ADRIESSA APARECIDA DOS SANTOS

**MELATONINA SINTETIZADA POR MICROGLIAS DE CEREBELO EM
CULTURA REGULA O PROCESSO DE FAGOCITOSE**

SÃO PAULO

2015

ADRIESSA APARECIDA DOS SANTOS

**MELATONINA SINTETIZADA POR MICROGLIAS DE CEREBELO EM
CULTURA REGULA O PROCESSO DE FAGOCITOSE**

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

Orientadora: Profa. Dra. Regina Pekelmann Markus

SÃO PAULO

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Adriessa Aparecida dos

Melatonina sintetizada por microglias de cerebelo em cultura regula o processo de fagocitose / Adriessa Aparecida dos Santos; orientadora Regina Pekelmann Markus. -- São Paulo, 2015.

94 f.

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

1. Melatonina. 2. Microglia. 3. Fagocitose. I. Markus, Regina Pekelmann. II. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia Geral. III. Título.

COMISSÃO JULGADORA

Prof (a). Dr. (a).

Prof (a). Dr. (a).

Prof (a). Dr. (a).

Orientador (a)

AGRADECIMENTOS

Sempre observei que as pessoas tendem a usar a frase “Tenho que agradecer a tantas pessoas ...” quando perguntadas sobre quem gostariam de agradecer. Hoje entendo o significado dessa colocação. De fato, são muitas as pessoas e eu quero citar todas elas.

Em primeiro lugar, o meu agradecimento é a Deus. Não sou uma pessoa de reclamar e nem de desistir, mas realmente só ele sabe de muitas coisas. Muito obrigada Senhor!

Professora Regina. Sim, eu sempre chamarei a senhora de senhora e de Professora. Muito obrigada pela confiança depositada, por todas as críticas e por todas as orientações. Agradeço a compreensão na fase final deste trabalho. A senhora pode não saber, mas ela mudou a minha vida.

Aos meus queridos amigos e colegas de laboratório que muito contribuíram para o meu aprendizado: Prof^a Zulma, Prof. Pedro, Erika, Marina, Camila, Gabi, Gabi Kinker, Gabi Santos, Letícia, Luciana, Sanseray, Eliana, Eduardo Braga, Eduardo Tamura, Débora, Leila, Marco. Vocês foram indispensáveis para eu chegar até aqui.

Alguns não me ensinaram apenas a construir a minha dissertação, mas me deram a doçura da amizade:

Luís, obrigada por todo o tempo empenhado em me ajudar e por todas as nossas conversas e obrigada pela companhia nos pastéis. Sinto saudades.

As gatas do Lab. Eugênia e Flávia, sem palavras. Vocês tornaram meus dias mais fáceis.

Natali, pouco tempo de convivência para uma eternidade de amizade.

Clau, eu não sei o que escrever sobre você. Só sei que Deus é tão bom que me deu você como irmã do coração. Gatita.

Se existir o anjo do trabalho eu não tenho dúvidas que o meu chama-se Daiane (rs). Dai, sem você eu não sei se conseguiria. Meu eterno agradecimento.

Muitas outras pessoas também passaram pela minha vida durante o período dessa dissertação e contribuíram muito para o meu aprendizado. Tenho medo de esquecer alguém, então o agradecimento está no meu coração.

Meus amigos Danilo, Carol, Cinthia, Rodrigo, Chris e Jaqueline. Eu amo vocês.

Ao Instituto de Educação Athenas meu agradecimento especial. D. Rosilda, Karla, Emilene, Lúcio, Daiane, Dimara e Glória, muito obrigada pela confiança e compreensão.

Júnior, obrigada por sempre estar na minha torcida.

Ao Departamento de Fisiologia e a toda equipe que o compõe, muito obrigada. Agradeço também ao CNPq pela ajuda financeira.

Quero agradecer ao Curso de Inverno e fazer um pedido: queridos Colegas de Departamento, não deixem este curso acabar. Ele desperta e concretiza sonhos, como o meu.

À minha família eu quero dedicar este trabalho ...

À minha família

*Meu pai José, meu irmão Adriano, minha cunhada Zenaide, minha
sobrinha Anna Isabel e minha querida mãe Ana (in memoriam).*

Tudo o que a mente humana conceber, ela pode conquistar.

Napoleon Hill

Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muita nos aproxima.

Louis Pasteur

ÍNDICE

Introdução	13
Melatonina: aspectos gerais	13
Melatonina e o Eixo Imune-Pineal	18
As Microglias.....	24
Fagocitose Microglial	29
Cultura de células granulares de cerebelo e melatonina	31
Objetivos	35
Material e Métodos	37
Animais	37
Drogas e Reagentes	37
Cultura de células granulares de cerebelo	37
Cultura de microglias de cerebelo	38
Protocolo Experimental	39
Dosagem de Melatonina	39
Ensaio de fagocitose	39
Imunocitoquímica	40
Análises estatísticas	41
Resultados	43
Síntese de melatonina por cultura de células granulares de cerebelo	43
Síntese de melatonina por microglia em cultura	45
Melatonina e a fagocitose	46

Discussão	50
Conclusão	55
Perspectiva	57
Resumo	59
Abstract	61
Referências	63
Súmula Curricular	81
Anexo I	94

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	5 - hidroxitriptamina (serotonina)
5-HTP	5 - hidroxitriptofano
AA-NAT	Arilalquilamina -N-acetiltransferase
AC	Adenilliciclase
AMPc	Adenosina 3', 5'- monofosfato cíclico
ARG	Arginase 1
ASMT	Acetilserotonina metiltransferase
BCG	Bacilo calmette-guerin
CONCEA	Conselho de Experimentação Animal
CREB	Proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
e.p.m	Erro padrão da media
ED-1	Marcador para microglia ativada
ERK	Proteína quinase regulada por sinais extracelulares
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GFAP	Proteína fibrilar ácida de glia
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G
Gs	Proteína G estimulatória
HIOMT	Hidroxindol-O-metiltransferase
I κ B α	Inibidor de NF- κ B
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon gama
INOs	Sintase de oxido nítrico induzível
JNK	cJUN N terminal quinase
LCR	Liquido cefalorraquidiano
LPS	Lipopolissacarídeo
M ₁	Ativação clássica de macrófago/microglia
M ₂	Ativação alternativa de macrófago/microglia
MAP-2	Proteína associada ao microtúbulo 2

MAPKs	Proteína tirosina quinase dependente de mitógenos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MT ₁	Receptor de melatonina do subtipo 1
MT ₂	Receptor de melatonina do subtipo 2
NAS	N - acetilserotonina
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NSQ	Núcleo supraquiasmático
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PS	Fosfatidilserina
PVN	Núcleo paraventricular
QR2	Quinona redutase 2
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNC	Sistema nervoso central
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TLR	Receptor do tipo <i>toll</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TRFR	Receptor para fator de necrose tumoral

INTRODUÇÃO

Melatonina: aspectos gerais

A melatonina é uma molécula altamente conservada ao longo da escala filogenética, encontrada desde organismos unicelulares, plantas, fungos, invertebrados a vertebrados (Pandi-Perumal *et al.*, 2006). Originalmente descrita como hormônio da glândula pineal (Arendt e Skene, 2005), a melatonina possui outros sítios de produção (Gern e Ralph, 1979; Bubenik, 2001; 2002; Carrilo-Vico *et al.*, 2004) e outros papéis além da marcação do escuro, como os relacionados à defesa (Markus *et al.*, 2013, Carrilo-Vico *et al.*, 2013).

A via biossintética da melatonina é a mesma tanto na glândula pineal quanto em sítios extra-pineais (Figura 1). O aminoácido triptofano é captado da corrente sanguínea hidroxilado a 5-hidroxitriptofano (5-HTP) e descarboxilado para formar serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT). As enzimas triptofano hidroxilase e descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos catalisam estas reações, à semelhança do que ocorre em outras células que apenas sintetizam serotonina. Em pinealócitos e outras células que produzem melatonina, a serotonina é acetilada a N- acetilserotonina (NAS) por ação da enzima arilalquilamina-N-acetiltransferase (AA-NAT) que sob efeito da enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT), também conhecida como acetilserotonina metiltransferase (ASMT) é convertida em melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (Klein *et al.*, 1981). ASMT é o passo limitante desta reação, visto que é a enzima que impõe a menor velocidade de reação, mas a AA-NAT é uma enzima chave, visto que a transcrição do gene e a ativação da enzima são estritamente reguladas por luz e por mediadores da inflamação (Borjigin *et al.*, 2012).

Em mamíferos, a síntese de melatonina rítmica é feita pela glândula pineal, que é caracterizada como um transdutor neuroendócrino, capaz de converter sinalizações neurais em sinalizações endócrinas (Axelrod, 1974). Estruturalmente, a glândula pineal de mamíferos é composta por diversos tipos celulares (Moller e Baeres, 2002) e as células predominantes são as neuroendócrinas,

responsáveis pela produção de melatonina e denominadas de pinealócitos. Essas células, que constituem 80 % da glândula pineal, são derivadas da ectoderme, o mesmo folículo que origina neurônios (Arendt, 1995; Ekstrom e Meissl, 2003). Também estão presentes astrócitos e microglia, sendo que esta apresenta função fagocitária (Pedersen *et al.*, 1993; Sato *et al.*, 1996).

O controle neural da síntese de melatonina pela glândula pineal é exercido pelo núcleo supraquiasmático (NSQ), sede do relógio biológico central, através de uma via polissimpática. Esta via inicia-se na retina, onde ocorre a conversão da informação fótica em sinais neurais que, por sua vez, são enviados pelo nervo óptico aos NSQ via trato retino-hipotalâmico. Os NSQ projetam-se aos neurônios autônomos do núcleo paraventricular (PVN), havendo liberação do neurotransmissor inibitório ácido gama-aminobutírico (GABA) sincronizada à presença de luz ambiental (Kalsbeek *et al.*, 2000). Portanto, é neste ponto que a via sinalizadora à síntese de melatonina é inibida durante a fase de claro.

