	dimetil-sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
ELISA	ensaio enzimático ligado a imuno-absorbância
EMSA	ensaio de eletromobilidade em gel
EPEC	*Escherichia coli* Enteropatogênica
GPCR	receptor acoplado à proteína G
HIOMT	enzima hidroxi-indol-O-metil-transferase
IFN-γ	interferon gama
IgA	imunoglobulina A
IgG	imunoglobulina G

IL	interleucinas
IKB	proteína inibitória kappa B, também conhecida por NFKBI
IKK	proteína quinase de IKB
LTA	ácido lipoteitóico
LBP	proteína de ligação a lipopolissacarídeo
LPS	lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas
MARCKS	substrato da proteína quinase C
MN	células mononucleares
MT	receptores metabotrópicos de melatonina
MyD88	fator de diferenciação mielóide 88
nAchR	receptores nicotínicos de acetilcolina
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo-P
NAS	N-acetilserotonina
NES	sequencia de exportação nuclear
NFKB	fator nuclear kappa B
NLS	sequencia de localização nuclear
NO	óxido nítrico
NOD	domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeo
NSQ	núcleo supraquiasmático
PAMP	padrões moleculares associados a patógenos
PDTC	pirrolidina ditiocarbamato
PKA	proteína quinase dependente de AMPc
PKC	proteína quinase dependente de cálcio
PMN	células polimorfonucleares

Poli I:C	ácido poli-inosínico-policitidílico
PPRs	receptors de reconhecimento de padrões
QR2	quinona redutase 2
RNS	espécie reativa de nitrogênio
ROS	espécie reativa de oxigênio
ROR	receptor órfão de retinóides
RZR	receptor Z de retinóides
SFB	soro fetal bovino
SyK	proteína tirosina quinase do baço
TAD	domínio de ativação de transcrição
TNF	fator de necrose tumoral
TLR	receptor do tipo Toll
ZNO	zimosan não-opsonizado
ZOP	zimosan opsonizado

Resumo

A síntese de melatonina por fagócitos mononucleares do colostro humano é iniciada após a indução com a partícula zimosan, com ou sem opsonização por IgA. Esta produção é dependente da ativação da via NFKB, o que foi observado após o bloqueio farmacológico da via com PDTC ou ALLN levando a diminuição da concentração de melatonina nas culturas. A localização do NFKB varia temporalmente após o estímulo inicial e as subunidades do NFKB são diferentes no núcleo de células ativadas. A subunidade p50 está presente em todas as condições experimentais (controle, zimosan e zimosan opsonizado), mas as subunidades Rel A e c-Rel apenas nas células tratadas. A melatonina apresenta atividade sobre células imunocompetentes em diversos modelos experimentais, mas o modelo de fagocitose ainda não havia sido relatado na literatura. Observamos que a melatonina é capaz de potenciar a fagocitose de zimosan não opsonizado. A capacidade de síntese de melatonina apresentada por células imunocompetentes é um fenômeno conhecido e agora pudemos demonstrar que a via NFKB é responsável também pela síntese de melatonina em fagócitos mononucleares do colostro. Ao contrário do que ocorre na glândula pineal onde a ativação da via do NFKB bloqueia a síntese de melatonina, nos leucócitos, a ativação desta via se faz necessária para o inicio da síntese. Uma possível justificativa para esta diferença é a presença da subunidade c-Rel apenas nos fagócitos, permitindo supor que esta subunidade seja responsável pela síntese de melatonina nestas células. Hipoteticamente, a síntese de melatonina dependente da ativação de um fator envolvido com a resposta inflamatória, abre a perspectiva de que a melatonina estaria participando deste processo. O aumento na taxa de fagocitose induzida pela melatonina mostra uma participação importante dessa indolamina durante uma infecção, diminuindo o tempo em que um possível patógeno se encontraria no meio extracelular auxiliando na sua rápida eliminação. Os dados apresentados no presente trabalho demonstram que as células imunocompetentes não apenas produzem esta indolamina, como também se utilizam dela para modular processos nos quais estas células participam.

Abstract

The melatonin synthesis by human mononuclear phagocytes starts after the induction by IgA opsonized or not zymosan. This production is dependent on the activation of NFKB pathway since the pharmacological block of the pathway by PDTC or ALLN reduces the melatonin concentration in culture supernatants. The NFKB localization temporally varies after initial stimulus and the presence of specific subunits in the cell nucleus is different in activated cells when compared with control cells. We observed the presence of p50 subunit in all experimental conditions (control, zymosan, opsonized zymosan), but the Rel A and c-Rel subunits were only detected in treated cells. Melatonin shows activity over immune cells in many experimental models, but the phagocytosis model was not yet reported in literature. We observed that melatonin (1 nM) is able to potentiate the non opsonized zymosan phagocytosis. The capacity to synthesize melatonin presented by immune cells is a well known phenomenon and now we demonstrate that the NFKB pathway is also responsible for the melatonin synthesis in colostral mononuclear phagocytes. The activation of NFKB pathway inhibits the melatonin synthesis in pineal gland but, in leukocytes, the activation of this pathway is necessary to achieved melatonin synthesis. A possible explanation for this difference is the presence of c-Rel in the phagocytes, which presents transactivation domains, allowing the supposition that this subunit is the responsible for melatonin synthesis in these cells. Since, melatonin synthesis is dependent on the activation of a factor involved with an inflammatory response, this study opens the perspective that the melatonin could participate as a modulator of this process. The phagocytosis induced by melatonin discloses a significant role of this indolamine during an infection, promoting the fast elimination of pathogen in the extracellular medium. The data shows that immune cells not only produces this indolamine, but also use the melatonin to modulate the immune responses.

INTRODUÇÃO

O colostro humano, secreção rica em proteínas, lipídeos, carboidratos, sais minerais e células imunocompetentes, é de grande relevância para o bom desenvolvimento do recém-nascido. Uma grande quantidade de células mononucleares, principalmente fagócitos, e menor quantidade de células polimorfonucleares formam a primeira linha de defesa, protegendo o recém-nascido contra microorganismos patogênicos.

Esta proteção inicial implica na fagocitose de patógenos decorrente da ativação de receptores de membrana por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). A principal via de transdução que medeia a fagocitose é a translocação nuclear do fator de transcrição kappa B (NFKB), capaz de induzir a expressão gênica de citocinas, hormônios, e receptores ligados à resposta inflamatória.

A melatonina, liberada ritmicamente pela glândula pineal durante a fase de escuro, sincroniza o organismo ao ciclo de claro/escuro ambiental. Além deste efeito cronobiótico, esta molécula também tem propriedades antiinflamatórias e reguladoras do sistema imunológico.

Esta indolamina é sintetizada por diversos órgãos e tecidos além da glândula pineal, e são as células imunocompetentes uma das mais importantes fontes de melatonina extra-pineal. Esta síntese é induzida pela ativação destas células, mais precisamente os fagócitos, por bactérias ou compostos imunogênicos, coincidindo com o início de uma resposta inflamatória.

O mesmo indutor da síntese de melatonina por estes fagócitos também induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF), que é capaz de sinalizar na glândula pineal a ocorrência de um processo inflamatório na

periferia. Esta sinalização inibe a produção noturna de melatonina, que só é restaurada após a resolução desta inflamação.

A observação de que a glândula pineal está instrumentada para atuar como um sensor de respostas imunológicas, e que é capaz de responder a tais estímulos, permitiu a proposição de um novo conceito de trabalho, que sugere uma comunicação bi-direcional entre a glândula pineal e o sistema imunológico.

Todas as informações aqui apresentadas fazem a base desta dissertação e serão bem descritas ao longo da introdução.

Colostro Humano

O colostro é um líquido secretado pela glândula mamária nos primeiros dias de lactação (aproximadamente até o 5º dia pós-parto), tendo papel fundamental no desenvolvimento do neonato (Carlsson *et al.*, 1994; Calil *et al.*, 2003). Sua composição, que inclui células de defesa, anticorpos, lipídeos, carboidratos, proteínas, é específica para cada espécie e fornece ao neonato, não apenas nutrientes, mas também elementos de defesa essenciais para os primeiros dias de vida.

O colostro humano é transparente, levemente amarelo devido à alta concentração de beta-caroteno, e altamente rico em células. É uma secreção viscosa que apresenta maior concentração de proteína, sais minerais e vitaminas lipossolúveis, bem como menores teores de lactose, gorduras e vitaminas do complexo B do que o leite maduro. Seu conteúdo energético oscila em torno de 58 kcal/100 mL, em contraste com o leite maduro, que é de 71 kcal/100 mL. A composição média do colostro humano, leite materno maduro e leite de vaca é apresentada na tabela 1 (Calil *et al.*, 2003).

Tabela 1 - Composição do colostro e leite humanos, e do leite de vaca. Adaptado de Calil e cols. (2003).

Componentes	Colostro	Leite maduro	Leite de vaca
– Água (g/dl)	87,2	87,6	87,3
– Energia (kcal/dl)	58	71	69
– Sólidos totais (g/dl)	12,8	12,4	12,7
Minerais	0,33	0,21	0,72
Gorduras	1,85 a 2,9	3,0 a 3,8	3,7
Lactose	5,3	7	4,8
Proteínas Totais	2,7	1,2	3,3
– Frações protéicas (g/dl)			
Caseína	1,2	0,25	2,8
Lactalbumina	-	0,3	0,2
Lactoglobulina	-	-	0,4
– Minerais			
Sódio (mEq/l)	21	7	25
Potássio (mEq/l)	19	14	35
Cloreto (mEq/l)	26	12	29
Cálcio (mg/dl)	31 a 32	28 a 33	125
(mEq/l)	15,5 a 16	12 a 16,5	62,4
Magnésio (mg/dl)	3 a 4	3 a 4	12
(mEq/l)	2,5 a 3,3	2,5 a 3,3	10
Fósforo (mg/dl)	12 a 14	13 a 15	96
Sulfato (mg/dl)	22	14	30
Ferro (mg/dl)	0,09	0,15	0,1
Iodo (mg/dl)	0,012	0,007	0,021
Cobre (mg/dl)	0,05	0,04	0,03
Zinco (mg/dl)	0,5 a 0,96	0,25 a 0,37	0,38
– Aminoácidos (mg/dl)			
Arginina	75	51	124
Cistina	-	29	-
Histidina	41	23	80
Isoleucina	101	86	212
Leucina	165	161	356
Lisina	117	79	257
Metionina	25	23	87
Fenilalanina	70	64	173
Tirosina	-	62	190
Treonina	85	62	152
Triptofano	32	22	50
Valina	117	90	228
– Ácidos Graxos (% do total)			
– Total Saturado	47,7	48,2	-
Láurico	0,9	4,7 a 5,5	3,6
Mirístico	28	7,9 a 8,5	11,8
Palmítico	24,6	23,2 a 26,7	36,6
Esteárico	9,9	6,9 a 8,3	8,1
– Total Insaturado	52,4	51,8	-
Palmitoléico	1,8	3,0 a 3,4	3,2
Oléico	36	36,5 a 37,5	17,7
Linoléico	7,5	10,7	2,1
Linolênico	0,3	0,4	0,7
– Vitaminas			
Vit. A (µg/dl)	161	53	34
Carotenóides (µg/dl)	137	27	38
Vit. B_1 (µg/dl)	1,9	16	42
Vit. B_2 (µg/dl)	30,2	43	157
Niacina (µg/dl)	-	172	85
Vit. B_6 (µg/dl)	1,7	11	48
Ác. Fól. (µg/dl)	-	4 a 5	5
Vit. B_{12} (µg/dl)	0,05	0,18	0,56
Vit. C (mg/dl)	7,2	4,3	1,8
Vit. D (UI/dl)	-	0,4 a 10	0,3 a 4,0
Vit. E (mg/dl)	1,5	0,46	-
Vit. K (µg/dl)	-	1,5	6

Os leucócitos presentes no colostro humano podem ser mono ou polimorfonucleares. As células mononucleares são em sua maioria macrófagos e linfócitos, e as polimorfonucleares são neutrófilos. Na contagem total de leucócitos presentes no colostro, são os macrófagos os mais abundantes (Wheeler *et al.*, 2007). As células imunocompententes presentes no colostro se encontram em um estado quiescente.

Imunoglobulinas também são transferidas ao neonato pelo colostro, junto com as células imunocompetentes. Estas imunoglobulinas são direcionadas contra microorganismos os quais a mãe esteve exposta durante a vida, garantindo uma proteção contra potenciais patógenos presentes no ambiente em que a mãe vive, ou viveu (Goldman, 1993; Newman, 1995; Kolb *et al.*,2001). A composição dos anticorpos é diferente em colostro humano e de vaca. No colostro humano a imunoglobulina A (IgA), que tem como função opsonizar e neutralizar patógenos, representa 90% do total de anticorpos, enquanto no de vaca apenas 10% (Honório-França *et al.*, 1997, 2001; Jacob *et al.*, 2008; Macpherson e Uhr, 2004; Wheeler *et al.*, 2007). Na vaca a principal imunoglobulina é a IgG (tabela 2).