Na fase de escuro ambiental, a via prossegue dos neurônios do PVN à coluna intermediolateral da medula espinhal (Teclemariam-Mesbah *et al.*, 1999), onde originam-se os neurônios pré-ganglionares que projetam-se ao gânglio cervical superior. Por fim, os neurônios pós-ganglionares simpáticos inervam diretamente a pineal e há liberação de noradrenalina pelos terminais nervosos no parênquima da glândula, resultando na indução da produção de melatonina. A noradrenalina liberada pelos terminais simpáticos interage com receptores adrenérgicos pós-sinápticos presentes na membrana dos pinealócitos (Klein *et al.*, 1983). Os adrenoceptores $\beta 1$ são mais sensíveis que os adrenoceptores $\alpha 1$ e são os estimulados após liberação de noradrenalina do nervo conário. A estimulação dos adrenoceptores $\alpha 1$ na ausência de uma estimulação $\beta 1$ não leva à produção de melatonina e, portanto, a produção de melatonina é resultante da estimulação $\beta 1$ -adrenérgica.

A ativação dos receptores β 1-adrenérgicos induz a ativação da proteína G estimulatória (Gs) que, por sua vez, ativa a enzima adenililciclase (AC) promovendo a formação do segundo mensageiro adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC), cujo aumento ativa a proteína quinase dependente de AMPC (PKA). Em animais de hábito noturno, como roedores, a PKA induz a fosforilação do fator de transcrição CREB (do inglês, *cyclic-AMP regulating element binding*), que permite a transcrição da enzima AA-NAT. PKA também fosforila AA-NAT induzindo a sua interação com a chaperona 14-3-3, que impede a sua degradação proteassomal. Nessas espécies, tanto o gene quanto a proteína AA-NAT apresentam um ritmo circadiano com níveis de transcrição maior durante a noite. Em animais de hábito diurno, primatas e ungulados, o gene da *Aa-nat* é expresso constitutivamente, não havendo diferenças significativas dos níveis de RNAm entre o dia e a noite. Neste caso, embora haja transcrição da AA-NAT ela é rapidamente degradada assim que traduzida. A liberação noturna de noradrenalina na glândula leva a ativação da PKA que fosforila a enzima prevenindo a degradação da AA-NAT (Baler *et al.*, 1997). Desse modo, a regulação da AA-NAT, seja sobre a atividade ou sobre a transcrição do gene é um passo fundamental para a síntese e o ritmo circadiano da melatonina.

Figura 1: Via de síntese de melatonina – A noradrenalina (NA) liberada na fase de escuro pelas fibras pós-ganglionares simpáticas interage com os receptores de sete domínios transmembrânicos do tipo $\beta 1$ – adrenérgicos. Estes receptores são acoplados à proteína Gs e ativam adenilil ciclase (AC) promovendo aumento do segundo mensageiro AMPc que, por sua vez, ativa a quinase PKA. A PKA atua fosforilando o fator CREB, permitindo a transcrição da enzima AA-NAT. A PKA ainda fosforila a AA-NAT permitindo sua ligação à chaperona 14-3-3, o que a protege de degradação. A cascata de síntese de melatonina se inicia com o metabolismo de triptofano para formar 5-HT que é substrato para ação direta da enzima AA-NAT para formar NAS que, por sua vez, é metilada em melatonina pela enzima HIOMT. A melatonina é liberada na circulação e no líquido cefalorraquidiano rapidamente à medida que é sintetizada.

A melatonina produzida é secretada tanto para os capilares (Cardinali *et al.*, 1972), quanto para o líquido (Legros *et al.*, 2014), que é o responsável por alcançar os tecidos cerebrais, atingindo concentrações até 15 vezes maior que aquela encontrada no sangue. Na corrente sanguínea a melatonina apresenta uma meia-vida curta de 30 a 60 minutos (Cardinali *et al.*, 1972; Waldhauser *et al.*, 1984) e é metabolizada no fígado via hidroxilação seguida de conjugação com sulfato ou glucoronato (Tan *et al.*, 2007).

Por ser uma molécula anfipática, a melatonina pode atravessar passivamente a membrana celular e, dessa forma, pode regular diretamente reações/funções no interior das células, independentemente da interação com receptores. Por outro lado, diversas ações da melatonina são mediadas por receptores de membrana: MT₁ e MT₂, originalmente descritos como Mel_{1a} e Mel_{1b}. (Reppert *et al.*, 1994; 1995; Dubocovich, 1997). Esses receptores pertencem à família de receptores acoplados a proteína G, que contém sete domínios transmembrânicos e são expressos tanto individualmente como em conjunto em vários tecidos e órgãos. A expressão do receptor MT₁ ocorre principalmente no sistema nervoso central (SNC), em órgãos reprodutores, rim, fígado, vasos e pele. Já o subtipo MT₂ é expresso de forma mais restrita, sendo encontrada principalmente no cérebro (com exceção dos NSQs), embora a sua presença também tenha sido detectada no pulmão, células do sistema imunológico, duodeno e adipócitos (Pandi-Perumal *et al.*, 2008). Esses receptores tem afinidades diferentes para a melatonina sendo cerca de três vezes maior para o MT₁ em relação ao MT₂ (Witt-Enderby *et al.*, 2003). Além disso, os receptores podem atuar como monômeros ou dímeros, sendo que a presença de heterodímero MT₁/MT₂ e o homodímero MT₁ são mais prevalentes em relação ao homodímero MT₂ (Zlotos *et al.*, 2014). Um terceiro tipo de receptor de membrana (MT₃) chegou a ser designado, mas, posteriormente, foi demonstrado que se tratava de uma enzima citosólica denominada quinona redutase 2 (QR2) (Nosjean *et al.*, 2000).

Esta enzima pertence ao grupo de redutases que participa da proteção contra o estresse oxidativo (Pandi-Perumal *et al.*, 2008).

Melatonina e o Eixo Imune Pineal

Historicamente, a primeira função relacionada à melatonina foi como molécula antioxidante e bloqueadora de estresse oxidativo, sendo, portanto, a função de defesa a principal ação da melatonina nos organismos primitivos. No entanto, ao longo das últimas décadas, o papel regulatório da melatonina sobre as funções de defesa tem sido demonstrado por muitos grupos (Nelson e Demas, 1997; Gilad *et al.*, 1998; Maestroni, 1998; Reiter *et al.*, 2000; Carrillo-Vico *et al.*, 2004; 2005; Pontes *et al.*, 2006; Srinivasan *et al.*, 2008).

A primeira observação indicando uma inter-relação entre a glândula pineal e o sistema imunológico foi em 1926 por Berman, que descreveu o aumento na resistência a doenças infecciosas, em gatos alimentados com glândulas pineais por 2 anos (*apud* Carrillo-Vico *et al.*, 2005). Nas décadas seguintes os estudos sobre a ação imunomodulatória da melatonina baseavam-se na retirada da glândula pineal e na observação de diversos parâmetros imunológicos, incluindo os órgãos linfóides. A supressão da imunidade, atrofia do timo, a redução de células imunológicas do baço após pinealectomia e a descrição de receptores de melatonina em células imunocompetentes representam evidências marcantes no papel regulador exercido pela melatonina no sistema imunológico (Csaba e Barath, 1975; Brainard *et al.*, 1988; Jankovic *et al.*, 1994; Maestroni *et al.*, 1998). De fato, uma grande quantidade de estudos posteriores confirmou o papel imunomodulatório da melatonina, mas poucos investigaram a modulação da atividade da pineal em decorrência da ativação do sistema imunológico. A existência dessa modulação foi primeiramente sugerida em um estudo de inflamação crônica em camundongos.

A injeção de BCG (Bacilo Calmette-Guerin) na pata de camundongos gera um inchaço local cujo tamanho varia de forma

rítmica ao longo do dia. A pata fica maior na fase de claro do que na fase de escuro. O envolvimento da melatonina neste ritmo foi demonstrado pela pinealectomia desses animais. A extirpação da glândula pineal eliminou o ritmo de variação da espessura da pata, enquanto que a reposição de melatonina na água para beber noturna desses animais, foi suficiente para restaurá-la (Lopes *et al.*, 1997). Foi demonstrado, ainda, que a adrenoleactomia (extirpação da glândula adrenal) também abolia o ritmo da espessura da pata e que esse efeito era decorrente de uma diminuição nos níveis circulantes de melatonina (Lopes *et al.*, 2001). Tais resultados induziram ao questionamento sobre a existência de substâncias envolvidas em um processo inflamatório sobre a pineal.

A existência de uma comunicação entre as glândulas adrenal e pineal na condição de inflamação foi confirmada e estudos posteriores demonstraram que a corticosterona é capaz de potenciar a síntese de melatonina pela glândula pineal, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Ferreira *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2009). O aumento nos níveis circulantes de corticosterona em decorrência de estresse moderado também potencia a síntese de melatonina (Couto-Moraes *et al.*, 2009).

A responsividade da glândula pineal a outras substâncias envolvidas na resposta inflamatória também foi investigada. A incubação com o fator de necrose tumoral (TNF), uma citocina pró-inflamatória, gera uma supressão da produção de melatonina por inibição da expressão gênica da enzima AA-NAT (Fernandes *et al.*, 2006). Esse efeito inibitório de TNF foi corroborado *in vitro* com um modelo de inflamação em humanos. Mulheres que desenvolveram mastite, um processo inflamatório não infeccioso causado pela sucção durante a amamentação, apresentam altos níveis circulantes de TNF e a ausência do ritmo diário de melatonina, sendo este ritmo restaurado somente após a resolução da inflamação, quando os níveis da citocina são zerados (Pontes *et al.*, 2006). Dessa forma, substâncias anti e pró-inflamatórias (corticosterona e TNF, respectivamente) apresentam

efeitos antagônicos quanto à modulação da atividade biossintética da glândula pineal.

Outros autores já admitiam a hipótese da glândula pineal receber sinalizações periféricas provenientes do sistema imunológico (Skwarlo-Sonta, 1996, 2003; Tsai *et al.*, 2001), alegando que isso constituiria um mecanismo de retroalimentação relevante para a manutenção da homeostase, já que a melatonina exerce importante papel modulatório nas células imunocompetentes. Entretanto, a análise conjunta dos dados obtidas por nosso grupo permitiu uma compreensão mais profunda a cerca dessa relação entre a pineal e o sistema imunológico, acarretando no desenvolvimento do conceito de eixo imune pineal (Markus *et al.*, 2007). As ações antagônicas entre TNF e corticosterona, foram as bases iniciais para a compreensão desta relação.