Tabela 2 - Conteúdo de imunoglobulinas no colostro humano. Adaptado de Wheeler e cols (2007).

Espécie	Imunoglobulina	Concentração (g/l)				% do total de Igs	
		Colostro	Leite	Soro	Colostro	Leite	Soro
Humano	IgG	0,43	0,04	12,10	2,0	3,0	78,0
	IgA	17,35	1,00	2,50	90,0	87,0	16,0
	IgM	1,59	0,10	0,93	8,0	10,0	6,0
Vaca	IgG1	46,40	0,58	11,20	75,5	71,6	47,0
	IgG2	2,87	0,06	9,20	4,7	7,4	38,6
	IgA	5,36	0,08	0,37	8,8	9,9	1,6
	IgM	6,77	0,09	3,05	11,0	11,1	12,8

Processos de Reconhecimento e Eliminação de Patógenos

Para haver a possibilidade de um reconhecimento de substâncias exógenas ao organismo, e uma possível resposta, as células do sistema imunológico precisam de mecanismos de reconhecimento e propagação da informação obtida pelo reconhecimento inicial, assim como um mecanismo de eliminação dos invasores.

Os mecanismos para reconhecimento de microorganismos utilizados pelas células imunocompetentes são basicamente três: receptores de membrana do tipo Toll (TLR, do inglês *"toll like receptors"*), receptores de membrana envolvidos com o processo de fagocitose, e receptores intracelulares localizados no citoplasma.

Após o reconhecimento inicial, a eliminação de patógenos ocorre através do processo de fagocitose ou através da eliminação da célula já infectada. Fatores liberados na região infeccionada e na circulação podem ainda combater uma infecção que esteja se alastrando pelo organismo ou que tenha entrado diretamente na corrente sanguínea.

Quando a resposta inicial contra eventuais patógenos é resolvida, mecanismos de sinalização desencadeados durante a resposta inata atuam em conjunto com mecanismos neurais para criar uma "memória" imunológica, permitindo ao organismo responder de forma mais eficiente e direcionada contra uma infecção posterior pelo mesmo tipo de microorganismo.

Reconhecimento de partículas/microorganismos invasores por receptores do tipo Toll

O processo de reconhecimento de patógenos pelas células imunocompetentes ocorre mediante a interação inicial de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP, do inglês "*pathogen-associated molecular patterns*"), encontrados em virtualmente todos os micróbios, com moléculas presentes na superfície da membrana destas células, os receptores de reconhecimento de padrões ou PPRs (do inglês "*pattern-recognition receptors*"), e dentre estes, a maior família de receptores são os TLRs (Aderem e Underhill, 1999; Ozinsky *et al*., 2000; Kawai e Akira, 2005).

Os receptores TLRs, são uma classe de receptores de membrana homólogos aos receptores Toll encontrados em *Drosophila*, compostos de 13 subtipos (Beutler, 2009a, 2009b; Kumar *et al*., 2009). Cada um deles é capaz de reconhecer elementos expressos em diferentes microorganismos (tabela 3). Até o momento, ainda não foram descritos ligantes para os TLRs 12 e 13 (Underhill e Ozinsky, 2002; Beutler, 2009).

Tabela 3 – TLRs, proteínas associadas, ligantes e moléculas adaptadoras. Proteínas associadas referem-se a moléculas de superfície que conhecidamente têm papel essencial na detecção de alguns ligantes (Ac3LP, triacil polipeptídeos; Ac2LP, diacil polipeptídeos; LTA, ácido lipoteitóico; Poli I:C, ácido poli-inosínico-policitidílico); dsRNA, RNA dupla-fita que forma o material genético de alguns vírus; ssRNA, RNA fita simples viral; CpGDNA, DNA metilado . Adaptado de Beutler (2009).

TLRs	Proteínas Associadas	Ligantes	Adaptadores
TLR1/2	CD14, CD36, Dectina 1	Ac3LP, Glicolipideos	MyD88, MAL
TLR2/6	CD14, Dectina 1	Ac2LP, LTA, Zimosan	MyD88, MAL
TLR3		Poli I:C, dsRNA	TRIF
TLR4	CD14, MD-2	LPS, Taxol, e outros	MyD88, MAL, TRIF,TRAM
TLR5		Flagelina	MyD88
TLR7		ssRNA e outros	MyD88
TLR9		CpG DNA	MyD88
TLR11		Profilina	MyD88
TLR12		?	?
TLR13		?	?

Em alguns casos, os TLRs podem formar dímeros para reconhecimento de certos elementos em comum, como é visto no caso do zimosan, uma partícula presente em fungos, e que pode ser reconhecida pelo dímero TLR 2/6, além de individualmente por cada um destes receptores (Akira *et al*., 2004; Ikeda *et al*., 2008; Kumar *et al*., 2009). O reconhecimento através dos TLRs permite uma identificação do patógeno que está causando a infecção e o desencadeamento de cascatas de sinalização intracelular que permitem a amplificação do sinal e eficiente resposta inespecífica, capaz de combater uma infecção por praticamente qualquer patógeno apenas através do reconhecimento dos PAMPs que estes apresentam (Aderem e Underhill, 1999; Ozinsky *et al*., 2000).

Os TLRs utilizam basicamente duas vias de transdução de sinal, uma dependente e outra independente da proteína adaptadora MyD88 (do inglês, *"myelloid differentiation factor 88"*). A ativação de praticamente todos os subtipos de TLR, seja utilizando a MyD88 ou não, é capaz de ativar o NFKB, além de algumas outras vias que variam de um subtipo para outro (Akira e Takeda, 2004; Kawai e Akira, 2005), como pode ser visto na figura 1.

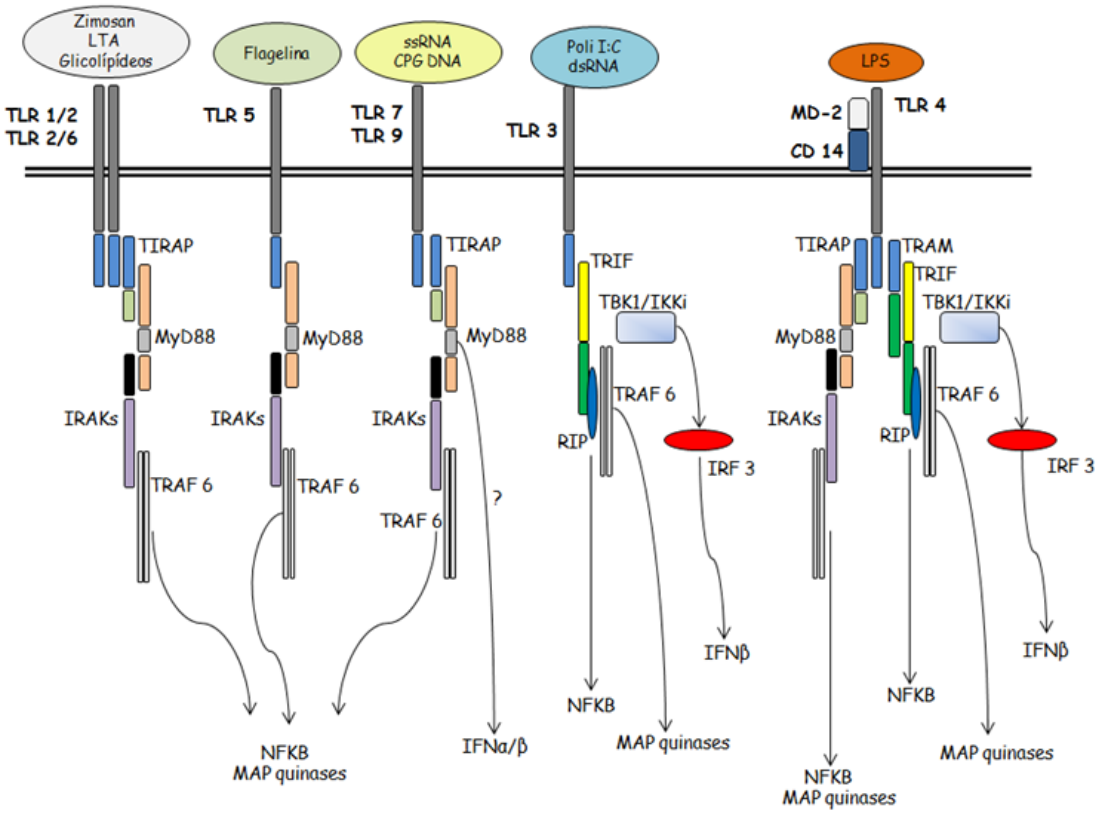

Figura 1 – Ligantes clássicos dos TLRs, moléculas adaptadoras utilizadas na cascata de sinalização e vias de transdução de sinal ativadas.

A ativação dos TLRs é um evento inicial na montagem de uma resposta imunológica de caráter inato que contribui tanto na identificação da ameaça quanto

nos estágios posteriores de combate à infecção. A atuação dos receptores TLRs auxilia em processos de sinalização por induzir a síntese de citocinas e também auxilia na fagocitose do patógeno (Aderem e Underhill, 1999; Underhill *et al*., 1999; Underhill e Ozinsky, 2002; Iwazaki e Medzhitov, 2010). Em alguns casos os TLRs agem em conjunto com receptores que se encontram no interior das células, os NOD (do inglês, "*nucleotide-binding oligomerization domain*"), permitindo maior eficácia na identificação dos patógenos e no direcionamento da resposta (Franchi *et al*., 2008; Bortoluci e Medzhitov, 2010). Existe também a possibilidade de TLRs atuarem conjuntamente com outros elementos presentes na membrana ou mesmo no meio extracelular para reconhecer uma partícula específica, como é o caso do TLR 4, que pode reconhecer o lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas (LPS) em colaboração à proteína LBP (do inglês, "*lipopolysaccharide binding protein*"). Esta atuação conjunta facilita a formação de um complexo do TLR4 com a proteína acessória MD-2 e com o receptor de membrana (que pode ser encontrado também em uma forma solúvel, no meio extracelular) CD 14 (Tobias *et al*., 1993; Miyake, 2004; Lu *et al*., 2008).

Fagocitose

A fagocitose é um processo altamente conservado, cuja função primordial relaciona-se à obtenção de nutrientes por organismos unicelulares. Já em organismos mais complexos, a fagocitose é realizada por células especializadas, os fagócitos, e está relacionada a mecanismos de defesa do organismo (Aderem e Underhill, 1999; Aderem *et al*., 2004).

Os receptores responsáveis pelo desencadeamento da fagocitose são os receptores para elementos não-específicos encontrados em microorganismos, como os receptores de manose (Speert e Silverstein, 1985) ou glicanas (como por exemplo, o receptor dectina-1) (Gantner *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2006; Kennedy *et al.*, 2006); receptores para patógenos opsonizados por complemento, ou receptores Fc específicos para patógenos opsonizados com imunoglobulinas (Aderem e Underhill, 1999, Bakema *et al.*, 2006).

O processo de fagocitose envolve o reconhecimento de antígenos por parte dos receptores apropriados, seguida por uma sinalização via proteína tirosina quinase SyK (do inglês "*spleen tirosine kinase*") e proteína quinase C (PKC, do inglês, "*protein kinase C*") que modulam a polimerização de actina, proteína presente no citoplasma das células eucariotas que participa da sustentação e movimentação da membrana plasmática. A actina age na região de ligação entre antígeno e receptor, pois sua polimerização ou despolimerização altera a membrana de modo que esta possa engolfar e internalizar a partícula ou patógeno ligado (Aderem e Underhill, 1999; Steinberg e Grinstein, 2008). A actina está envolvida em praticamente todas as etapas do processo, desde ingestão da partícula/microorganismo, à eliminação do que foi ingerido (Hartwig *et al.*, 1992). Além de participar do englobamento e internalização da partícula ligada, atua também no trânsito das vesículas que se fundem ao fagossomo (nome dado ao compartimento internalizado com o microorganismo) ao longo do processo de maturação do mesmo (Hartwig *et al.*, 1992; Allen e Aderem, 1995).

O fagossomo, após ser maturado por uma série de fissões e fusões com endossomos ligados ao processo de endocitose, se encontra em um estado no qual o

patógeno internalizado é eliminado por enzimas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS respectivamente, do inglês "*reactive oxygen species*" e "*reactive nitrogen species*") (Aderem e Underhill, 1999). Este processo de maturação envolve diversas moléculas e eventos intracelulares, dependentes do íon cálcio (Ca^{2+}). Estes eventos são a atividade das enzimas PKC α (uma isoenzima da PKC) e calmodulina e da proteína MARCKS (um substrato tanto da PKC α quanto da calmodulina), que participam da polimerização da actina e fusão dos endossomos (Hartwig *et al*., 1992; Brumell *et al*., 1995; Mandeville e Maxfield, 1996; Colombo *et al*., 1997; Kim-Park *et al*., 1997; Peters e Mayer, 1998; Mills *et al*., 2001).