No início da montagem da resposta imunológica inata, os altos níveis de TNF produzidos inibem a síntese de melatonina pela pineal. Vale lembrar que um dos efeitos imunomodulatórios da melatonina em concentrações fisiológicas é o de inibir o rolamento e a adesão de leucócitos sobre a camada endotelial, limitando a migração celular (Lotufo *et al.*, 2001, 2006). Portanto, a inibição transiente da melatonina circulante durante uma inflamação pode ser benéfica no sentido de permitir uma ativação mais eficaz do sistema imunológico. Concomitantemente, as células imunocompetentes ativadas passam a produzir melatonina em altas concentrações no local, o que auxilia na proliferação, atividade fagocítica e apresentação de antígenos por essas células. Já na fase anti-inflamatória da resposta e com a resolução da inflamação, a síntese pineal de melatonina é restaurada. Isso ocorre tanto pela diminuição na concentração dos fatores inibitórios, quanto pelo aumento da corticosterona circulante, que potencia a atividade biossintética da pineal. Assim, em condições de ativação do sistema imunológico, o mecanismo clássico de regulação da glândula pineal pela informação fótica ambiental deixa de ser predominante e possibilita que a melatonina seja produzida em concentrações e em locais condizentes com as necessidades do organismo.

A modulação da síntese rítmica de melatonina pela glândula pineal é possível, já que a glândula expressa receptores para estes (da Silveira Cruz-Machado *et al.*, 2010; Carvalho-Sousa *et al.*, 2011). Quando receptores para citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNFR), ou para padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) são ativados na pineal a translocação nuclear do fator de transcrição *kappa* B (NF- κ B), inibe a transcrição do gene que codifica *Aa-nat* e com isto a síntese de melatonina (da Silveira Cruz Machado *et al.*, 2010; Carvalho-Souza *et al.*, 2011). O NF- κ B corresponde a uma família de proteínas que atua como fator de transcrição regulando a expressão de uma variedade de genes. Esta via é central na mediação dos efeitos modulatórios do sistema imunológico sobre a atividade da pineal, sendo que sua indução por TNF causa uma inibição na síntese de melatonina, enquanto que o bloqueio da sua translocação nuclear ou da sua ligação ao DNA por corticosterona potencia a atividade biossintética da pineal (Ferreira *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2006). Nosso grupo mostrou que a ativação de NF- κ B no microambiente de macrófagos induz a transcrição do gene que codifica *Aa-nat* e a síntese de melatonina (Muxel *et al.*, 2012), invertendo temporariamente a fonte desta indolamina. Recentemente, também mostramos que a melatonina produzida pelos macrófagos, agindo de forma autócrina em receptores acoplados à proteína G (GPCRs) aumenta a expressão da proteína de membrana dectina-1, que participa no englobamento de partículas e microorganismos e na formação do fagolisossomo (Pires-Lapa *et al.*, 2013).

Figura 2: O Eixo Imune Pineal – Em indivíduos saudáveis a síntese de melatonina é controlada pelos núcleos NSQ que transduz a informação ambiental luminosa no pico noturno de melatonina que reduz a transmigração de leucócitos para os tecidos. Em uma situação de injúria, a glândula pineal responde a moléculas produzidas no início da inflamação, suprimindo a síntese de melatonina. A ausência do pico noturno de melatonina permite a migração de leucócitos resultando numa montagem eficiente da resposta. Nos tecidos de injúria, os leucócitos produzem melatonina de forma parácrina, o que ajuda na resolução do processo inflamatório.

A biossíntese da melatonina em sítios extra pineais é a mesma descrita anteriormente, mas o controle dessa produção é específico para cada região. Nestas condições, a concentração de melatonina secretada parece ser maior do que as encontradas no plasma, contudo o pequeno volume intercelular onde é liberada é que torna essa concentração maior. Além disso, a melatonina secretada nestes locais parece não contribuir para a variação rítmica do hormônio na circulação, sendo este padrão dependente da pineal (Markus *et al.*, 2013).

Em células fotorreceptoras da retina a síntese de melatonina ocorre de forma rítmica (Gern e Ralph, 1979; Cahill e Besharse, 1993), enquanto no trato gastrointestinal esta produção dá-se de maneira constitutiva (Bubenik, 2001; 2002). Em células imunocompetentes a ativação por agentes pró-inflamatórios como citocinas e PAMPs é a sinalização para a síntese, que atua aumentando a capacidade fagocítica de macrófagos (Muxel *et al.*, 2012; Pires-Lapa *et al.*, 2013) e induz síntese de interleucina-2 (IL-2) (Carrilo-Vico *et al.*, 2005).

No sistema nervoso central concentrações substancialmente elevadas de melatonina são encontradas no líquido cefalorraquidiano (LCR) (Tricoire *et al.*, 2002, 2003). A origem pode estar relacionada tanto à produção pela glândula pineal, que lança este hormônio através do recesso pineal no terceiro ventrículo (Tricoire *et al.*, 2002, 2003; Longatti *et al.*, 2007; Leston *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2010), quanto à produção local por células do sistema nervoso (Pinato *et al.*, 2013), visto que a AA-NAT é expressa em tecidos cerebrais (Stefulj *et al.*, 2001; Pinato *et al.*, 2013) e em astrócitos em cultura que também produzem melatonina (Liu *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2010).

A importância dos altos níveis de melatonina encontrados no SNC pode estar relacionada à função neuroprotetora da melatonina (Hardeland, 2012), como mostram trabalhos recentes: o cerebelo de rato estimulado com lipopolissacarídeo (LPS) sintetiza melatonina, que apresenta papel citoprotetor (Pinato *et al.*, 2013; Franco, 2014) e o antagonista competitivo de receptores de melatonina, (luzindol), aumenta a suscetibilidade deste tecido ao efeito citotóxico do LPS. Em

culturas de células cerebelares este efeito citoprotetor é observado quando a melatonina é administrada à cultura. Os efeitos injuriantes provocados por LPS, tais como aumento da translocação do NF- κ B e da expressão da isoforma induzida da sintase de óxido nítrico (iNOS) são atenuados na presença de melatonina (Franco e Markus, 2014).

A presença de melatonina no SNC e sua relação com a neuroproteção levantam questões de novos locais de síntese e mecanismos de ação desta indolamina. A microglia é uma candidata para esta investigação, já que é conhecida a síntese de melatonina por células da glia (astrócitos) e macrófagos.

As Microglias

As microglias são macrófagos residentes no SNC e suas funções estão relacionadas desde a manutenção do ambiente neural a reparações e respostas contra lesões (Kettenmann *et al.*, 2011). Possuem capacidade de modificar o seu fenótipo e, conseqüentemente, apresentam uma notável variedade de morfologias e comportamentos em resposta a estímulos ambientais que são manifestados tanto na ativação da resposta inflamatória e reparação tecidual, como em situações de consolidação do processo inflamatório (Harry e Kraft, 2008; Kraft e Harry, 2011; Harry e Kraft, 2012). No entanto, o cenário exato que promove a ativação microglial com ação neuroprotetora ou neurotóxica ainda permanece desconhecido (Luo *et al.*, 2010; Gomes-Leal, 2012).

A primeira descrição das microglias ocorreu em 1899 por Nissl, que as diferenciou de outros componentes neurais devido à forma achatada de seus núcleos (Mrak, 2012), mas a identificação e caracterização definitiva da microglia foram feitas no início do século passado (1920) por del Rio Hortega e Penfield através da técnica de coloração de carbonato de prata (Mrak, 2012; Eyo e Dailey, 2013), que é utilizada até hoje na compreensão dos processos de ativação das microglias durante um estímulo.

Um século após a descoberta da microglia, a natureza e origem destas células ainda permanecem desconhecidas, mas dados recentes convergem para a teoria de que as microglias são derivadas de células progenitoras do saco vitelínico nas primeiras semanas de gestação. Estas células, macrófagos embrionários, colonizam o cérebro antes que a barreira hematoencefálica seja fechada, formando uma população com capacidade de proliferação *in situ* durante a vida adulta. Após lesões, o parênquima cerebral pode ser invadido por monócitos circulantes recrutados por quimiocinas e citocinas liberados por microglias e astrócitos ativados, representando um mecanismo de reposição em caso de diminuição do *pool* de microglias (Guillemin e Brew, 2004; London *et al.*, 2013) (Figura 3).

Figura 3: Cascata de eventos e funções microgliais – Microglias residentes originam-se de macrófagos do saco vitelínico que migram para o parênquima do SNC durante o desenvolvimento. As microglias são auto renovadas localmente a partir de monócitos derivados da medula óssea, por proliferação de células progenitoras primitivas (a). No estágio de repouso a microglia monitora o ambiente através de suas ramificações altamente móveis (b). As microglias também facilitam a manutenção das sinapses (c), a neurogênese (d) e sintetizam fatores de crescimento essenciais para o desenvolvimento normal do SNC (e). Após o reconhecimento de um sinal de perigo, a microglia retrai

suas ramificações adquirindo um aspecto redondo e ameboide que a caracteriza no estado ativado (f). A ativação *curta* ou *moderada* dirige a microglia para o fenótipo neuroprotetor, em que há a fagocitose de debris celulares (g), a secreção de fatores associados a remielinização (h) e a regeneração e suporte de neurônios (i). A ativação aguda ou crônica torna a microglia neurotóxica, que sintetiza espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO), proteases e citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, e TNF, que põe em risco a atividade neuronal (j). O mau funcionamento das microglias pode resultar no recrutamento de macrófagos derivados de monócitos para o local danificado (k), que realizam funções que não podem ser exercidas pelas microglias, como a secreção de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10, fator de transformação de crescimento β (TGF- β) e dos receptores de manose e arginase 1 (ARG), associados a resolução do processo inflamatório, além da promoção da neuroproteção e renovação celular (j). Retirado de London *et al.*, 2013.