O processo de fagocitose por si só induz e necessita da presença de ROS (como peróxido de hidrogênio e ânion superóxido) e RNS, que são gerados para eliminar os microorganismos fagocitados. Estes radicais livres são gerados através de mecanismos como a síntese de óxido nítrico (NO) e o processo de "*burst*" respiratório (Aderem e Underhill, 1999; Steinberg e Grinstein, 2008; Robinson, 2009).

Ao final do processo de maturação, há fusão de vesículas contendo enzimas e espécies reativas aos fagossomos, degradando os microorganismos fagocitados (Aderem e Underhill, 1999; Vieira *et al*., 2002).

A fagocitose além de permitir a eliminação de microorganismos invasores, também gera sinalização parácrina por citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 12 (IL-12) (Stein e Gordon, 1991; Ruland, 2008), que induzem a atividade de outras células imunocompetentes, como os linfócitos T e B (Mosser e Edwards, 2008; Boyman *et al*., 2009). Estas citocinas são induzidas pela fagocitose em si, e sua expressão é ativada pela translocação nuclear do NFKB, quando induzido pela proteína adaptadora CARD 9 (de "*caspase*

recruitment domain"), via proteína quinase SyK. Receptores de fagocitose que possuem cascata de sinalização por SyK tem atuação sinérgica com receptores TLR, potenciando e qualificando a resposta inata ao estímulo (Akira e Takeda, 2004; Franchi *et al.*, 2008; Ruland, 2008).

Desde o início, o processo de fagocitose dispara diversos eventos que determinam e propiciam um processo de fagocitose eficiente atuando através de diversos caminhos sinérgicos e redundantes de forma que a ocorrência de todas as etapas do processo seja garantida.

Posteriormente ao reconhecimento do patógeno, sua ingestão, e eliminação, mecanismos desencadeados durante a resposta imunológica inata passam a informação obtida adiante para células capazes de realizar uma manutenção prolongada do combate a uma possível infecção, e também resolvendo o processo inflamatório local, levando a um padrão de resposta chamado de resposta imunológica adquirida (Janeway *et al.*, 2001).

Esta passagem de um caráter inato para um adquirido de resposta é gerada basicamente por dois mecanismos sinérgicos: (i) A liberação de citocinas por parte das células envolvidas no reconhecimento e eliminação inicial dos patógenos, que permite tanto qualificar quanto quantificar a ameaça para o resto do organismo de uma maneira rápida e precisa, ativando a diferenciação e expansão de células capazes de combater especificamente os patógenos identificados na resposta inata. (ii) A apresentação dos antígenos resultantes da degradação dos microorganismos no fagossomo pelas células apresentadoras de antígenos para linfócitos T e B, direciona a diferenciação destas células, que irão efetuar a resposta adquirida contra os

padrões reconhecidos durante a resposta inata inicial (Parker e Eynon, 1991; Janeway *et al.*, 2001).

A atuação do sistema nervoso central sobre a resolução do processo inflamatório ocorre principalmente através de seu braço parassimpático, mediado pelo hormônio acetilcolina. A ativação de receptores colinérgicos nicotínicos do subtipo α7, expressos em macrófagos, causa inibição da produção de diversas citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e monócitos, principalmente o TNF, permitindo que o processo inflamatório não cause danos teciduais caso este seja exacerbado, reduzindo a inflamação em conjunto com mediadores liberados pelo próprio sistema imunológico. (Wang *et al.*, 2003; Rosas-Balina *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2010; van Westerloo, 2010)

A resolução do processo inflamatório conjuntamente com a diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-1 ou IL-12 ocorre concomitantemente com o aumento da síntese de citocinas antiinflamatórias como o IL-10 (Mosser e Edwards, 2008).

Além de inibir a via NFKB nos macrófagos e monócitos ativados (Rosas-Balina *et al.*, 2009), a acetilcolina também contribui com o amadurecimento e a propagação de linfócitos B no baço, especificamente aqueles que expressam o α7 nAchR, que serão responsáveis por combater infecções posteriores através da produção de anticorpos específicos contra patógenos reconhecidos na resposta inata (Skok *et al.*,2007).

A Via de transdução de sinal NFKB

A via de transcrição NFKB foi identificada primeiramente em linfócitos B como sendo uma via de sinalização capaz de regular a expressão da cadeia leve κ nestas células (Akira e Takeda, 2004; Hayden e Ghosh, 2008; Ruland, 2008).

Esta é uma via de transdução de sinal e modulação da transcrição gênica em diversos tecidos e grupos celulares, mas sua mais conhecida atuação é no sistema imunológico, onde age como uma via central na resposta imunológica, principalmente da resposta inflamatória inata. A via NFKB pode ser desencadeada, entre outros estímulos, pela ativação de receptores TLR, ou pelo processo de fagocitose (Akira e Takeda, 2004; Hayden e Ghosh, 2008; Ruland, 2008).

O NFKB é um dímero que se encontra no citoplasma ligado a proteína inibitória kappa B (IKB). As cinco unidades protéicas que podem formar o dímero NKFB pertencem à família de homologia Rel, que é constituída pelas subunidades p50 e p52, que não possuem um domínio de ativação de transcrição (TAD, do inglês "*transcription activation domain*"), causando a inibição da transcrição de um gene; e pelas subunidades Rel A, Rel B e c-Rel, que possuem este domínio TAD e induzem a transcrição gênica (Hayden e Gosh, 2008).

A via de transdução NFKB é ativada por receptores presentes na membrana plasmática ou no citoplasma (Franchi *et al.*, 2008; Ruland, 2008) que por ação direta, e posterior transmissão desses sinais através de moléculas adaptadoras, segue a ativação das IKKs, quinases responsáveis por fosforilar as moléculas de IKB e consequentemente fazer com que estas sejam degradadas via proteassoma, liberando

o dímero NFKB para ir ao núcleo (Hayden e Ghosh, 2008) como pode ser visto na figura 2, que exemplifica a ativação do NFKB por um ligante de TLR 2/6, o zimosan.

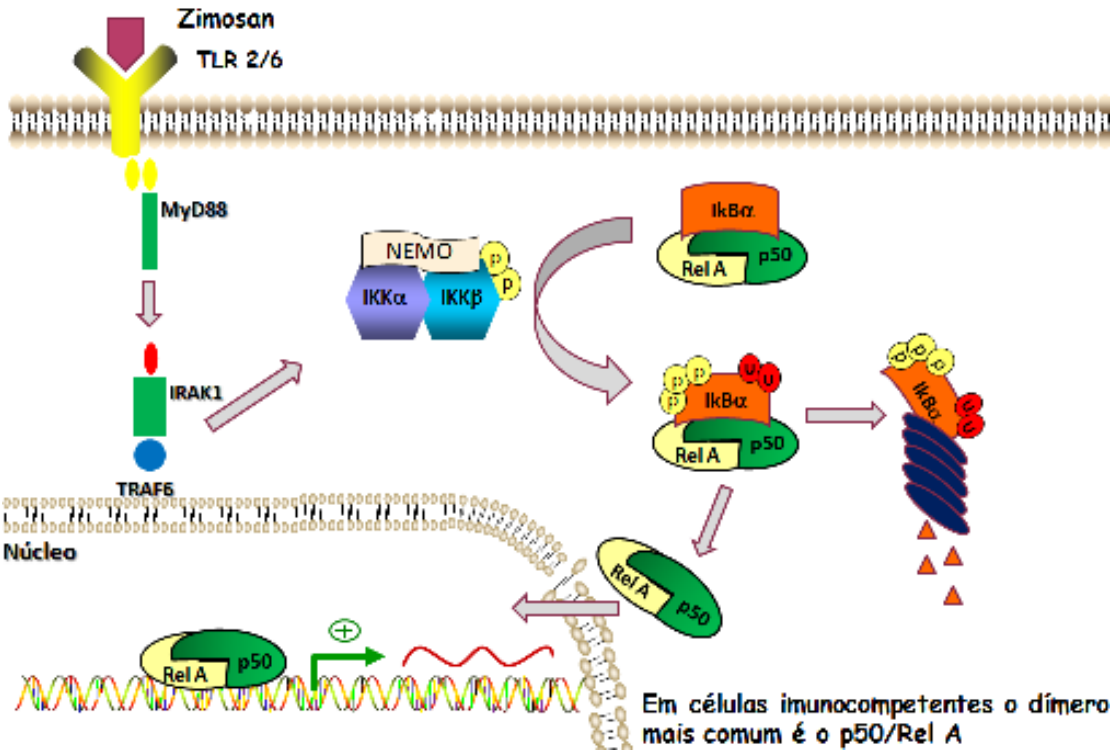

Figura 2 – Ativação típica do NFKB em células imunocompetentes. Um receptor do tipo Toll localizado na membrana de células imunocompetentes é ativado por um ligante específico, e, através de moléculas adaptadoras, uma cascata de sinalização induz a translocação nuclear do dímero p50/RelA para o núcleo, ativando a transcrição de diversos produtos relacionados ao processo inflamatório.

Foi observado que as moléculas de IKB (no plural, pois existem alguns subtipos) ao se ligar em dímeros do NFKB, por exemplo, ao p50/Rel A, mascaram apenas a sequencia de localização nuclear (NLS, do inglês, "*nuclear localization sequence*") da Rel A, enquanto a NLS da p50 fica exposta. A NLS exposta da p50, quando acoplada com a sequencia de exportação nuclear (NES, do inglês, "*nuclear export sequence*") no IKB e na Rel A, leva a uma alternância constante dos complexos

IKB/NFKB entre o núcleo e o citoplasma, mesmo em um estado de equilíbrio homeostático, ou seja, gerando uma constante alternância na localização do NFKB entre núcleo e citoplasma mesmo em condições basais (Ghosh e Karin, 2002).

Trabalhos de nosso grupo demonstram que a via NFKB está envolvida na síntese de melatonina pela glândula pineal de ratos. A ativação da via NFKB através da exposição da glândula em cultura ao TNF, uma importante citocina de caráter pró-inflamatório, faz com que a síntese de melatonina seja bloqueada (Fernandes *et al*., 2006). Mais recentemente mostramos que a glândula pineal apresenta um ritmo de expressão de NFKB, sendo que durante a fase de claro, este se encontra no núcleo, mas no início da fase de escuro o mesmo sofre uma queda brusca (Cecon *et al*., 2010).

Estes dados sobre a via NFKB demonstram que esta via de sinalização apresenta uma estreita relação com a síntese de melatonina tanto em seu caráter cronobiótico, por modular sua síntese na pineal, quanto em seu caráter pontual, como será demonstrado à frente.

Existem alguns compostos inibidores da atividade da via NFKB que são usualmente utilizados para avaliar a atividade desta via em alguns fenômenos. Os compostos ALLN (N-acetil-L-leucil-L-leucil-L-norleucina) e PDTC (pirrolidina ditiocarbamato) são bloqueadores da atividade da via NFKB que agem por vias completamente diversas no bloqueio da sua atividade. O PDTC impede a ligação do NFKB às regiões promotoras do gene após a entrada no núcleo celular (Ziegler-Heitbrock *et al*., 1993; Wolchok *et al*., 1994; De Plaen *et al*., 2006; Jiang *et al*., 2008), enquanto o ALLN previne a degradação do IKB, e impede que o NFKB seja translocado para o núcleo (Haas *et al*., 1998; Zen *et al*.,1998).

A via NFKB tem sido amplamente estudada nos mais diversos sistemas, principalmente no que se refere à resposta imunológica e em condições fisiopatológicas. Porém, esta nova atividade do NFKB, modulando a síntese de melatonina, demonstra uma íntima relação entre o sistema imunológico e o sistema nervoso central, e com isso abre novas perspectivas de como pode ocorrer a manutenção da homeostase em condições fisiológicas ou fisiopatológicas.

Melatonina

Hormônio isolado e descrito pela primeira vez em 1958 por Lerner e colaboradores, a melatonina é uma indolamina lipofílica sintetizada a partir da serotonina, vinda do aminoácido essencial triptofano (Lerner *et al.*,1959; Klein e Weller, 1970), e está presente em diversos táxons da árvore filogenética (Reiter, 1991; Reiter *et al.*, 2000; Arnao *et al.*, 2006).

Funções

A ação considerada clássica da melatonina nos vertebrados está relacionada à sinalização endógena da condição de claro-escuro ambiental. Por ser sintetizada pela glândula pineal apenas durante a fase de escuro, ela atua como um fototransdutor biológico indicando ao organismo a ausência de luz ambiental. Este efeito é de extrema importância para sincronizar os seres vivos com as condições de iluminação ambiental, ajustando diversas funções fisiológicas ao ambiente em caráter diário e sazonal, através da variação de sua amplitude noturna ao longo do ano (Simonneaux e Ribelayga, 2003).