O estado de repouso das microglias é observado durante a higidez no SNC e pode ser identificado pela morfologia e pelo padrão de expressão de genes. Suas ramificações longas e finas estendem-se para o meio circundante para monitorar o ambiente. O fenótipo imunológico é caracterizado por baixa expressão de proteínas MHC (complexo principal de histocompatibilidade, do inglês: *main histocompatibility complex*) e expressão de receptores como CD200 e CX3CR1 que parecem contribuir no estágio de repouso microglial. Esta morfologia ramificada ocorre somente *in vivo* e é ausente em culturas de microglias. Quando são ativadas as microglias sofrem alterações morfológicas que consiste na retração das extensões ramificadas até um estágio amebóide com processos curtos ou não existentes (Figura 4). Esta alteração também é acompanhada por mudanças na sinalização e expressão de genes que podem resultar na expressão de receptores de superfície, liberação de fatores pró ou anti-inflamatórios e moléculas de recrutamento (Stence *et al.*, 2001).

Figura 4: Sequência de ativação microglial – As microglias são células que respondem a lesões cerebrais. Em condições normais, estas células são encontradas em estado de repouso apresentando uma morfologia ramificada (Estágio - R) que a permite monitorar o ambiente neural. Após um sinal de ativação, as microglias iniciam alterações morfológicas que iniciam-se com a retração de suas extensões (Estágio - W), seguida da transição (Estágio - T) para o estágio que permitirá sua mobilidade (Estágio - M) e locomoção (Estágio L). Estas alterações morfológicas caracterizam a microglia ativada e é essencial para as funções fagocíticas características destas células (Estágio - L). Modificado de Stence *et al.*, 2001.

De acordo com a descrição original de Del Rio-Hortega (1919), as microglias foram classicamente descritas em dois estados: repouso e ativada. No entanto, esta definição binária já foi revista e atualmente diferentes padrões de ativação microglial já são reconhecidos. Por serem os macrófagos do SNC, uma das principais funções da microglia ativada é a de regular a imunidade inata do SNC e iniciar respostas como a neuroinflamação. Este é um processo que tem por objetivo a defesa do tecido, no entanto, caso não seja controlada ou prolongada, a neuroinflamação pode ser prejudicial e resultar em danos celulares. Isto é particularmente relevante para as doenças neurodegenerativas, o que

torna a ativação microglial um alvo para o estudo da patogênese destas doenças (Frank-Cannon *et al.*, 2009).

Reconhece-se agora que a microglia ativada pode existir em dois estados diferentes (Colton, 2009). O primeiro é a ativação clássica (M₁) que é caracterizada pela produção de citocinas inflamatórias e ROS, enquanto que o segundo é um estado de ativação alternativo (M₂), em que a microglia assume um fenótipo anti-inflamatório envolvido na remoção de debris celulares e reparação de danos (Gordon, 2003).

Em macrófagos, o padrão clássico de ativação M₁ é induzido por interferon γ (IFN- γ) ou TNF. Já citocinas de caráter imunossupressor como IL-4, IL-10 e IL-13 induzem a forma alternativa de macrófagos, M₂. O fenótipo dos macrófagos M₁ caracteriza-se pela alta expressão de IL-12, IL-23 e baixa expressão de IL-10. São células eficientes na produção de espécies reativas de oxigênio e intermediários oxidados de nitrogênio, além de outras citocinas inflamatórias tais como IL-1, TNF e IL-6. Por outro lado, os macrófagos M₂ caracterizam-se pela baixa expressão de IL-12, IL-23 e alta expressão de IL-10, com uma variável capacidade de produzir citocinas inflamatórias (Ginderachter *et al.*, 2006; Rezende *et al.*, 2007).

Em microglias, os efeitos funcionais da ativação clássica são voltados para a apresentação de antígenos e a morte de patógenos intracelulares. Os receptores MHC da classe II, CD86 e Fc γ são regulados positivamente para permitir a atividade de apresentação de antígenos pela microglia (Taylor *et al.*, 2005). Além disso, a proporção de determinadas citocinas sintetizadas por macrófagos, como as supracitadas, pode estender-se às microglias. Outra característica importante do estágio M₁ microglial é a sua capacidade de produzir ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS) (Bagasra *et al.*, 2005). No entanto, apesar de parecer simples identificar microglias no estágio M₁ com base nestas características, a classificação destas células *in vivo* é mais complexo, refletindo a natureza plástica das microglias e sugerindo a existência de uma gama de formas intermediárias. A classificação do estágio de ativação alternativo (M₂) é baseada na

expressão de mediadores ou receptores com a capacidade de regular negativamente, reparar ou proteger contra a inflamação (Varin e Gordon, 2009). Esta classificação iniciou-se com base na expressão do receptor de manose induzida por IL-4, proposta por Stein e colaboradores (1992). Outra forma de classificar o fenótipo M₂ baseia-se na sua indução por citocinas. Tanto a IL-4, como já descrito, como a IL-13, induzem uma série de processos que conduzem a funções anti-inflamatórias, tais como a inibição do NF-κB e produção de receptores para a fagocitose (Taylor *et al.*, 2005; Sica e Mantovani, 2012; Gadani *et al.*, 2012). Este tipo de ativação foi classificada como “M_{2a}” e a principal função dessa resposta parece ser a supressão da inflamação. Um segundo estado de ativação alternativa baseia-se em macrófagos expostos a IL-10, glucocorticóides, ou TGF-β. Este fenótipo é classificado como “M_{2b}” (Mantovani *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2008) e parece estar envolvido na remodelação de tecidos e deposição de matriz após a inflamação (Mantovani *et al.*, 2004).

A presença de vários fenótipos de ativação de microglia é um conceito relativamente novo que está apenas começando a ganhar impulso. Evidências recentes sugerem que os dados *in vitro*, originalmente usados para identificar os fenótipos de macrófagos, não indicam com precisão o ambiente em que a célula é exposta (Mosser e Edwards, 2008). Além disso, ao contrário das células periféricas, que são estudadas há mais de 20 anos, os estados de ativação no SNC estão apenas começando a ser estudados. Portanto, uma compreensão mais profunda da heterogeneidade e os diferentes fenótipos de microglia são necessários e as informações recolhidas nos macrófagos periféricos servem como base, mas não podem ser traduzidos para o cérebro (Cherry *et al.*, 2014).

Fagocitose Microglial

A microglia ativada, como já descrito, é identificada pela retração das suas ramificações e morfologia ameboide que resulta na alta

capacidade fagocítica destas células. A ativação microglial é observada em muitas doenças neurológicas, incluindo as neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (Prokop *et al.*, 2013), a doença de Parkinson (Long-Smith *et al.*, 2009) e a esclerose amiotrófica lateral (Sargsyan *et al.*, 2005), além de doenças traumáticas (Loane e Byrnes, 2010), infecciosas, inflamatórias como a esclerose múltipla (Napoli e Neumann, 2010), acidente vascular cerebral (Yenari *et al.*, 2010) e lesão cerebral induzida por radiação (Chiang *et al.*, 1993).

Assim como os macrófagos, as microglias fagocitam microorganismos e debris celulares. Sinais químicos emitidos pelo alvo a ser fagocitado induzem a quimiotaxia microglial e o reconhecimento de moléculas de superfície que sinalizam “eat-me” promovem o engolfamento. A exposição de fosfatidilserina (PS) (Fadok *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1995), calreticulina (Gardai *et al.*, 2005), e componentes de parede celular como o zimosan (Pires-Lapa *et al.*, 2013) são exemplos de sinais que conduzem a fagocitose.

O zimosan provém da preparação da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada há mais de 50 anos como um modelo fagocítico e estímulo inflamatório, tanto *in vivo* como *in vitro* (Di Carlo *et al.*, 1958). É composto principalmente de β -glucanas, mananas, manoproteínas e quitina e cada um destes compostos implica no reconhecimento da levedura pelo sistema imunológico inato (Di Carlo *et al.*, 1958; Vecchiarelli *et al.*, 1991; Underhill *et al.*, 2002). Nas células mielóides, zimosan estimula a fagocitose, a produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias, a produção de ROS e de azoto e é importante na estimulação das respostas imunitárias adaptativas. Em macrófagos a produção de citocinas inflamatórias induzida por zimosan é mediada por receptores do tipo Toll (do inglês *toll-like receptors* - TLRs) e não requer internalização de partículas (Underhill *et al.*, 1999).

Os receptores TLRs medeiam o reconhecimento de uma vasta gama de produtos microbianos, incluindo LPS, lipoproteínas, flagelina e DNA bacteriano. A sinalização através de TLRs leva à produção de mediadores inflamatórios. Além dos TLRs, outros receptores de

superfície, como a dectina-1, participam da resposta imunológica inata e reconhecimento microbiano (Fu *et al.*, 2014) cooperando com a sinalização dos receptores TLRs na definição de respostas inflamatórias (Gantner *et al.*, 2003). A dectina-1 é um receptor específico para β -glucanos, expressa em macrófagos, neutrófilos (Taylor *et al.*, 2002), microglias (Shah *et al.*, 2008) e células dendríticas (baixa concentração) que desempenha um papel importante na imunidade inata antifúngica. Os β -glucanos são polímeros de glucose encontrados nas paredes celulares de fungos, tais como zimosan, como já descrito. A dectina-1 liga-se e interioriza β -glucanos, mediando a produção de ROS, ativação de NF- κ B e secreção subsequente de citocinas pró-inflamatórias (Brown *et al.*, 2003).

Cultura de células granulares de cerebelo e melatonina

As células granulares de cerebelo constituem a maior população neuronal homogênea do cérebro de mamíferos. A imunofluorescência utilizando os anticorpos MAP-2 (marcador de neurônio), GFAP (marcador de astrócito) e ED-1 (marcador de microglia) indicam que a cultura é composta de 80 – 90 % de neurônios (células granulares), 10 – 15 % de astrócitos e 2 – 3 % de microglias (Kawamoto *et al.*, 2008). Devido à viabilidade de culturas primárias *in vitro* bem caracterizadas, cultura de células granulares de cerebelo é um modelo muito utilizado em estudos de neuroproteção, neurodegeneração, desenvolvimento, mecanismos de sobrevivência celular e funcionalidade neuronal (Contestabile, 2002).

A sobrevivência das células granulares (neurônios glutamatérgicos) em cultura é mantida desde que o meio de cultivo esteja em concentração despolarizante de potássio (25 mM), o que ativa os canais de cálcio dependente de voltagem elevando os níveis de cálcio intracelular (Blaustein, 1975; Tsien, 1983; Gallo *et al.*, 1987). Quando ocorre redução dos níveis de potássio a apoptose é induzida em

neurônios (D'Mello *et al.*, 1993; Galli *et al.*, 1995), que pode ser protegida pela microglia presente nesta cultura, demonstrando que os sinais apoptóticos enviados pelos neurônios induzem a liberação de substâncias neuroprotetoras por células microgлияis (Polazzi *et al.*, 2001).

O cerebelo é alvo de atuação da melatonina via receptores MT₁ e MT₂ (Laudon *et al.*, 1998; Al-Ghoul *et al.*, 1998; Imbesi *et al.*, 2008; Adamah-Biassi *et al.*, 2014). Na cultura de células granulares do cerebelo a melatonina apresenta um efeito protetor contra a neurotoxicidade induzida por glutamato (Gepiredman *et al.*, 2000) e o envelhecimento celular (Tajes Orduna *et al.*, 2009). A produção de melatonina por esta cultura é conhecida e ocorre por um mecanismo dependente do NF- κ B (Pinato *et al.*, 2013). Quando administrada à cultura, a melatonina atua via receptores de membrana (MT₁ e MT₂) (Laudon *et al.*, 1988; Al-Ghoul *et al.*, 1998; Imbesi *et al.*, 2008; Adamah-Biassi *et al.*, 2014), diminuindo os efeitos injuriantes provocados por LPS, tais como o aumento do NF- κ B ao núcleo e a expressão da enzima iNOS. A injeção de LPS no ventrículo lateral de rato reduz o pico noturno de melatonina no plasma e induz a sua síntese no cerebelo, mas não no córtex e no hipocampo. Além disso, a mesma injeção de LPS induz morte celular apenas no córtex e no hipocampo, mas não no cerebelo, indicando que a produção de melatonina nesse tecido tem um papel citoprotetor (Pinato *et al.*, 2013).

A expressão de AA-NAT por neurônios (células granulares) é um forte indicio de que estas células sejam capazes de produzir a melatonina presente nesta cultura (Franco, 2014), embora outras células como astrócitos e microgлияs também possam ser as responsáveis por esta síntese.

Em vista dos trabalhos desenvolvidos por nosso grupo mostrando que o cerebelo é capaz de produzir melatonina e que esta exerce localmente uma ação protetora, mesmo na ausência da síntese de melatonina pela glândula pineal, foi levantada a hipótese que a microglia cerebelar seria a responsável pela síntese de melatonina. Este

efeito seria semelhante ao descrito para macrófagos. Dessa forma, a ativação do eixo imune-pineal a partir de uma injúria ao SNC resultaria em uma redução da produção de melatonina pela glândula pineal e a sua síntese por microglias.

OBJETIVOS

Investigar se microglias de cerebelo mantidas em cultura são capazes de sintetizar melatonina a qual facilitaria a função fagocítica dessas células.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados ratos Wistar (7-8 dias de idade) obtidos do Biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências (IB) da Universidade de São Paulo. Os procedimentos realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética do IB-USP (número da licença 159/2012) e está de acordo com o Conselho Nacional de Controle Animal Experimentação (CONCEA).

Drogas e Reagentes

As drogas e reagentes foram adquiridas a partir das seguintes fontes: lipopolissacárido (LPS, de *E. coli* serotipo 0127 : B8), tripsina, inibidores de tripsina, poli-L-lisina, cloridrato de minociclina, melatonina e o anticorpo secundário TRITC (T7657) foram obtidos da Sigma – Aldrich (St. Louis , MO, EUA). Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), soro fetal bovino e penicilina / estreptomicina foram obtidos de Gibco BRL Products (Grand Island, NY, EUA). Zimosan fluorescente foi obtido de Molecular Sondas - Life Technologies (São Paulo, SP, Brasil). Luzindol foi obtido a partir de Tocris (Minneapolis, MN, EUA). O anticorpo de camundongo anti-ED-1 (ab31630) foi adquirido da Abcam (Cambridge, MA, EUA).

Cultura de células granulares de cerebelo

A cultura de células granulares de cerebelo que contém de 80 – 90 % de neurônios, 10 – 15 % de astrócitos e 2 – 3 % de microglia foi obtida do protocolo modificado de Kawamoto e colaboradores (2008). Os animais foram decapitados e cada cerebelo foi isolado, lavado, cortado em pequenos pedaços e incubados em solução fisiológica (NaCl 120 mM; KCl 20 mM; KH₂PO₄ 1,2 mM; MgSO₄.7H₂O 1,2 mM; NaHCO₃ 25 mM, glicose 13 mM e tripsina 0,05 %; pH = 7,4) durante 40 minutos.

Em seguida, adicionou-se à solução inibidor de tripsina (0,06%) e

as células foram isoladas por dispersão mecânica e centrifugação (300 g, 5 min). As células foram semeadas em meio DMEM (13,4 g/L; KCl 25 mM; NaHCO₃ 44 mM; soro fetal bovino 10 %; penicilina 50 U/mL / estreptomicina 50 µg/mL), plaqueadas a 5 x 10⁵ células/poço em placas previamente cobertas com poli-L-lisina e mantidas a 37 °C e 5 % de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas e os experimentos realizados sete dias após o estabelecimento da cultura. O meio foi trocado uma hora antes do tratamento.

Cultura de microglias de cerebelo

A cultura é processada como cultura de células granulares do cerebelo usando-se um meio de cultura com uma concentração 5 vezes menor de KCl e um aumento na concentração de soro fetal bovino (NaCl 13,4 g/L; **KCl 5 mM**; NaHCO₃ 44 mM; **soro fetal bovino 20 %**; penicilina 50 U/mL/estreptomicina 50 µg/mL). As células provenientes de dois cerebelos foram incubadas em garrafas de cultura (75 cm²) na ausência de poli-L-lisina e mantidas a 37 °C, 5 % de CO₂. A primeira troca de meio ocorreu 72 horas após o estabelecimento da cultura, que chamaremos neste trabalho de cultura de glias (astrócitos e microglias). A segunda etapa desta cultura consiste na separação das microglias da cultura inicial. Este processo é feito 15 dias após a realização da cultura e consiste em manter a garrafa em gelo por 15 minutos seguida de “batidas” secas na parte inferior da garrafa. Após este processo o meio é recolhido e as células isoladas por centrifugação (300 g, 5 min.). As células foram semeadas em meio DMEM acima descrito, plaqueadas a 1x10⁵ células/poço e mantidas a 37 °C, 5 % de CO₂ em placas de 96 poços ou *chamber slides* de 8 poços. O meio foi trocado a cada 48 horas e os ensaios de fagocitose foram realizados no sétimo dia após a separação das células.

Protocolo Experimental

Culturas de células granulares e culturas de microglias de cerebelo foram incubadas com LPS (100 ng/mL) na presença ou ausência de minociclina (bloqueador de microglia) (300 μ M) por 12 horas, a fim de avaliar a produção de melatonina no meio de cultura. O aumento da capacidade fagocítica de microglias foi avaliado a partir da incubação destas células com melatonina (30 e 100 nM, 30 min.). Para avaliar se o efeito da melatonina sobre a fagocitose é dependente de receptor foi utilizado o bloqueador de receptores de melatonina, luzindol (1 nM - 3 μ M, 30 min.) na ausência ou presença de melatonina 30 nM. Zimosan fluorescente (1×10^5 partículas) foi adicionado as células durante o ensaio de fagocitose a 37 °C por 75 minutos. Em todo o experimento o grupo controle foi tratado com veículo de melatonina (etanol a 0,005 %); veículo de luzindol (etanol a 0,01 %), veículo de minociclina (meio) e/ou veículo de LPS (meio).

Dosagem de Melatonina

A dosagem da melatonina foi feita através de kit comercial de ELISA (RE45021, IBL, Hamburg, Alemanha).

Ensaio de fagocitose

Para analisar a modulação da melatonina sobre a atividade fagocítica, as células foram inicialmente tratadas com melatonina (30 e 100 nM) por 30 minutos, seguida da incubação com zimosan (1×10^5 partículas) por 75 minutos. No caso de ensaios para avaliar o bloqueio de receptores de melatonina, luzindol (1 nM - 3 μ M, 30 min) foi adicionado à cultura 30 minutos antes da incubação com melatonina (30 nM). Após os períodos de incubação as células foram fixadas em acetona/metanol (1:1, 15 min., 20°C). As lâminas foram analisadas em microscópio confocal (LSM 510, Cambridge, Reino Unido) usando uma

lente objetiva de 63 vezes de aumento com imersão em água. O zimosan conjugado com Alexa Fluor 594 fluorescente foi excitado com laser HeNe 543 e a emissão de fluorescência medida a 560-615 nm. Fotografias foram tiradas aleatoriamente a partir de quatro campos de cada poço com resolução de 1024 x 1024 pixels com parâmetros fixos (pinhole, velocidade de digitalização e potência do laser). Foi adotado como critério de contagem, as células que fagocitaram uma ou mais partículas de zimosan.

Imunocitoquímica

Microglias cerebelares foram fixadas com paraformaldeído (4 %, - 20 °C), lavadas com tampão fosfato (PBS: NaCl 125 mM, Na₂HPO₄ 2 mM, NaH₂PO₄ 2 mM, KCl 5 mM) e incubadas com solução de bloqueio (PBS, soro albumina bovina 1 % e glicina 0,3 M, 60 min.). Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo monoclonal primário de camundongo ED-1 (marcador de microglia) (1:100) por 18 horas, seguida da incubação com o anticorpo secundário anti-camundongo TRITC (1 : 200) por 60 minutos. Por fim, as células foram lavadas com PBS antes que as lâminas fossem finalmente montadas com PBS e glicerol (1:1).