Outra ação da melatonina considerada primordial é sua capacidade de atuar no sistema de defesa dos organismos, algumas vezes como um antioxidante capaz de anular direta ou indiretamente a ação deletéria de radicais livres e ROS e RNS, oriundos do metabolismo celular e de condições fisiopatológicas. Este tipo de ação seria, inclusive, a principal função da melatonina em organismos mais primitivos como bactérias e outros organismos unicelulares, que teriam menos recursos para se proteger contra este tipo de condição (Reiter *et al.*, 2000).

Além de atuar como um antioxidante, outro efeito da melatonina é a modulação de diversos aspectos da resposta imunológica de mamíferos (Garcia-Mauriño *et al.*, 1997). Trabalhos têm sido publicados demonstrando efeitos da melatonina sobre a resposta das células imunocompetentes, inclusive demonstrando que este hormônio pode ser sintetizado localmente por células do sistema imunológico quando ativadas, atuando de forma parácrina e autócrina (Garcia-Mauriño *et al.*, 1997; Skwarlo-Sonta *et al.*, 2003; Pontes *et al.*, 2006; Markus *et al.*, 2007). A melatonina pode estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-2, IL-6 e também interferon gama (IFN-γ) em células mononucleares de sangue periférico de humanos (Garcia-Mauriño *et al.*, 1997).

A melatonina é capaz de atuar sobre receptores específicos e também interagir com outras moléculas e enzimas diretamente (para revisão, Markus e Tamura, 2009). Os receptores de membrana para a melatonina são receptores de sete domínios transmembrânicos acoplados à proteína G, que foram primeiramente identificados em melanócitos do anfíbio *Xenopus*, e posteriormente encontrados homólogos em outras espécies de vertebrados. Em mamíferos dois subtipos de receptores são encontrados, MT1 e MT2, que como dito anteriormente, são receptores típicos

acoplados à proteína G (GPCRs), e podem estar acoplados a diferentes isoformas da proteína G, variando de acordo com a localização dos receptores nas células e tecidos (Dubocovich *et al.*, 2005; Hardeland *et al.*, 2009).

Os receptores MT1 e MT2 são encontrados em diversos locais (como retina, diversas áreas do cérebro, nas vasculaturas cerebrais e periféricas, glândula harderiana, órgãos reprodutivos e córtex da adrenal), sendo estes os responsáveis pelos efeitos cronobióticos que ocorrem nos núcleos supraquiasmáticos (NSQ) (Hunt *et al.*, 2001; Poirel *et al.*, 2003; Dubocovitch *et al.*, 2005).

Um receptor para a melatonina homólogo a enzima quinona redutase 2 (QR2), pode ser encontrado no citoplasma das células, denominado *MT3*, e está envolvido na proteção contra o estresse oxidativo celular, e também com o processo de rolamento e adesão de neutrófilos ao endotélio, onde a ativação de MT2 e *MT3* são necessários para inibir estes efeitos, respectivamente (Nosjean *et al.*, 2000; Lotufo *et al.*, 2001).

Além dos receptores de membrana e citoplasmático, foi postulado que a melatonina poderia interagir com receptores intranucleares, especificamente os receptores órfãos de retinóides (RZR/ROR alfa), porém estes dados não foram confirmados empiricamente, havendo uma retratação pelos autores por não ser possível replicar todos os dados experimentalmente, tornando imprecisa a afirmação de que a melatonina se liga de fato a tais receptores nucleares (Becker-Andre *et al.*, 1994, 1997). Posteriormente foi observado que a melatonina se liga, de fato, em algum local do núcleo de células imunocompetentes circulantes, e por ensaios de *"binding"* foi possível especular que estes pontos onde a melatonina se liga no núcleo sejam os

receptores RZR/ROR, e que esta atuação da melatonina contribui na modulação da produção de IL-2 e IL-6 (Garcia-Mauriño *et al.*, 1998).

Ao atuar como um antioxidante, a melatonina pode reagir diretamente com moléculas reativas (radicais livres, ROS e RNS) formando metabólitos como o N-acetil-N-formil-5-metoxi-quinuramina (AFMK), que é muitas vezes mais potente que a melatonina ao agir como um antioxidante, ou ainda interagindo com enzimas envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo, influenciando assim, o metabolismo de células imunocompetentes que estão em atividade, podendo afetar o processo de fagocitose (Tan *et al.*, 2007; Bilitewski *et al.*, 2008).

A confirmação de que células imunocompetentes são capazes de sintetizar melatonina quando ativadas, e em grandes quantidades, abriu uma nova perspectiva de como esta pode atuar sobre o sistema imunológico, indo além do caráter cronobiótico da melatonina sintetizada pela pineal (Martins *et al.*, 2004; Carrilo-Vico, *et al.*, 2004; Pontes *et al.*, 2006; Maldonado *et al.*, 2009). Talvez a principal informação embutida nestes dados seja de que as células imunocompetentes produzem melatonina quando ativadas por algum mitógeno, como a fitohemaglutinina, ou ainda por um imunógeno, como zimosan opsonizado, uma bactéria, LPS isolado ou soro de animais com tumor (Martins *et al.*, 2004; Carrilo-Vico *et al.*, 2004; Pontes *et al.*, 2006).

Como pontuado anteriormente, a melatonina é capaz de estimular a síntese de IL-2, IL-6, e IFN-γ em células mononucleares do sangue periférico humano em ensaios *ex vivo* (Garcia-Mauriño *et al.*, 1997, 1998), o que demonstra uma atividade relacionada ao processo pró-inflamatório, visto que todas estas moléculas estão envolvidas com a montagem e manutenção de um processo inflamatório. Como

citado anteriormente, foi observado também que a melatonina é capaz de inibir o rolamento e adesão de neutrófilos ao endotélio de ratos (Lotufo *et al.*, 2001), o que sugere também uma atuação que iria contra o processo de montagem de uma resposta inflamatória.

Grande variedade de atuações da melatonina no sistema imunológico está documentada na literatura, como a atividade de quimiotaxia que a melatonina exibe em leucócitos humanos (Pena *et al.*, 2007), ou ainda a capacidade de inibir a via NFKB, principal via envolvida na resposta inflamatória (Alonso *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008; Marino *et al.*, 2009; Tamura *et al.*, 2009), além das ações já citadas.

O conjunto destas informações demonstra que os efeitos que a melatonina apresenta são muito amplos, e ainda pouco elucidados. Mas fica evidenciado que as ações desta indolamina são tecido-específicas, célula-específicas e dependentes da concentração de melatonina no sistema.

Produção de Melatonina pela Glândula Pineal

A via biossintética de melatonina na glândula pineal ocorre a partir do triptofano captado na circulação, sendo este convertido em serotonina e posteriormente em N-acetilserotonina (NAS) pela enzima alril-alquil-N-acetil-transferase (AA-NAT), a molécula de NAS é então convertida à melatonina pela enzima hidroxi-indol-O-metil-transferase (HIOMT) (figura 4). A enzima AA-NAT é chave para o controle da síntese, enquanto a HIOMT é o passo limitante da via, por ser a enzima de atividade mais lenta. A síntese noturna de melatonina em mamíferos é resultante da ativação de adrenoceptores β, induzida por noradrenalina liberada na

fase de escuro por vias de aferência oriundas do NSQ. No rato ocorre aumento da expressão do gene e o aumento da atividade da enzima AA-NAT, enquanto no homem esta enzima é constitutivamente expressa e, durante a noite, há um aumento de 100 vezes da atividade enzimática. A indução da transcrição gênica ocorre por ligação de CREB-fosforilado (de "*cAMP response element-binding*") a elementos regulados por CRE (de "*cAMP response elements*") localizados no promotor do gene, enquanto a ativação enzimática é decorrente da fosforilação da proteína 14-3-3 ligada a AA-NAT por proteína quinase dependente de AMPc (PKA) (Simonneaux e Ribelayga, 2003). Em linfócitos humanos circulantes, a presença das enzimas AA-NAT e HIOMT foi confirmada em grupos controle e em grupos estimulados (Carrilo-Vico *et al.*, 2004).

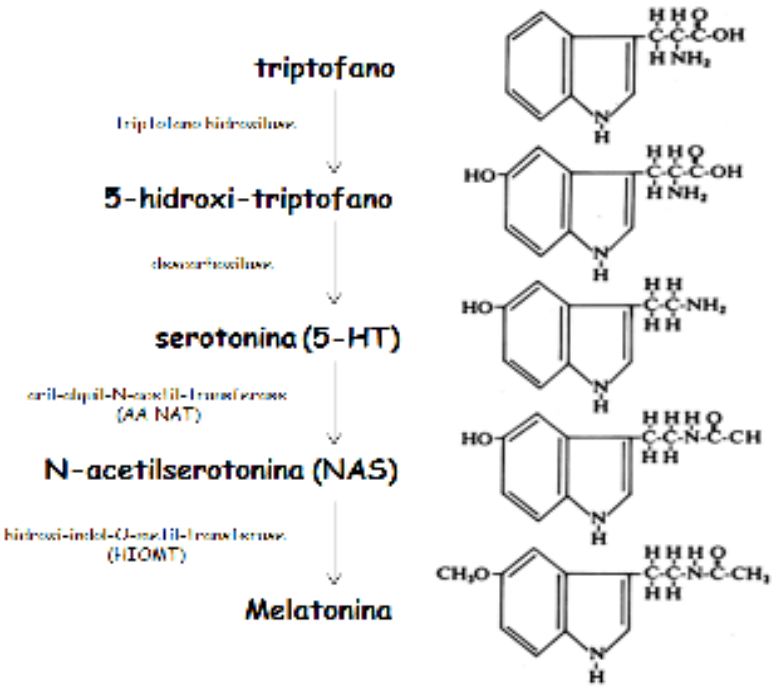

Figura 3 - Via biossintética da melatonina. Etapas da via de síntese da melatonina à partir do triptofano, e as enzimas envolvidas nesta via biossintética.

Produção Extra-pineal de Melatonina

Dados de Pontes e colaboradores (2006) demonstraram a produção de melatonina por fagócitos do colostro humano quando ativados com zimosan opsonizado com imunoglobulina A (IgA) ou EPEC (*Escherichia coli* enteropatogênica), observando que após a morte das bactérias, a produção de melatonina cessava. Isto foi revertido com utilização do zimosan, que por ser uma partícula inerte, não é degradada, e assim foi verificado que a produção de melatonina se mantinha contínua após atingir um platô, como pode ser visto na figura 4.

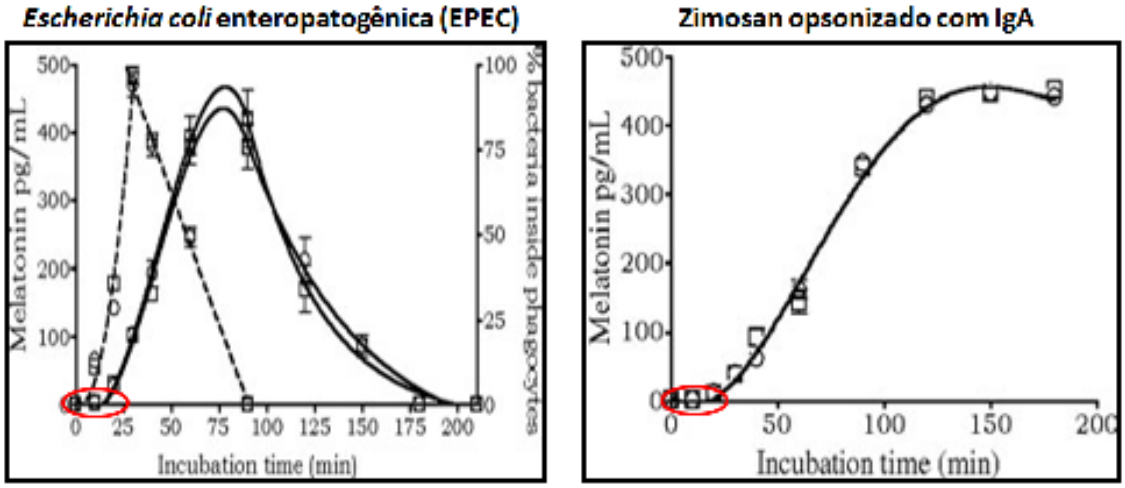

Figura 4 – Produção de melatonina por células mono e polimorfonucleares do colostro humano, mediante ativação com EPEC ou zimosan opsonizado com IgA. No detalhe, em vermelho, é indicado que a síntese de melatonina por estas células ocorre apenas após ativação, sem ter um nível basal inicial (EPEC, *Escherichia coli* Enteropatogênica). Adaptado de Pontes e cols (2006).

Em macrófagos peritoneais de ratos ativados com LPS ou soro de ratos com tumor, foi observada também a produção de melatonina e aumento da atividade da

enzima AA-NAT (Martins *et al.*, 2004). Em linfócitos circulantes humanos Carrilo-Vico e colaboradores. (2004), verificaram a produção de melatonina em cultura de células ativadas com fitohemaglutinina (PHA) e também em grupos controle.