A fluorescência foi analisada em microscopia confocal (LSM 510, Carl Zeiss, New York, NY, EUA) equipado com objetiva de imersão em óleo com aumento de 40x e o laser HeNe (543 nm) para excitação. Para quantificar a fluorescência, foi utilizado o software LSM510 (Carl Zeiss, LSM510). Cinco imagens foram escolhidas aleatoriamente e fotografadas (1024 x 1024 pixels) em cada poço. Todos os parâmetros, incluindo abertura do *pinhole*, velocidade de escaneamento e potência do laser permaneceram o mesmo durante todo o experimento.

Análises estatísticas

Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão (e.p.m.). A comparação entre as médias foi feita por análise de variância seguida de pós-teste de Newman-Keuls quando mais de duas médias foram comparadas. A comparação de duas médias foi feita pelo teste “t” de Student.

RESULTADOS

Síntese de melatonina por cultura de células granulares de cerebelo

Culturas de células granulares mistas que contêm uma baixa quantidade de astrócitos e microglia sintetizam melatonina. O dado aqui apresentado foi publicado na tese de Franco, 2014 e será descrito em detalhes para facilitar a compreensão dos resultados obtidos no presente trabalho.

Foi observado que células cultivadas por 7 dias eram capazes de produzir melatonina. O protocolo usado foi dosar melatonina 6 e 12 horas após a troca do meio de cultura no dia do experimento. A primeira observação foi um aumento significativo ($p < 0,05$) na quantidade de melatonina no meio de cultura entre 6h ($7,30 \pm 3,80$ pg/mL, $n = 3$) e 12 horas ($18,22 \pm 1,88$ pg/mL; $n = 6$) (figura 5). A incubação com LPS (30 ng/mL – 1 µg/mL) foi mais efetiva quando feita por 12 horas, visto que com apenas 6 horas de incubação não houve uma mudança da quantidade de melatonina presente no meio de cultura, já no caso de 12 horas, observamos um aumento de cerca de 60 % a partir da concentração de 30 ng/mL. Avaliando-se os efeitos mediados por 12 horas de incubação com concentrações crescentes de LPS pudemos observar que não há regressão, indicando que a concentração de 30 ng/mL já representa a resposta máxima (figura 5). Portanto, concluímos que LPS induz a produção de melatonina como um efeito tardio e, desta forma, passamos a usar o tempo de 12 horas de incubação nos demais experimentos.

Figura 5 – Síntese de melatonina por cultura de células granulares de cerebelo. A melatonina foi dosada no meio de culturas de célula incubadas com veículo ou LPS (30 ng/mL – 1 μ g/mL) por 6 (triângulo) ou 12 (círculo) horas. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

O bloqueio da atividade da microglia com o antagonista seletivo minociclina (300 μ M, 12 h) inibiu a síntese de melatonina induzida por LPS (100 ng/mL, 12 h), mas não alterou a produção basal (figura 6). Portanto, a produção basal não é dependente de microglia, enquanto a microglia ativada por LPS é capaz de sintetizar esta indolamina.

Figura 6- Bloqueio da microglia diminui a síntese de melatonina em cultura de células granulares de cerebelo desafiadas com LPS. A melatonina foi dosada em meio de cultura de células incubadas com LPS (100 ng/mL) na presença ou ausência de minociclina (300 μ M) por 12 horas. * $p < 0,05$ em relação ao veículo na ausência de minociclina e # $p < 0,05$ em relação ao LPS. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão (e.p.m.), $n = 3$.

Síntese de Melatonina por microglia em cultura

Para comprovar que a microglia era capaz de sintetizar melatonina foi estabelecida uma cultura específica para este tipo celular. Inicialmente obtivemos uma cultura de glias: astrócitos (seta azul) e microglias (seta vermelha) (figura 7A) e, posteriormente, as microglias (figura 7B) foram separadas desta cultura através de um processo mecânico de suspensão apenas das microglias, visto que os astrócitos aderem de forma mais efetiva à placa. A cultura enriquecida em microglias não marcou para GFAP e apresentou uma morfologia característica e marcação com ED-1, ligante específico para microglia (figura 7B). Esta cultura, após 12 horas de troca do meio produziu $15,1 \pm 2,9$ pg/mL ($n = 3$) de melatonina.

Figura 7- Imagens representativas de cultura de glia (astrócito e microglia) e microglia isolada. (A) Cultura de glia: astrócitos (seta azul) e microglias (seta vermelha). Os astrócitos apresentam-se com prolongamentos característicos, com aspecto estrelado; as microglias apresentam-se como células redondas e brilhantes. (B) Cultura de microglias marcada com ED-1. Seta verde: partícula internalizada de zimosan.

Melatonina e a fagocitose

Para avaliar a funcionalidade das microglias e a importância da melatonina produzida por estas células avaliamos a capacidade de melatonina exógena e endógena de controlar a fagocitose de partículas de zimosan (1×10^5 partículas, 75 min.). Microglias incubadas com 30 ou 100 nM de melatonina por 30 minutos tiveram sua capacidade fagocítica aumentada em 50 e 100 %, respectivamente (figura 8).

O antagonista seletivo de receptores de melatonina, luzindol (1nM – 1 µM) foi capaz de bloquear tanto o efeito da melatonina exógena (30 nM) quanto da melatonina endógena

O efeito da melatonina exógena (30 nM) foi inibido de maneira dependente da concentração na presença do antagonista de receptores de melatonina, luzindol (1 nM – 1 µM) (figura 9).

Figura 8 – Melatonina aumenta a fagocitose de partículas de zimosan por microglias cerebelares. Microglias foram incubadas com melatonina (30 e 100 nM) durante 30 minutos antes da adição do zimosan (1×10^5 partículas, 75 min.). No topo: imagens representativas da fagocitose de partículas amarelas de zimosan em culturas tratadas com melatonina (0 – 100 nM). Abaixo: quantificação do aumento da fagocitose de partículas de zimosan na presença de melatonina 30 e 100 nM. Os dados foram expressos como $\pm$ e.p.m.; $n=3$.

Figura 9: Bloqueio dos receptores de melatonina inibe o aumento da fagocitose por microglias cerebelares. Microglias foram pré-incubadas com luzindol (1 nM – 3 μ M) na ausência (quadrados azuis) ou presença (círculos marrons) de melatonina (30 nM). A seguir adicionou-se zimosan (1×10^5 partículas) que foi incubado por 75 minutos. Os dados foram expressos como $\pm$ e.p.m.; $n=3$

DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliamos a possibilidade de síntese de melatonina por cultura de células do cerebelo e sua relevância na proteção do SNC. Demonstramos que a microglia produz melatonina e que esta favorece a fagocitose de zimosan. Além disso, observamos que a melatonina atua em GPCRs, visto que o aumento de fagocitose por microglia é bloqueado com o antagonista competitivo de receptores de melatonina, luzindol.

Inicialmente, verificamos a síntese de melatonina em cultura de células granulares de cerebelo, composta predominantemente por neurônios granulares e em menor quantidade por astrócitos e microglias. Nesta cultura a melatonina é sintetizada em condições basais e a concentração produzida durante 12 horas é aproximadamente o dobro da sintetizada durante 6 horas, indicando uma taxa de produção estável.

Para estudar o efeito do LPS sobre a produção de melatonina, utilizamos inicialmente os dois tempos de incubação (6 e 12 h) e verificamos que apenas após 12 horas houve um aumento significativo da quantidade de melatonina acumulada no meio de cultura. Considerando que a melatonina e seus derivados são agentes anti-inflamatórios e antioxidantes (Reiter *et al.*, 2008; Kaur e Ling, 2008; Hardland *et al.*, 2009) e que protege o cerebelo contra morte celular (Pinato *et al.*, 2013), podemos inferir que esta produção tardia induzida por LPS está relacionada à proteção do cerebelo. Além disso, em outros modelos de células fagocíticas (macrófagos de linhagem RAW 264.7) a ativação de NF- κ B por LPS induz a transcrição do gene que codifica a enzima AA-NAT (Muxel *et al.*, 2012). Desta forma, parece interessante verificar se as microglias presentes neste cultivo poderiam participar da produção de melatonina.

A colaboração das microglias na produção de melatonina foi testada através de duas estratégias. A primeira foi bloquear a atividade das microglias na cultura de células granulares com minociclina e a outra foi utilizar culturas puras de microglias. A minociclina é um antibiótico do grupo das tetraciclinas capaz de impedir a ativação de microglias através da inibição de várias MAPKs (do inglês *mitogen-*

activated protein kinase), que são quinases que fosforilam em serina e treonina, tais como p38, JNK 1/2 (do inglês *c-Jun-N-terminal activated protein kinase*) e ERK 1/2 (do inglês *extracellular signal regulated kinase*), além da degradação do inibidor de NF- κ B (I κ B α) (Nikodemova *et al.*, 2006). Como estes fagócitos podem exibir diferentes estados de ativação, o resultado do bloqueio de microglias depende do contexto tecidual e do tipo de estimulação ou doença pré-existente (Wang *et al.*, 2004; Nikodemova *et al.*, 2006; Lalancette-Hérbert *et al.*, 2007; Yune *et al.*, 2007), por isso, resolvemos usar os dois modelos para testar a produção de melatonina pela microglia.

O aumento na produção de melatonina em cultura de células granulares de cerebelo incubadas com LPS por 12 horas foi bloqueado por minociclina, sugerindo que a microglia ativada por LPS é responsável pelo aumento da produção de melatonina. A síntese de melatonina na ausência de LPS não é afetada por minociclina, sugerindo que outras células presentes na cultura possam estar produzindo esta indolamina em condições basais. Alguns autores mostraram que astrócitos são capazes de expressar a enzima AA-NAT quando estimulados por LPS (Pinato *et al.*, 2013) ou por isquemia cerebral transiente (Park *et al.*, 2010), porém tais trabalhos não relacionam este aumento de expressão de AA-NAT com a produção de melatonina. Pinato e colaboradores (2013) dosaram a concentração de melatonina em córtex e hipocampo, tecidos em que AA-NAT era expressa após administração intracerebroventricular de LPS. A concentração de melatonina era significativamente reduzida, após a pinealectomia sugerindo que apesar de astrócitos e microglias deste tecido expressarem AA-NAT não ocorria a síntese da indolamina de interesse. No entanto, outros autores demonstraram que astrócitos provenientes de córtex de ratos mantidos em cultura por 10 dias ou células C6, que são uma linhagem proveniente de astrócitos, produzem melatonina e expressam as enzimas AA-NAT e HIOMT (Liu *et al.*, 2007). Estes resultados foram obtidos com células não estimuladas, sugerindo que nos dados obtidos no presente trabalho, a produção de melatonina

residual, após a inibição da microglia com minociclina, pode ser derivada de astrócitos.