O sistema imunológico é uma fonte importante de melatonina que atua localmente, e outros pontos de síntese de melatonina que apresentam uma atuação pontual desta, são: o trato digestório (Chau *et al.*, 2008); a retina e corpo ciliar (Martin *et al.*, 1992; Faillace *et al.*, 1995; Abe *et al.*, 1999); glândula harderiana (Menendez-Pelaez *et al.*, 1987); cérebro (Stefulj *et al.*, 2001); epitélio respiratório (Kvetnoy 1999); medula óssea (Tan *et al.*, 1999; Conti *et al.*, 2000); placenta (Iwazaki *et al.*, 2005); timo, baço e rins (Sanchez-Hidalgo *et al.*, 2009); ovário e testículos (Tijmes *et al.*, 1996; Itoh *et al.*, 1999); e pele (Fischer *et al.*, 2006).

Em todos os sítios mencionados, foi encontrada melatonina e/ou enzimas envolvidas em sua via biossintética, demonstrando que este hormônio é sintetizado em vários locais dos organismos, além de possuir uma ação local em cada um destes sítios. Mais do que isso, isto demonstra também que existe uma produção de melatonina não-rítmica, desvinculando a melatonina de uma função apenas cronobiótica.

O Eixo Imune-Pineal

O presente trabalho está inserido dentro de uma hipótese de trabalho que propõe a existência de um eixo Imune-Pineal.

Foi verificado que a melatonina noturna é capaz de atuar sobre processos crônicos de inflamação, como por exemplo, edema de pata em camundongos induzido por BCG (Bacilo Calmette-Guerín) (Lopes *et al.*, 1997), ou na própria montagem de uma resposta inflamatória, ao inibir a interação entre neutrófilos e endotélio de ratos induzida por leucotrieno B4 (Lotufo *et al.*, 2006).

A corticosterona, um hormônio relacionado a situações de estresse e atividade antiinflamatória, é capaz de modular positivamente a síntese de melatonina na glândula pineal (Ferreira *et al.*, 2005), assim como a citocina pró-inflamatória TNF, é capaz de inibir esta síntese (Fernandes *et al.*, 2006).

Estes dados demonstram que a atividade da glândula pineal está envolvida também com processos relacionados à ação do sistema imunológico, tendo a síntese de seu principal hormônio modulada por alterações na condição imunológica do organismo.

A constatação de que células imunocompetentes ativadas produzem melatonina (Carrilo-Vico *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2004; Pontes *et al.*, 2006), coincidindo com a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF, que é liberado na circulação para sinalizar um processo inflamatório, mostra um sistema onde as células imunocompetentes geram um sinalizador que inibe a produção pineal de melatonina, ao mesmo tempo em que estas passam a produzir este hormônio, que irá atuar na montagem de uma inflamação e também em seu

andamento (Morrey *et al.*, 1994; Garcia-Mauriño *et al.*, 1997; Garcia-Mauriño *et al.*, 1998; Benitez-King *et al.*, 2001; Soto-Vega *et al.*, 2004; Pena *et al.*, 2007).

Um dado que evidencia a supressão transiente da síntese de melatonina pela glândula pineal é a ausência de ritmo noturno de melatonina no colostro de mães que realizaram parto cesariano. Durante todo o período em que havia ausência de ritmo noturno de melatonina, a citocina TNF estava presente no colostro destas mães, e após 15 a 20 dias do parto, havia um retorno do ritmo noturno de melatonina conjuntamente com o desaparecimento de TNF no leite (Pontes *et al.*, 2007)

A constatação de que TNF é capaz de inibir a síntese de melatonina na glândula pineal (ativando NFKB) (Fernandes *et al.*, 2006), em conjunto com o fenômeno de células imunocompetentes ao estarem ativadas, produzirem melatonina, permite a formulação de todo um conceito teórico que justifica uma efetiva abordagem empírica.

Tomados em conjunto, os dados até agora apresentados demonstram que a atividade pineal está envolvida com diversos mecanismos de defesa, sendo capaz de atuar como um sensor para sinais liberados na circulação em condições de infecção, trauma ou estresse (Ferreira *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2006; Couto-Moraes *et al.*, 2009; Cecon *et al.*, 2010; Cruz-Machado *et al.*, 2010). E também que através da melatonina liberada pela glândula pineal, ocorre uma sinalização para a periferia, modulando o andamento de eventos relacionados ao sistema de defesa de mamíferos.

OBJETIVOS

- Verificar a produção de melatonina em células mononucleares do colostro humano ativadas com zimosan puro, ou opsonizado com IgA
- Determinar se a via NFKB estaria envolvida na síntese de melatonina por estas células
- Avaliar uma possível atuação da melatonina no processo de fagocitose de zimosan por células mononucleares do colostro humano

DISCUSSÃO

Células imunocompetentes são células produtoras de melatonina em estado basal ou quando ativadas. Esta melatonina tem efeito parácrino e autócrino em células mononucleares do sangue ao modular a síntese de citocinas como IL-2 e IFNγ, ou ainda atuando como um fator quimiotáxico para leucócitos, demonstrando que células imunocompetentes são alvos desta indolamina (Garcia-Mauriño *et al.*, 1997, 1998; Carrilo-Vico *et al.*, 2004; Martins *et al.*,2004; Pontes *et al.*, 2006; Peña *et al.*, 2007).

A produção de melatonina extra-pineal, como citado anteriormente, ocorre em diversos tecidos e órgãos, majoritariamente desvinculada do caráter cronobiótico observado na glândula pineal. Dentre os tecidos e células que produzem esta indolamina, as células imunocompetentes se mostram uma importante fonte de melatonina. Quando estimulados, os fagócitos presentes no colostro humano iniciam esta síntese, e esta é encerrada assim que o estímulo é eliminado (no caso, bactérias gram-negativas EPEC) ou se mantém, quando a partícula inerte zimosan é incubada com estas células (Pontes *et al.*, 2006). Células mononucleares circulantes do sangue de humanos também produzem melatonina em condições basais, havendo um aumento nesta produção quando um estímulo mitogênico é adicionado (Carrilo-Vico, *et al.*, 2004).

Em ratos, já foi descrita a síntese de melatonina por macrófagos peritoneais e mastócitos circulantes, onde estas células apresentavam uma síntese basal com um aumento desta produção mediante estímulo (Martins *et al.*, 2004; Maldonado *et al.*, 2009).

A atuação da melatonina produzida por células imunocompetentes está sendo analisada por diversos grupos, com diferentes enfoques, mas sabe-se que a atuação

parácrina da melatonina é diferente da atuação endócrina, liberada pela glândula pineal durante a fase de escuro. A melatonina produzida pela glândula pineal é responsável principalmente pela sinalização do ciclo claro-escuro ambiental (Simonneaux e Ribelayga, 2003), porém esta também pode atuar sobre o sistema imunológico, sendo capaz de impedir a montagem de uma resposta inflamatória ao inibir o rolamento e adesão de neutrófilos ao endotélio na microcirculação de ratos (Lotufo *et al.*, 2001). Esta ação endócrina seria, inclusive, quase oposta ao que foi observado em outros trabalhos, onde a melatonina poderia induzir a síntese de citocinas inflamatórias em leucócitos, ou mesmo ser um fator quimiotáxico positivo. Neste contexto, seria possível supor que a melatonina noturna desempenharia um papel antiinflamatório, e que a melatonina produzida por células imunocompetentes atuaria favorecendo o processo inflamatório.

Um ponto fundamental para determinar como a melatonina vai atuar sobre certos tecidos ou grupos celulares é a concentração desta indolamina no sistema. A concentração plasmática de melatonina durante a noite varia de 10 a 60 pg/mL, em humanos, mas pode alcançar concentrações mais elevadas em outros tecidos e fluidos corporais, como no trato digestório, bile ou fluido cérebro-espinal (Bubenik *et al.*, 2002; Konturek *et al.*, 2007; Koppisetti *et al.*, 2008; Leston *et al.*, 2010).

A concentração de melatonina é fundamental para determinar seu efeito. A maior parte das funções anti-oxidantes da melatonina ocorre em concentrações elevadas, na ordem de μM e mM (Silva *et al.*, 2005), assim como efeitos bactericidas e bacteriostáticos diretos que estão relacionados à sua ação anti-oxidante (Tekbas *et al.*, 2007). Foram relatados efeitos em concentrações mais baixas sobre células imunocompetentes (pM), como a ativação de monócitos e produção de IL-1 (α e β) e

ROS; a capacidade de atuar como um fator quimiotáxico (nM); ou aumentar a fosforilação da calmodulina em células epiteliais MDCK (pM a μM) (Morrey *et al.*, 1994; Soto-Vega *et al.*, 2004; Peña *et al.*, 2007). É interessante observar que altas concentrações de melatonina também têm efeito sobre células imunocompetentes, como a ativação de caspase-3 em células HL-60 (linhagem de células premielocíticas originadas de pacientes humanos com leucemia premielocítica aguda) com 1 mM, enquanto concentrações de 1 nM a 1 μM não surtiram efeito (Bejarano *et al.*, 2009).

Na qualidade de produtoras de melatonina, foi observado que as células imunocompetentes iniciam ou aumentam a produção desta indolamina quando estimuladas por agentes que sinalizem perigo, como o zimosan ou EPEC, ou ainda compostos que induzam uma atividade mitogênica, como o PHA.

Independente da origem da melatonina, esta apresenta efeitos antioxidantes e protetores para os tecidos (Reiter *et al.*, 2000), e poderia se esperar que este efeito também aconteça sobre a célula de defesa. A melatonina, quando presente na área onde neutrófilos se encontram em atividade, seria capaz por exemplo, de proteger o tecido circunvizinho dos produtos que estas células liberam no meio extracelular após eliminar microorganismos e células infectadas (Janeway *et al.*, 2001), e ao mesmo tempo, ficaria a questão, se ela poderia atuar positivamente sobre o processo inflamatório.

Sendo a fagocitose um processo bastante conhecido e altamente relevante para a eliminação de agentes infecciosos, certamente o conhecimento dos mecanismos de ação pelos quais a melatonina poderia interferir neste processo, facilitaria a compreensão de como a melatonina produzida por células imunocompetentes ativadas atuaria de forma positiva no processo inflamatório.

Já se encontra descrito na literatura que a fagocitose do zimosan por fagócitos do colostro humano, a exemplo do que ocorre com *E.coli*, induz produção de melatonina (Pontes *et al*., 2006). Portanto, o uso deste agente inerte é interessante para averiguar o efeito da melatonina sobre a fagocitose. O zimosan é uma partícula capaz de ativar diversos receptores de membrana encontrados em fagócitos. Estes receptores são os receptores TLR 2 e/ou 6, que geram uma sinalização indutora da reposta inflamatória, ou os receptores para fagocitose dectina-1 e receptores de manose (Akira et al., 2004; Ikeda et al., 2008). Quando este zimosan é opsonizado com IgA, ele passa a ser reconhecido também pelo receptor FcαRI/CD 89 (Jacob *et al*., 2008; Honório-França *et al*., 2004).

Os receptores mencionados são capazes de ativar a via de transdução de sinal NFKB, que é a principal via de sinalização envolvida com a resposta inflamatória (Kawai e Akira, 2005, 2007; Franchi *et al*., 2008; Ruland, 2008).

Mediante ativação, a via NFKB apresenta um decurso temporal de atividade que varia com a célula ou tecido analisado (Bosson *et al*., 2009; Kellermann *et al*., 2009; Collado-Romero *et al*., 2010; Flister *et al*., 2010). Nosso grupo demonstrou que existe uma ativação transiente do NFKB em glândulas pineais de ratos em cultura, assim como um ritmo endógeno de atividade na glândula (Cecon *et al*., 2010; Cruz-Machado *et al*., 2010), e no presente trabalho pudemos observar esta localização transiente do NFKB no núcleo das células mononucleares do colostro humano.

Com um tempo curto de tratamento com zimosan (ZNO ou ZOP) observamos a presença das subunidades p50, Rel A e c-Rel no núcleo das células MN, e em noventa minutos, a Rel A se encontrava abaixo do que observado no controle. Em noventa minutos experimentais não foram realizados ensaios para detectar a c-Rel, e

não pudemos traçar um decurso temporal da presença nuclear desta subunidade. A ativação da via NFKB é capaz de induzir a transcrição de diversos genes que variam de acordo com os grupos celulares e também com as subunidades componentes do dímero (Hayden e Ghosh, 2008). Entre os produtos gênicos induzidos pela via NFKB, encontra-se a proteína IKB, que após uma ativação inicial da via NFKB, passa a ter sua transcrição aumentada, um evento que atua como uma retroalimentação negativa da própria via, resultando no sequestro do dímero NFKB de volta ao citoplasma (Lee e Hannink, 2001), um evento que justifica o padrão transiente da presença nuclear do NFKB observada neste trabalho.