Em cultura de microglias cerebelares avaliamos o papel da melatonina sintetizada por estas células na fagocitose. O bloqueio dos receptores de melatonina MT₁ e MT₂, com o antagonista não-seletivo luzindol, mostra que houve uma diminuição da fagocitose de partículas de zimosan por microglias de forma concentração-dependente, indicando que a melatonina produzida pela microglia atua na fagocitose. Um possível mecanismo é que a melatonina atue aumentando a expressão de dectina-1, receptor responsável pela internalização de zimosan (Pires-Lapa *et al.*, 2013), que também é expressa na superfície de microglias primárias de murinos (Shah *et al.*, 2008). Podemos considerar também que a síntese de melatonina por microglias, seja uma resposta a internalização de zimosan via dectina-1, onde a melatonina produzida aja de forma autócrina, regulando a própria expressão deste receptor que, conseqüentemente, aumenta a fagocitose. A indução da síntese de melatonina por células imunocompetentes parece ter em comum uma resposta à ativação de PAMPs. Pontes e colaboradores (2006) mostraram que *Escherichia coli* induz a síntese de melatonina por células mononucleares do colostro humano, que não é mais sintetizada após a morte da bactéria.

Em nosso trabalho também constatamos que a melatonina exógena é capaz de aumentar a fagocitose de microglias que, por sua vez, foi inibida por luzindol de maneira dose-dependente. Considerando a fagocitose como um processo de defesa dentro da imunidade inata, a descoberta de que a melatonina possa aumentar este efeito é um dado relevante. Ademais, o efeito citoprotetor da melatonina, embora não correlacionado com a fagocitose, é observado em outros trabalhos, como a inibição da produção de NO em macrófagos (Gilad *et al.*, 1998) e diminuição da translocação do fator de transcrição NF-kB ao núcleo em microglias e em cultura de células granulares de cerebelo (Min *et al.*, 2012; Franco e Markus, 2014). Dessa forma, apesar de ainda não ter sido testado no modelo celular utilizado neste trabalho, é muito

provável que a melatonina produzida por microglia do cerebelo exerça estas funções e que este conjunto de ações é que conferem ao cerebelo uma proteção diferencial em relação ao córtex e ao hipocampo quando estimulados diretamente com LPS (Pinato *et al.*, 2013).

Em resumo, nossos dados mostram que as microglias sintetizam melatonina que atua potencializando a fagocitose destas células. Estas informações são importantes porque, embora o papel imunomodulatório da melatonina já esteja bem estabelecido, é a primeira vez que a síntese desta indolamina e o seu papel em microglias é descrito. Por fim, sabendo-se que estas células são macrófagos residentes no SNC responsáveis pela “limpeza” do ambiente neural, a descoberta de que há uma nova molécula sendo sintetizada por microglias, a melatonina, e que esta atua de forma a potencializar a ação primária destas células, a fagocitose, fica evidente a relevância que este trabalho pode trazer em muitas áreas, como em estudos com doenças neuroinflamatórias.

CONCLUSÃO

A microglia obtida de culturas de células granulares de ratos é capaz de sintetizar melatonina e, muito provavelmente é a fração celular responsável pela proteção que a ativação de receptores de melatonina MT_1 e MT_2 exerce sobre o cerebelo de ratos expostos ao LPS. Além disso, a melatonina sintetizada por microglias ativadas potencia a capacidade fagocítica destas células, o que sugere que a mesma facilita limpeza dos tecidos adjacentes.

PERSPECTIVA

A melatonina pode ser sintetizada no sistema nervoso central por células de defesa e, portanto, esta dissertação abre importante perspectiva para entender o papel da melatonina como um protetor do sistema nervoso central em doenças baseadas em repostas inflamatórias, como doença de Alzheimer e câncer.

RESUMO

A melatonina é uma indolamina sintetizada principalmente pela glândula pineal, cuja função está associada à marcação do escuro. Além deste papel cronobiótico, a melatonina também tem papel na defesa e é sintetizada por outros sítios podendo exercer ação parácrina e autócrina, como em células imunocompetentes. Concentrações substancialmente elevadas de melatonina são encontradas no líquido cefalorraquidiano (LCR) que tem sido vinculada à síntese de melatonina por células do sistema nervoso central (SNC), como as microglias. Sabendo-se que estas células são os macrófagos residentes no SNC e que a síntese de melatonina por estes fagócitos já é comprovada, nosso trabalho teve por objetivo avaliar se microglias cerebelares sintetizam essa indolamina e se esta atua potencializando a fagocitose destas células. Nossos resultados mostram que o bloqueio dos receptores de melatonina com o antagonista luzindol, diminuiu tanto a fagocitose induzida por melatonina exógena, quanto à fagocitose basal, indicando que há síntese de melatonina por microglias cerebelares que, por sua vez, age na fagocitose. Esses resultados são relevantes e indicam que a melatonina sintetizada pela microglia, pode estar relacionada com a homeostase do ambiente neural. Sendo assim, nossos dados podem contribuir com estudos que estabeleçam novas estratégias terapêuticas para doenças neuroinflamatórias.

ABSTRACT

Melatonin is an indolamine synthesized primarily by the pineal gland, whose function is associated with the marking of the dark phase. Beyond this chronobiotic function, melatonin also plays a role in defense and is synthesized by other sites. It may exert paracrine and autocrine action, like in immunocompetent cells. High substantial concentrations of melatonin are found in the cerebrospinal fluid (CSF) that has been linked to the synthesis of melatonin by the central nervous system cells (CNS), such as microglia. Knowing that these cells are the resident macrophages in the CNS and that melatonin synthesis by these phagocytes is proven, our study aims to assess whether cerebellar microglia synthesize this indolamine and whether this acts enhancing phagocytosis of these cells. Our results show that blocking the melatonin receptors with the antagonist, luzindole, both the exogenous melatonin-induced phagocytosis and the basal phagocytosis decreased, indicating that there is melatonin synthesis by cerebellar microglia which acts on phagocytosis. These results are significant and indicate that melatonin synthesized by microglia may be related to the neural environment homeostasis. In this way, our data can contribute, for example, in studies to establish new therapeutic strategies for neuroinflammatory diseases.

REFERÊNCIAS

ADAMAH-BIASSI EB, ZHANG Y, JUNG H, VISSAPRAGADA S, MILLER RJ, DUBOCOVICH ML. Distribution of MT1 melatonin receptor promoter-driven RFP expression in the brains of BAC C3H/HeN transgenic mice. *J Histochem Cytochem*, 2014; 62: 70-84.

AL-GHOUL WM, HERMAN MD, DUBOCOVICH ML. Melatonin receptor subtype expression in human cerebellum. *Neuroreport*, 1998; 4063-4068.

ARENDT J. Melatonin and the Mammalian Pineal Gland Chapman and Hall. London, 1995.

ARENDT J, SKENE DJ. Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med Rev*, 2005; 9: 25-39.

AXELROD J. The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science*, 1974; 28;184 (4144):1341-8.

BAGASRA O, MICHAELS FH, ZHENG YM, BOBROSKI LE, SPITSIN SV, FU ZF, TAWADROS R, KOPROWSKI H. Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; 92:12041-12045.

BALER R, COVINGTON S, KLEIN DC. The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter: cAMP activation via a cAMP-responsive element-CCAAT complex. *J. Biol. Chem*, 1997; 272: 6979-6985.

BLAUSTEIN MP. Effects of potassium, veratridine and scorpion venom on calcium accumulation and transmitter release by nerve terminals in vitro. *J. Physiol*, 1975; 247: 617-655.

BORJIGIN J, ZHANG LS, CALINESCU AA. Circadian regulation of pineal gland rhythmicity. *Mol Cell Endocrinol*. 2012; 349: 13-19.

BRAINARD GC, WATSON-WHITMEYER M, KNOBLER RL, LUBLIN FD. Neuroendocrine regulation of immune parameters. Photoperiod control of the spleen in Syrian hamster. *Ann. N.Y. Acad. Sci*, 1988; 540: 704-706.

BROWN GD, HERRE J, WILLIAMS DL, WILLMENT JA, MARSHALL ASJ, GORDON S. Dectin-1 Mediates the Biological Effects of β -Glucans. *J Exp Med*, 2003;197 (9): 1119–1124.

BUBENIK GA. Localization, physiological significance and possible clinical implication of gastrointestinal melatonin. *Biol Signals Recept*, 2001; 10: 350-366.

BUBENIK GA. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig Dis Sci*, 2002; 47: 2336-2348.

CAHILL GM, BESHARSE JC. Circadian clock functions localized in xenopus retinal photoreceptors. *Neuron*, 1993; 10: 573–577.

CARDINALI DP, LYNCH HJ, WURTMAN RJ. Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. *Endocrinology*, 1972; 91:1213-1218.

CARRILLO-VICO A, CALVO JR, ABREU P, LARDONE PJ, GARCIA MAURIÑO S, REITER RJ, GUERRERO JM. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as endocrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J*, 2004; 18: 537-539.

CARRILO-VICO A, LARDONE PJ, ALVAREZ-SANCHES N, RODRIGUEZ-RODRIGUEZ A, GUERREIRO JM. Melatonin: buffering the immune system. , *Int J Mol Sci*, 2013; 14(4):8638-83.

CARRILLO-VICO A, GUERRERO JM, LARDONE PJ, REITER RJ. A review of the multiple actions of melatonina on the immune system. *Endocrine*, 2005; 27,189-200.

CARVALHO-SOUSA CE, da SILVEIRA CRUZ-MACHADO S, TAMURA EK, FERNANDES PA, PINATO L, MUXEL SM, CECON E, MARKUS RP. Molecular basis for defining the pineal gland and pinealocytes as targets for tumor necrosis factor. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2011; 2:10.