Poderíamos supor que a utilização dos bloqueadores da via NFKB (PDTC ou ALLN) não surtiu efeito na formação dos complexos observados nas células tratadas com ZNO por noventa minutos, mas a possibilidade de que ocorra o sequestro do dímero para o citoplasma através da proteína IKB, sugere que observamos esta translocação em um ponto onde a IKB já havia agido, e os níveis nucleares de NFKB já haviam retornado ao basal.

Ao observar as subunidades do NFKB, a quantidade da subunidade p50 no núcleo das células tratadas com ZOP por noventa minutos, está igual ao controle, diferentemente da Rel A, que está abaixo. Reforçando a idéia de que seria de se esperar que um mecanismo eficiente de controle da via exista, permitindo que esta seja rapidamente regulada, evitando desequilíbrio e potencial exacerbação de uma resposta inflamatória.

A presença da p50 no núcleo é um evento que em células imunocompetentes serviria para mantê-las preparadas para uma resposta, e que restringiria a produção de agentes inflamatórios apenas para situações de infecção, quando dímeros

contendo subunidades que possuem TAD seriam translocados para o núcleo e poderiam causar a expressão de genes relacionados à resposta inflamatória (Ghosh e Karin, 2002; Senftleben, 2003). Quando observamos que em noventa minutos de tratamento com ZOP, a Rel A se encontra em menores quantidades no núcleo do que no grupo controle, temos um indício de que a ativação dos MN com ZOP induz ativação de um dímero do NFKB que seria composto por subunidades que apresentam TAD, sendo capazes de promover a síntese não apenas de melatonina, e citocinas pró-inflamatórias (Hayden e Ghosh, 2008; Ruland, 2008), mas também do IKB (Lee e Hannink, 2001).

Detectamos a subunidade c-Rel e esta apresentou um complexo proteína-anticorpo mais deslocado no grupo tratado com ZOP quando comparado com ZNO, sugerindo que o receptor adicional ativado (FcαRI/CD89) poderia ser responsável por uma indução mais potente da translocação do dímero de NFKB composto por c-Rel. A cascata de sinalização utilizada por receptores FcαRI/CD89 envolvem a quinase SyK, e acabam por ativar a via NFKB, no entanto, uma caracterização mais específica das subunidades envolvidas nesta sinalização ainda não foi demonstrada (Launay *et al.*, 1998, Ruland, 2008).

A fagocitose de ZNO ou ZOP pelas células MN ativa a via NFKB, o que desencadeia a síntese de melatonina, e quando as células são pré-incubadas com PDTC ou ALLN, esta síntese é bloqueada.

A observação desta síntese de melatonina coincide com o trabalho de Pontes e cols. (2006), onde foi visto a produção de melatonina por fagócitos mononucleares e polimorfonucleares do colostro humano, quando ativados com zimosan opsonizado com IgA ou com EPEC. A produção de melatonina também foi observada em

linfócitos humanos em cultura, tanto nos tratados com PHA quanto nos mantidos em repouso. Foi detectada uma concentração basal de melatonina nos controles, e um aumento nas células induzidas à atividade proliferativa com o PHA (Carrilo-Vico *et al.*, 2004). Em macrófagos peritoneais de ratos, a produção de melatonina foi observada quando estes foram estimulados *in vitro* com LPS ou soro de ratos portadores de tumor. Nesta ocasião foi determinado o aumento da atividade da enzima AA-NAT nos grupos tratados com LPS ou soro, assim como foi visto que estas células têm uma síntese basal de melatonina (Martins *et al.*, 2004).

Em nosso modelo foi possível constatar que as células em estado quiescente não apresentam uma síntese basal de melatonina, diferindo dos trabalhos com células sanguíneas, onde foi observada a produção de melatonina no controle (Carrilo-Vico *et al.*, 2004). Possivelmente os macrófagos peritoneais de ratos já apresentam uma síntese basal de melatonina por estarem em um nível de atividade celular maior que as células encontradas no colostro, assim como os linfócitos mantidos em cultura.

A importância da via NFKB na produção de melatonina é um tema novo, e com poucos trabalhos na literatura. Nosso grupo tem demonstrado que a via NFKB modula a produção de melatonina na glândula pineal (Fernades *et al.*, 2006; Cecon *et al.*, 2010; Cruz-Machado *et al.*, 2010), seja em condições homeostáticas, ou com estimulação por mecanismos que envolvem uma ativação imunogênica. No presente trabalho apresentamos dados em que a produção de melatonina por células imunocompetentes está envolvida com a via NFKB, de maneira oposta ao observado na glândula pineal.

Os compostos PDTC e ALLN são utilizados para a inibição da atividade da via NFKB por mecanismos farmacológicos distintos em diferentes modelos, como em células imunocompetentes de linhagem murina ou células do endotélio humano (Wolchok *et al*., 1994; Zen *et al*., 1998; De Plaen *et al*., 2006). A pré-incubação com estes compostos causou diminuição do conteúdo de melatonina nos sobrenadantes de células mononucleares ativadas com ZNO ou ZOP, demonstrando a importância da via NFKB nesta síntese, e a menor redução observada nas células tratadas com ZOP na presença de PDTC ou ALLN deve-se, provavelmente, ao reforço na sinalização por NFKB gerado pela adição de um receptor (FcαRI/CD89) sendo ativado no sistema.

Observamos que a síntese de melatonina por células imunocompetentes do colostro é dependente da via NFKB, contrastando com o que foi observado na glândula pineal, onde a ativação de NFKB, com TNF ou LPS, resultou na inibição desta síntese. Estes trabalhos demonstraram também que na glândula pineal a ativação de NFKB induzia a translocação nuclear de dímeros p50/p50 e p50/Rel A (Fernandes *et al*., 2006; Cecon *et al*., 2010; Cruz-Machado *et al*., 2010).

O diferencial entre as células imunocompententes, e a glândula pineal, neste caso, é que observamos a presença da subunidade c-Rel do NFKB nas células ativadas, algo que não foi identificado em glândulas pineais. Assim como visto em outros trabalhos que correlacionam a via NFKB com a síntese de melatonina (Cecon *et al*., 2010; Cruz-Machado *et al*., 2010), detectamos também as subunidades p50 e Rel A nas células. Este pode ser um forte indício de que a translocação nuclear da subunidade c-Rel é responsável pela indução da síntese de melatonina na periferia.

Um ponto que nos foi possível analisar nesta oportunidade é qual seria uma das funções da melatonina produzida logo no início da resposta inflamatória. Analisamos o efeito que a melatonina exerce nas células mononucleares do colostro humano, sobre um parâmetro fundamental da resposta inflamatória, a fagocitose.

A quantidade de melatonina sintetizada por estas células é bastante robusta, e em um cenário de resposta inflamatória, a melatonina seria majoritariamente sintetizada no local da resposta e consumida ali mesmo, apontando um efeito direto da melatonina em células imunocompetentes.

Verificamos que a melatonina (1 nM) é capaz de potenciar a fagocitose de partículas de zimosan quando comparado com o veículo. Este é o primeiro trabalho que demonstra ser a melatonina capaz de facilitar o processo de fagocitose.

Muitos trabalhos demonstram que um dos fatores mais importantes na ocorrência e manutenção do processo de fagocitose, é a atividade de enzimas dependentes do íon Ca^{2+}, como a calmodulina, a PKCα, e a proteína MARCKS, que é o principal substrato de atuação da PKCα. Todas estas proteínas estão diretamente ligadas ao processo de polimerização da actina, responsável pela ingestão da partícula e maturação do fagossomo (Hartwig *et al.*, 1992; Brumell *et al.*, 1995; Mandeville e Maxfield, 1996; Colombo *et al.*, 1997; Kim-Park *et al.*, 1997; Peters e Mayer, 1998; Mills *et al.*, 2001; Soto-Veja *et al.*, 2004). Alguns trabalhos demonstram que a melatonina pode atuar sobre a PKCα, aumentando a atividade da proteína MARCKS, assim como interagindo com a calmodulina causando sua fosforilação, o que reduz sua ligação a íons Ca^{2+} e permite que haja maior disponibilidade deste íon para o processo de fagocitose (Benitez-King *et al.*, 2001; Soto-Vega *et al.*, 2004).

Portanto, o controle da atividade da PKCα por melatonina poderia ser um dos mecanismos envolvidos no aumento da fagocitose mediada por melatonina.

Outra possibilidade seria a melatonina atuar sobre receptores de melatonina MT1 ou MT2 que estivessem ligados a uma proteína Gq, capaz de ativar inositol-trifosfato (IP3), e consequentemente aumentar a concentração de Ca^{2+} intracelular.

O aumento de melatonina no local de uma infecção sempre foi considerado um fator antiinflamatório por minimizar os efeitos deletérios de espécies reativas, porém, a observação de que a melatonina seria capaz de induzir a formação de ROS intracelular em leucócitos normais e tumorais de humanos via interação com a calmodulina, e que este aumento de ROS não seria capaz de gerar um quadro de estresse oxidativo celular (Radogna *et al.*, 2009a, 2009b), poderia justificar em conjunto com os dados aqui apresentados, como a melatonina produzida por células imunocompetentes ativadas por um estímulo imunogênico poderia atuar de forma positiva sobre a montagem e andamento de um processo inflamatório. Ao mesmo tempo em que aumenta as ROS intracelulares, o que potencia o processo de fagocitose e a eliminação de patógenos fagocitados, ela atuaria como um anti-oxidante no meio extra-celular, protegendo os tecidos adjacentes dos resquícios do combate inicial à uma infecção.

CONCLUSÕES

1) Células mononucleares do colostro humano são capazes de produzir melatonina mediante ativação com zimosan puro, ou opsonizado com imunoglabulina A.

2) A incubação destas células com zimosan induz a atividade da via de transdução nuclear NFKB.

3) A síntese de melatonina é desencadeada pela ativação destas células, e é dependente da via NFKB.

4) Nas células mononucleares do colostro humano, estão presentes as subunidades p50, Rel A e c-Rel. Sendo que a c-Rel só se encontra no núcleo quando as células estão ativadas.

5) A melatonina potencia a fagocitose de partículas de zimosan.

A produção de melatonina por fagócitos mononucleares do colostro é desencadeada pela incubação destas células com zimosan, opsonizado ou não, sendo mediada pela via de transdução de sinal NFKB.

Nestas células observamos um diferencial com as células da glândula pineal, pois nos fagócitos mononucleares do colostro humano a ativação da via NFKB induz a síntese de melatonina, sendo o contrário do observado na glândula pineal. Entretanto, verificamos que neste modelo uma subunidade que compõem o dímero NFKB, a c-Rel, está presente, mas ausente na pineal, embasando a hipótese de que esta subunidade é a responsável pela indução da síntese de melatonina.

Esta melatonina seria importante para acelerar o processo de fagocitose ao mesmo tempo em que reduz o estresse oxidativo sobre o tecido vizinho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE M., ITOH M.T., MIYATA M., ISHIKAWA S., SUMI Y. (1999). Detection of melatonin, its precursors and related enzyme activities in rabbit lens. *Exp Eye Res*. 68(2): 255-62.

ADEREM A. (2004). Phagocytosis and the inflammatory response. *Allergy Asthma Proc*. 25(5): 297-304.

AKIRA S. & TAKEDA K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 4(7): 499-511.

ALLEN L.H. & ADEREM A. (1995). A role for MARCKS, the alpha isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. *J Exp Med*. 182(3): 829-40.

ALONSO M., COLLADO P.S., GONZÁLEZ-GALLEGO J. (2006). Melatonin inhibits the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase and nuclear factor kappa B activation in rat skeletal muscle. *J Pineal Res*. 41(1): 8-14.

ARNAO M.B., HERNÁNDEZ-RUIZ J. (2006). The physiological function of melatonin in plants. *Plant Signal Behav*. 1(3): 89-95.

BAKEMA J.E., DE HAIJ S., DEN HARTOG-JAGER C.F., BAKKER J., VIDARSSON G., VAN EGMOND M., VAN DE WINKEL J.G., LEUSEN J.H. (2006). Signaling through mutants of the IgA receptor CD89 and consequences for Fc receptor gamma-chain interaction. *J Immunol*. 176(6): 3603-10.

BECKER-ANDRÉ M., WIESENBERG I., SCHAEREN-WIEMERS N., ANDRÉ E., MISSBACH M., SAURAT J.H., CARLBERG C. (1997). Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem*. 269(46): 28531-4. Erratum in: *J Biol Chem* (1997) 272(26): 16707.

BEJARANO I., REDONDO P.C., ESPINO J., ROSADO J.A., PAREDES S.D., BARRIGA C., REITER R.J., PARIENTE J.A., RODRÍGUEZ A.B. (2009). Melatonin induces mitochondrial-mediated apoptosis in human myeloid HL-60 cells. *J Pineal Res*. 46(4):392-400.

BENÍTEZ-KING G., HERNÁNDEZ M.E., TOVAR R., RAMÍREZ G. (2001). Melatonin activates PKC-alpha but not PKC-epsilon in N1E-115 cells. *Neurochem Int*. 39(2): 95-102.

BEUTLER B.A. (2009). Microbe sensing, positive feedback loops, and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Immunol Rev*. 227(1): 248-63.

BEUTLER B.A. (2009). TLRs and innate immunity. *Blood*. 113(7): 1399-407.

BILITEWSKI U. (2008). Determination of immunomodulatory effects: focus on functional analysis of phagocytes as representatives of the innate immune system. *Anal Bioanal Chem*. 391(5): 1545-54.

BORTOLUCI K.R., MEDZHITOV R. (2010). Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of TLR and NLR. *Cell Mol Life Sci*. 67(10): 1643-51.

BOSSON J., BLOMBERG A., POURAZAR J., MUDWAY I.S., FREW A.J., KELLY F.J., SANDSTRÖM T. (2009). Early suppression of NFkappaB and IL-8 in bronchial epithelium after ozone exposure in healthy human subjects. *Inhal Toxicol*. 21(11): 913-9.

BOYMAN O., LÉTOURNEAU S., KRIEG C., SPRENT J. (2009). Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells. *Eur J Immunol*. 39(8): 2088-94.

BROWN G.D., HERRE J., WILLIAMS D.L., WILLMENT J.A., MARSHALL A.S., GORDON S. (2006). Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med*. 197(9): 1119-24.

BRUMELL J.H., VOLCHUK A., SENGELOV H., BORREGAARD N., CIEUTAT A.M., BAINTON D.F., GRINSTEIN S., KLIP A. (1995). Subcellular distribution of docking/fusion proteins in neutrophils, secretory cells with multiple exocytic compartments. *J Immunol*. 155(12): 5750-9.

BUBENIK G.A. (2002). Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig Dis Sci*. 47(10): 2336-48.

CALIL V.M.L.T., LEONE C.L., RAMOS J.L.A. (1991) Nutritional composition of colostrum from mothers delivering term infants appropriate or small for gestational age. II - Nutritional composition of human milk at different lactation phases and its advantages over cow's milk. Revisões e Ensaios. Parte da dissertação de mestrado de CALIL V.M.L.T.

CARLSSON B., HANSON L.A. (1994). Immunologic effects of breast-feeding on the infant. In: OGRA P., LAMM M.E., STROBER W., MCGHEE J.R., BIENESTOCK J., editors. *Handbook of Mucosal Immunology*. London: Academic Press; 653-66.

CARRILLO-VICO A., CALVO J.R., ABREU P., LARDONE P.J., GARCIA-MAURINO S., REITER R.J., GUERRERO J.M (2004). Evidence of melatonin synthesis by

human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J*. 18(3): 537-539.

CECON E., FERNANDES P.A., PINATO L., FERREIRA Z.S., MARKUS R.P. (2010). Daily variation of constitutively activated nuclear factor kappa B (NFKB) in rat pineal gland. *Chronobiol Int*. 27(1): 52-67.

CHAU R.M., PATEL B.A. (2009). Determination of serotonin, melatonin and metabolites in gastrointestinal tissue using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Biomed Chromatogr*. 23(2): 175-81.

COLLADO-ROMERO M., ARCE C., RAMÍREZ-BOO M., CARVAJAL A., GARRIDO J.J. (2009). Quantitative analysis of the immune response upon Salmonella typhimurium infection along the porcine intestinal gut. *Vet Res*. 41(2): 23.

COLOMBO M.I., BERON W., STAHL P.D. (1997). Calmodulin regulates endosome fusion. *J Biol Chem*. 272(12): 7707-12.

CONTI A., CONCONI S., HERTENS E., SKWARLO-SONTA K., MARKOWSKA M., MAESTRONI J.M. (2000). Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res*. 28(4): 193-202.

COUTO-MORAES R., PALERMO-NETO J., MARKUS R.P. (2009). The immune-pineal axis: stress as a modulator of pineal gland function. *Ann N Y Acad Sci*. 1153: 193-202.

CRUZ-MACHADO S.S., CARVALHO-SOUSA C. E., TAMURA E. K., PINATO L., CECON E., FERNANDES P.A., AVELLAR M.C.W., FERREIRA Z.S., MARKUS R.P. (2010). TLR 4 and CD 14 receptors expressed in rat pineal gland triggers NFKB pathway. *J Pineal Res*. [no prelo]

DE PLAEN I.G., HAN X.B., LIU X., HSUEH W., GHOSH S., MAY M.J. (2006). Lipopolysaccharide induces CXCL2/macrophage inflammatory protein-2 gene expression in enterocytes via NF-kappaB activation: independence from endogenous TNF-alpha and platelet-activating factor. *Immunology*. 118(2): 153-63.

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

FAILLACE M.P., CUTRERA R., SARMIENTO M.I., ROSENSTEIN R.E. (1995). Evidence for local synthesis of melatonin in golden hamster retina. *Neuroreport*. 6(15): 2093-5.

FERNANDES P.A., CECON E., MARKUS R.P., FERREIRA Z.S. (2006). 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*. 41(4): 344-50.

FERREIRA Z.S., FERNANDES P.A., DUMA D., ASSREUY J., AVELLAR M.C., MARKUS R.P. (2005). Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. *J Pineal Res*. 38(3): 182-8.

FISCHER T.W., SWEATMAN T.W., SEMAK I., SAYRE R.M., WORTSMAN J., SLOMINSKI A. (2006). Constitutive and UV-induced metabolism of melatonin in keratinocytes and cell-free systems. *FASEB J*. 20(9): 1564-6.

FLISTER M.J., WILBER A., HALL K.L., IWATA C., MIYAZONO K., NISATO R.E., PEPPER M.S., ZAWIEJA D.C., RAN S. (2010). Inflammation induces lymphangiogenesis through up-regulation of VEGFR-3 mediated by NF-kappaB and Prox1. *Blood*. 115(2): 418-29.

FRANCHI L., PARK J.H., SHAW M.H., MARINA-GARCIA N., CHEN G., KIM Y.G., NÚÑEZ G. (2008). Intracellular NOD-like receptors in innate immunity, infection and disease. *Cell Microbiol*. 10(1): 1-8.

GANTNER B.N., SIMMONS R.M., CANAVERA S.J., AKIRA S., UNDERHILL D.M. (2003). Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med*. 197(9): 1107-17.

GARCIA-MAURIÑO S., GONZALEZ-HABA M.G., CALVO J.R., RAFII-EL-LDRISSI M., SANCHEZ-MARGALET V., COBERNA R., GUERRERO J.M. (1997). Melatonin Enhances IL-2, IL-6, and IFN-y Production by Human Circulating CD 4+ Cells - A Possible Nuclear Receptor-Mediated Mechanism Involving T Helper Type 1 Lymphocytes and Monocytes. *J Immunol*. 159: 574-581.

GARCIA-MAURIÑO S., GONZALEZ-HABA M.G., CALVO J.R., GOBERNA R., GUERRERO J.M. (1998). Involvement of nuclear binding sites for melatonin in the regulation of IL-2 and IL-6 production by human blood mononuclear cells. *J Neuroimmunol*. 92(1-2): 76-84.

GHOSH S. & KARIN M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*. 109 Suppl: S81-96.

GOLDMAN A.S. (1993). The immune system of human milk: antimicrobial, antiinflammatory and immunomodulating properties. *Pediatr Infect Dis J*. 12: 664-74.

HAAS M., PAGE S., PAGE M., NEUMANN F.J., MARX N., ADAM M., ZIEGLER-HEITBROCK H.W., NEUMEIER D., BRAND K. (1998). Effect of proteasome

inhibitors on monocytic IkappaB-alpha and -beta depletion, NF-kappaB activation, and cytokine production. *J Leukoc Biol*. 63(3): 395-404.

HARDELAND R., TAN D.X., REITER R.J. (2009). Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. *J Pineal Res*. 47(2): 109-26.

HARTWIG J.H., THELEN M., ROSEN A., JANMEY P.A., NAIRN A.C., ADEREM A. (1992). MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature*. 356(6370): 618-22.

HAYDEN M.S., GHOSH S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 132(3): 344-62.

HONÓRIO-FRANÇA A.C., CARVALHO M.P.S.M., ISSAC L., TRABULSI L.R., CARNEIRO-SAMPAIO M.M.S. (1997). Colostral mononuclear phagocytes are able to kill Enteropathogenic Escherichia coli opsonized with colostral IgA. *Scandinavian J Immunol*. 46: 59-66.

HONORIO-FRANÇA A.C., LAUNAY P., CARNEIRO-SAMPAIO M.M., MONTEIRO R.C. (2001). Colostral neutrophils express Fc alpha receptors (CD89) lacking gamma chain association and mediate noninflammatory properties of secretory IgA. *J Leukoc Biol*. 69(2): 289-96.

HUANG S.H., CAO X.J., WEI W. (2008). Melatonin decreases TLR3-mediated inflammatory factor expression via inhibition of NF-kappa B activation in respiratory syncytial virus-infected RAW264.7 macrophages. *J Pineal Res*. 45(1): 93-100.

HUNT A.E., AL-GHOUL W.M., GILLETTE M.U., DUBOCOVICH M.L. (2001). Activation of MT(2) melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. *Am J Physiol Cell Physiol*. Jan;280(1): C110-8.

IKEDA Y., ADACHI Y., ISHII T., MIURA N., TAMURA H., OHNO N. (2008). Dissociation of Toll-like receptor 2-mediated innate immune response to Zymosan by organic solvent-treatment without loss of Dectin-1 reactivity. *Biol Pharm Bull*. 31: 13-8.

ITOH M.T., ISHIZUKA B., KURIBAYASHI Y., AMEMIYA A., SUMI Y. (1999). Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. *Mol Hum Reprod*. 5(5): 402-8.

IWASAKI A. & MEDZHITOV R. (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 327(5963): 291-5.

IWASAKI S., NAKAZAWA K., SAKAI J., KOMETANI K., IWASHITA M., YOSHIMURA Y., MARUYAMA J. (2005). Melatonin as a local regulator of human placental function. *J Pineal Res*. 39(3): 261-5.

JACOB C.M., PASTORINO A.C., FAHL K., CARNEIRO-SAMPAIO M., MONTEIRO R.C. (2008). Autoimmunity in IgA deficiency: revisiting the role of IgA as a silent housekeeper. *J Clin Immunol*, 1: 56-61.

JANEWAY C.A., TRAVERS P., WALPORT M.,SHLOMCHIK M. (2001). Innate Immunity: The front line of host defense. In: *Immunobiology: The immune system in health and disease.* New York, Garland Science, Inc., **5th ed**., pp. 35 - 91.

JIANG Y., CHEN G., ZHENG Y., LU L., WU C., ZHANG Y., LIU Q., CAO X. (2008). TLR4 signaling induces functional nerve growth factor receptor p75NTR on

mouse dendritic cells via p38MAPK and NF-kappa B pathways. *Mol Immunol*. 45(6): 1557-66.

KATO K., HIRAI K., NISHIYAMA K., UCHIKAWA O., FUKATSU K., OHKAWA S., KAWAMATA Y., HINUMA S., MIYAMOTO M. (2005). Neurochemical properties of ramelteon (TAK-375), a selective MT1/MT2 receptor agonist. *Neuropharmacology*. 48(2): 301-10.

KAWAI T. & AKIRA S. (2005). Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Res Ther*. 7(1): 12-9.

KAWAI T. & AKIRA S. (2007). Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med*. 13(11): 460-9.

KELLERMANN K., GORDAN M.L., NOLLERT G., BLOBNER M., KOCHS E.F., JUNGWIRTH B. (2009). Long-term assessment of NFkappaB expression in the brain and neurologic outcome following deep hypothermic circulatory arrest in rats. *Perfusion*. 24(6): 429-36.

KIM-PARK W.K., MOORE M.A., HAKKI Z.W., KOWOLIK M.J. (1997). Activation of the neutrophil respiratory burst requires both intracellular and extracellular calcium. *Ann N Y Acad Sci*. 832: 394-404.

KLEIN D.C., WELLER J.L. (1970). INDOLE METABOLISM IN THE PINEAL GLAND: A CIRCADIAN RHYTHM IN N-ACETYLTRANSFERASE. *SCIENCE*. 169(950): 1093-5.

KOPPISETTI S., JENIGIRI B., TERRON M.P., TENGATTINI S., TAMURA H., FLORES L.J., TAN D.X., REITER R.J. (2008). Reactive oxygen species and the

hypomotility of the gall bladder as targets for the treatment of gallstones with melatonin: a review. *Dig Dis Sci*. 53(10): 2592-603.

KOLB A.F. (2001). The prospects of modifying the antimicrobial properties of milk. *Biotechnol Adv*. 19(4): 299-316.

KONTUREK S.J., KONTUREK P.C., BRZOZOWSKI T., BUBENIK G.A. (2007). Role of melatonin in upper gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol*. 58 Suppl 6: 23-52.

KUMAR H., KAWAI T., AKIRA S. (2009). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun*. 388(4): 621-5.

KVETNOY I.M. (1999). Extrapineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system. *Histochem J*. 31(1): 1-12.

LAUNAY P., LEHUEN A., KAWAKAMI T., BLANK U., MONTEIRO R.C. (1998). IgA Fc receptor (CD89) activation enables coupling to syk and Btk tyrosine kinase pathways: differential signaling after IFN-gamma or phorbol ester stimulation. *J Leukoc Biol*. 63(5): 636-42.

LEE S.H. & HANNINK M. (2001). The N-terminal nuclear export sequence of IkappaBalpha is required for RanGTP-dependent binding to CRM1. *J Biol Chem*. 276(26): 23599-606.

LESTON J., HARTHÉ C., BRUN J., MOTTOLESE C., MERTENS P., SINDOU M., CLAUSTRAT B. (2010). Melatonin is released in the third ventricle in humans. A study in movement disorders. *Neurosci Lett*. 469(3): 294-7.

LERNER, A.B., CASE, J.D. & HEINZELMAN, R.V. (1959). Structure of melatonin. *J Am Chem Soc*, 81, 6084.

LOPES C., DELYRA J.L., MARKUS R.P., MARIANO M. (1997). Circadian rhythm in experimental granulomatous inflammation is modulated by melatonin. *J Pineal Res*. 23(2): 72-8.

LOTUFO C.M., LOPES C., DUBOCOVICH M.L., FARSKY S.H., MARKUS R.P. (2001). Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur J Pharmacol*. 430(2-3): 351-7.

LOTUFO C.M., YAMASHITA C.E., FARSKY S.H., MARKUS R.P. (2006). Melatonin effect on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B4. *Eur J Pharmacol*. 534(1-3): 258-63.

LU Y.C., YEH W.C., OHASHI P.S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 42(2): 145-51.

MACPHERSON A.J., UHR T. (2004). Compartmentalization of the mucosal immune responses to commensal intestinal bacteria. *Ann N Y Acad Sci*. 1029: 36-43.

MALDONADO M.D., MORA-SANTOS M., NAJI L., CARRASCOSA-SALMORAL M.P., NARANJO M.C., CALVO J.R. (2009). Evidence of melatonin synthesis and release by mast cells. Possible modulatory role on inflammation. *Pharmacol Res*.

MANDEVILLE J.T., MAXFIELD F.R. (1996). Calcium and signal transduction in granulocytes. *Curr Opin Hematol*. 3(1): 63-70.

MARINO A., DI PAOLA R., CRISAFULLI C., MAZZON E., MORABITO R., PATERNITI I., GALUPPO M., GENOVESE T., LA SPADA G., CUZZOCREA S. (2009). Protective effect of melatonin against the inflammatory response elicited by crude venom from isolated nematocysts of Pelagia noctiluca (Cnidaria, Scyphozoa). *J Pineal Res*. 47(1): 56-69.

MARKUS R.P., FERREIRA Z.S., FERNANDES P.A, CECON E. (2007). The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *Neuroimmunomodulation*. 14: 126-33.

MARTIN X.D., MALINA H.Z., BRENNAN M.C., HENDRICKSON P.H., LICHTER P.R. (1992). The ciliary body--the third organ found to synthesize indoleamines in humans. *Eur J Ophthalmol*. 2(2): 67-72.

MARTINS E. JR., FERREIRA A.C., SKORUPA A.L., AFECHE S.C., CIPOLLA-NETO J., COSTA ROSA L.F. (2004). Tryptophan consumption and indoleamines production by peritoneal cavity macrophages. *J Leukoc Biol*. 75(6): 1116-21.

MENENDEZ-PELAEZ A., HOWES K.A., GONZALEZ-BRITO A., REITER R.J. (1987). N-acetyltransferase activity, hydroxyindole-O-methyltransferase activity, and melatonin levels in the Harderian glands of the female Syrian hamster: changes during the light:dark cycle and the effect of 6-parachlorophenylalanine administration. *Biochem Biophys Res Commun*. 145(3): 1231-8.

MILLS I.G., URBÉ S., CLAGUE M.J. (2001). Relationships between EEA1 binding partners and their role in endosome fusion. *J Cell Sci*. 114(10): 1959-65.

MIYAKE K. (2004). Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol*. 12(4): 186-92.

MORREY K.M., MCLACHLAN J.A., SERKIN C.D., BAKOUCHE O. (1994). Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. *J Immunol*. 153(6): 2671-80.

MOSSER D.M., EDWARDS J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 8(12): 958-69.

NEWMAN J. (1995). How breast milk protects newborns. *Sci. Am*. 273: 76-79.

NOSJEAN O., FERRO M., COGE F., BEAUVERGER P., HENLIN J.M., LEFOULON F., FAUCHERE J.L., DELAGRANGE P., CANET E., BOUTIN J.A. (2000). Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem*. 275(40): 31311-7.

OZINSKY A., UNDERHILL D.M., FONTENOT J.D., HAJJAR A.M., SMITH K.D., WILSON C.B., SCHROEDER L., ADEREM A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97(25): 13766-71.

PARKER D.C. & EYNON E.E. (1991). Antigen presentation in acquired immunological tolerance. *FASEB J*. 5(13): 2777-84.

PEÑA C., RINCON J., PEDREANEZ A., VIERA N., MOSQUERA J. (2007). Chemotactic effect of melatonin on leukocytes. *J Pineal Res*. 43(3): 263-9.

PETERS C., MAYER A. (1998). Ca^{2+}/calmodulin signals the completion of docking and triggers a late step of vacuole fusion. *Nature*. 396(6711): 575-80.

POIREL V.J., BOGGIO V., DARDENTE H., PEVET P., MASSON-PEVET M., GAUER F. (2003). Contrary to other non-photic cues, acute melatonin injection does not induce immediate changes of clock gene mRNA expression in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience*. 120(3): 745-55.

PONTES G.N., CARDOSO E.C., CARNEIRO-SAMPAIO M.M., MARKUS R.P. (2006). Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) - melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. *J Pineal Res*. 41: 136-141.

PONTES G.N., CARDOSO E.C., CARNEIRO-SAMPAIO M.M., MARKUS R.P. (2007). Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF-alpha increase after cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. *J Pineal Res*. 43(4): 365-71.

POZO D., GARCÍA-MAURIÑO S., GUERRERO J.M., CALVO J.R. (2004). mRNA expression of nuclear receptor RZR/RORalpha, melatonin membrane receptor MT, and hydroxindole-O-methyltransferase in different populations of human immune cells. *J Pineal Res*. 37(1): 48-54.

RADOGNA F., PATERNOSTER L., DE NICOLA M., CERELLA C., AMMENDOLA S., BEDINI A., TARZIA G., AQUILANO K., CIRIOLO M., GHIBELLI L. (2009). Rapid and transient stimulation of intracellular reactive oxygen species by melatonin in normal and tumor leukocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 239(1): 37-45.

RADOGNA F., SESTILI P., MARTINELLI C., PAOLILLO M., PATERNOSTER L., ALBERTINI M.C., ACCORSI A., GUALANDI G., GHIBELLI L. (2009). Lipoxygenase-mediated pro-radical effect of melatonin via stimulation of arachidonic acid metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol*. 238(2): 170-7.

REITER R.J. (1991). Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol*. 79(1-3): 153-8.

REITER R.J., CALVO J.R., KARBOWNIK M., QI W., TAN D.X. (2000). Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 917: 376-86.

ROBINSON J.M. (2009). Phagocytic leukocytes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol*. 131(4): 465-9.

RULAND J. (2008). CARD9 signaling in the innate immune response. *Ann N Y Acad Sci*. 1143: 35-44.

SANCHEZ-HIDALGO M., DE LA LASTRA C.A., CARRASCOSA-SALMORAL M.P., NARANJO M.C., GOMEZ-CORVERA A., CABALLERO B., GUERRERO J.M. (2009). Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. *Exp Gerontol*. 44(5): 328-34. 2009 Feb 20.

SENFTLEBEN U. (2003). NF-kappaB in critical diseases: a bad guy? *Intensive Care Med*. 29(11): 1873-6.

SIMONNEAUX V. e RIBELAYGA C. (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev*. 55: 325-95.

SILVA S.O., CARVALHO S.R., XIMENES V.F., OKADA S.S., CAMPA A. (2005). Melatonin and its kynurenin-like oxidation products affect the microbicidal activity of neutrophils. *Microbes Infect*. 8(2): 420-5.

SKOK M.V., GRAILHE R., AGENES F., CHANGEUX J.P. (2007). The role of nicotinic receptors in B-lymphocyte development and activation. *Life Sci*. 80(24-25): 2334-6.

SKWARLO-SONTA K., MAJEWSKI P., MARKOWSKA M., OBLAP R., OLSZANSKA B. (2003). Bidirectional communication between the pineal gland and the immune system. *Can J Physiol Pharmacol*; 81: 342-349.

SOTO-VEGA E., MEZA I., RAMÍREZ-RODRÍGUEZ G., BENITEZ-KING G. (2004). Melatonin stimulates calmodulin phosphorylation by protein kinase C. *J Pineal Res*. 37(2): 98-106.

SPEERT D.P. & SILVERSTEIN S.C. (1985). Phagocytosis of unopsonized zymosan by human monocyte-derived macrophages: maturation and inhibition by mannan. *J Leukoc Biol*. 38(5): 655-8.

STEFULJ J., HÖRTNER M., GHOSH M., SCHAUENSTEIN K., RINNER I., WÖLFLER A., SEMMLER J., LIEBMANN P.M. (2001). Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res*. 30(4): 243-7.

STEIN M., GORDON S. (1991). Regulation of tumor necrosis factor (TNF) release by murine peritoneal macrophages: role of cell stimulation and specific phagocytic plasma membrane receptors. *Eur J Immunol*. 21(2): 431-7.

SU X., MATTHAY M.A., MALIK A.B. (2010). Requisite role of the cholinergic alpha7 nicotinic acetylcholine receptor pathway in suppressing Gram-negative sepsis-induced acute lung inflammatory injury. *J Immunol*. 184(1): 401-10.

TAMURA E.K., CECON E., MONTEIRO A.W., SILVA C.L., MARKUS R.P. (2009). Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells. *J Pineal Res*. 46(3): 268-74.

TAN D.X., MANCHESTER L.C., REITER R.J., QI W.B., ZHANG M., WEINTRAUB S.T., CABRERA J., SAINZ R.M., MAYO J.C. (1999). Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochim Biophys Acta*. 1472(1-2): 206-14.

TAN D.X., MANCHESTER L.C., TERRON M.P., FLORES L.J., REITER R.J. (2007). One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res*. 42(1): 28-42.

TIJMES M., PEDRAZA R., VALLADARES L. (1996). Melatonin in the rat testis: evidence for local synthesis. *Steroids*. 61(2): 65-8.

TOBIAS P.S., SOLDAU K., KLINE L., LEE J.D., KATO K., MARTIN T.P., ULEVITCH R.J. (1993). Cross-linking of lipopolysaccharide (LPS) to CD14 on THP-1 cells mediated by LPS-binding protein. *J Immunol*. 150(7): 3011-21.

UNDERHILL D.M. & OZINSKY A. (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol*. 14(1): 103-10.

UNDERHILL D.M. & OZINSKY A. (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol*. 14(1): 103-10.

UNDERHILL D.M., OZINSKY A., HAJJAR A.M., STEVENS A., WILSON C.B., BASSETTI M., ADEREM A. (1999). The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature.* 401: 811–15.

VAN WESTERLOO D.J. (2010). The vagal immune reflex: a blessing from above. *Wien Med Wochenschr*. 160(5-6): 112-7.

VIEIRA O.V., BOTELHO R.J., GRINSTEIN S. (2002). Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J*. 366(3): 689-704.

WANG H., YU M., OCHANI M., AMELLA C.A., TANOVIC M., SUSARLA S., LI J.H., WANG H., YANG H. ULLOA L., AL-ABED Y., CZURA C.J., TRACEY K.J. (2003). Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*. 421(6921): 384-8.

WHEELER T.T., HODGKINSON A.J., PROSSER C.G., DAVIS S.R. (2007). Immune components of colostrum and milk - a historical perspective. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 12(4): 237-47.

WOLCHOK J.D., GOODMAN A.R., VILCEK J. (1994).Activation of NF-kappa B may be necessary but is not sufficient for induction of H-2 antigens by TNF in J558L murine myeloma cells. *J Leukoc Biol*. 55(1): 7-12.

XANTHOU M. (1998). Immune protection of human milk. *Biol Neonate*. 74(2): 121-33.

ZEN K., KARSAN A., EUNSON T., YEE E., HARLAN J.M. (1998). Lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation in human endothelial cells involves degradation of IkappaBalpha but not IkappaBbeta. *Exp Cell Res*. 243(2): 425-33.

ZIEGLER-HEITBROCK H.W., STERNSDORF T., LIESE J., BELOHRADSKY B., WEBER C., WEDEL A., SCHRECK R., BÄUERLE P., STRÖBEL M. (1993). Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits NF-kappa B mobilization and TNF production in human monocytes. *J Immunol*. 151(12): 6986-93.