CHERRY JD, OLSCHOWKA JA, O'BANJON. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation*, 2014; 11: 98.

CHIANG CS, MCBRIDE WH, WITHERS HR. Radiation-induced astrocytic and microglial responses in mouse brain. *RadiotherOncol*, 1993; 29(1):60–68.

COLTON CA. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2009; 4:399–418.

CONTESTABILE A. Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro. *Cerebellum*. 2002; 1(1):41-55.

COUTO-MORAES R, PALERMO-NETO J, MARKUS RP. The Immune-Pineal Axis: Stress as a Modulator of Pineal Gland Function. *Neuroimmunomodulation. Ann. N.Y Acad. Sci*, 2009; 1153:193-202.

CSABA G, BARATH P. Morphological changes of thymus and the thyroid gland after postnatal extirpation of pineal body. *Endocrinol Exp*, 1975; 9:59-67.

D'MELLO SR, GALLI C, CIOTTI T, CAHSSANO P. Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-growth factor I and CAMP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90: 10989-10993.

da SILVEIRA CRUZ-MACHADO S, CARVALHO-SOUSA CE, TAMURA EK et al. TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFkB pathway. *J Pineal Res* 2010; 49:183–192.

DEL RIO-HORTEGA P. El tercer elemento de los centros nerviosos. *Bio Soc Esp Biol*, 1919; 9:69–129.

DI CARLO FJ, FIORE JV. On the composition of zymosan. *Science*, 1958; 127:756–757.

DUBOCOVICH ML, MASANA MI, IACOB S, SAURI DM. Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of pharmacology*, 1997; 355(3): 365–375.

EDWARDS JP, ZHANG X, FRAUWIRTH KA, MOSSER DM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol*, 2006; 80:1298–1307.

EKSTROM P, MEISSL H. Evolution of photosensory pineal organs in new light: the fate of neuroendocrine photoreceptors. *Phil. Trans. R. Soc. Lond*, 2003; 358(1438): 1679–700.

EYO UB, DAILEY ME. Microglia: key elements in neural development, plasticity, and pathology. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2013; 8(3):494–509.

FADOK VA, VOELKER DR, CAMPBELL PA, COHEN JJ, BRATTON DL, HENSON PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol*, 1992; 148, 2207–2216.

FERNANDES PA, CECON E, MARKUS RP, FERREIRA ZS. Effect of TNF- α on the melatonina synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a feedback of the immune response on circadian timing. *J Pineal Res*, 2001; 41(4):344-350.

FERNANDES PA, BOTHOREL B, CLESSE D, MONTEIRO AW, CALGARI C, RAISON S, SIMONNEAUX V, MARKUS RP. Local corticosterone infusion enhances nocturnal pineal melatonina im vivo. *J Neuroendocrinology*, 2009; 21:90-97.

FERREIRA ZS, FERNANDES PA, DUMA D, ASSREUY J, AVELLAR MC, MARKUS RP. Corticosterose modulates noradrenaline-induced melatonina synthesis through inhibition of nuclear factoe kappa B. *J Pineal Res*, 2005; 38(3):182-188.

FRANCO DG. Efeito da Melatonina Sobre a Viabilidade de Células Granulares de Cerebelo em Cultura Depende do Contexto Celular. Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2014.

FRANCO DG, MARKUS RP. The cellular context determines the effect of melatonin on the survival of cerebellar granule cells. *Plos One*, 2014.

FRANK-CANNON TC, ALTO LT, MCALPINE FE, TANSEY MG. Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? *Mol Neurodegener*, 2009, 4:47.

FU R, SHEN Q, XU P, LUO JJ, TANG Y. Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases. *Mol Neurobiol*, 2014; 49(3):1422-34.

GADANI SP, CRONK JC, NORRIS GT, KIPNIS J. IL-4 in the brain: a cytokine to remember. *J Immunol*, 2012; 189:4213–4219.

GALLI C, MEUCCI O, SCORZIELLO A, WERGE TM, CALISSANO P, SCHETTINI G. Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin, and IGF-1 through distinct mechanisms of action: the involvement of intracellular calcium and RNA synthesis. *J Neurosci*, 1995; 15: 1172-1179.

GALLO V, KINGSBURY A, BALAZS R, JORGENSEN OS. (1987). The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci*, 1987; 7: 2203-2213.

GARDAI SJ, MCPHILLIPS KA, FRASCH SC, JANSSEN WJ, STAREFELDT A, MURPHY-ULLRICH JE, BRATTON DL, OLDENBORG PA, MICHALAK M, AND HENSON PM. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell*, 2005; 123, 321-334.

GEPDIREMEN A, DUZENLI S, HACIMUFTUOGLU A, BULUCU D, SULEYMAN H. The effects of melatonin in glutamate-induced neurotoxicity of rat cerebellar granular cell culture. *Jpn J Pharmacol*, 2000; 84: 467-469.

GERN WA, RALPH CL. Melatonin synthesis by the retina. *Science*, 1979; 204: 183184.

GILAD E, WONG HR, ZINGARELLI B, VIRAG L, O'CONNOR M, SAIZAMAN AL, SZABO C. Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFkappaB activation. *FASEB Journal*, 1998; 12,685-693.

GINDERACHTER, JoA, MOVAHEDI K, GHASSABEH GH, MEERSCHAUT S, BESCHIM A, RAES G, BAETSELIER PD. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: Picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology*, 2006; 211,487-501.

GOMES-LEAL W. Microglial physiopathology: how to explain the dual role of microglia after acute neural disorders? *Brain Behav*, 2012; 2(3):345-56.

GORDON S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*, 2003; 3:23–35.

GUILHERMIN GJ, BREW BJ. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leukoc Biol*, 2004; 75(3):388-97.

HARDELAND R. Melatonin: signaling mechanisms of a pleiotropic agent. *Biofactors*, 2009; 35: 183-192.

HARDELAND R. Neurobiology, pathophysiology, and treatment of melatonin deficiency and dysfunction. *Scientific World Journal*, 2012; 640389.

HARRY GJ, KRAFT AD. Microglia in the developing brain: a potential target of lifetime effects. *Neurotoxicology*, 2012; 33(2): 191-206.

HARRY GJ, KRAFT AD. Neuroinflammation and microglia: considerations and approaches for neurotoxicity assessment. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2008; 4(10):1265-77.

IMBESI M, UZ T, DZITOYEVA S, GIUSTI P, MANEV H. Melatonin signaling in mouse cerebellar granule cells with variable native MT₁ and MT₂ melatonin receptors. *Brain Res*, 2008; 1227: 19-25.

JANKOVIC BD, KNERZEVIC Z, KOJIC L, NIKOLIC V. Pineal gland and immune system. Immune function in the chick embryo pinealectomised at 86 h of incubation. *Ann. N.Y. Acad. Sci*, 1994; 719: 398-409.

KALSBECK A, GARIDOU ML, PALM IF, VAN DER VLIET J, SIMONNEAUX V, PEVET P, BUIJS RM. Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *Eur. J. Neurosci*, 2000; 12: 3146-3154.

KAUR C, LING EA. Antioxidants and neuroprotection in the adult and developing central nervous system. *Curr Med Chem*, 2008; 15:3068-3080.

KAWAMOTO EM, LEPSCH LB, BOAVENTURA MF, MUNHOZ CD, LIMA LS, YSHII LM, AVELLAR MC, CURI R, MATTSON MP, SCAVONE C. Amyloid beta-peptide activates nuclear factor-kappaB through an N-methyl-D-aspartate signaling pathway in cultured cerebellar cells. *J Neurosci Res*, 2008; 86:845-860.

KETTENMANN H, HANISCH UK, NODA M, VERKHRATSKY A. Physiology of microglia. *Physiol Rev*, 2011; 91:461-553.

KLEIN DC, AUERBACH DA, NAMBOODIRI MAA, WHELER GHT. Indole metabolism in the mammalian pineal gland. *The Pineal Gland*, 1981; 199-227.

KLEIN DC, SUGDEN D, WELLER JL. Postsynaptic alpha-adrenergic receptors potentiate the beta-adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983; 80:599-603.

KRAFT AD, HARRY GJ. Features of microglia and neuroinflammation relevant to environmental exposure and neurotoxicity. *Int J Environ Res Public Health*, 2011; 8(7) 2980-3018.

LALANCETTE-HE´BERT M, GOWING G, SIMARD A, WENG YC, KRIZ J. Selective Ablation of Proliferating Microglial Cells Exacerbates Ischemic Injury in the Brain. *The Journal of Neuroscience*, 2007; 27:2596 -2605.

LAUDON M, NIR I, ZISAPEL N. Melatonin receptors in discrete brain areas of the male rat. Impact of aging on density and on circadian rhythmicity. *Neuroendoc*, 1988; 48: 577-583.

LEGROS C, CHESBEAUS D, BOUTIN JA, MALPAUX B. Melatonin from cerebrospinal fluid but not from blood reaches sheep cerebral tissues under physiological conditions. *J Neuroendocrinol*, 2014; 26(3):151-63.

LESTON J, HARTHÉ C, BRUN J, MOTTOLESE C, MERTENS P, SINDOU M, CLAUSTRAT B. Melatonin is released in the third ventricle in humans. A study in movement disorders. *Neurosci Lett*, 2010; 469:294-297.

LIU YJ, ZHUANG J, ZHU HY, SHEN YX, TAN ZL, ZHOU JN. Cultured rat cortical astrocytes synthesize melatonin: absence of a diurnal rhythm. *J Pineal Res*, 2007; 43: 232-238.

LOANE DJ, BYRNES KR. Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics*, 2010; 7(4):366-377 12.

LONDON A, COHEN M, SCHWARTZ M. Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. *Front Cell Neurosci*, 2013; 8:7:34.

LONGATTI P, PERIN A, RIZZO V, COMAI S, GIUSTI P, COSTA CV. Ventricular cerebrospinal fluid melatonin concentrations investigated with an endoscopic technique. *J Pineal Res*, 2007; 42:113-118.

LONG-SMITH CM, SULLIVAN AM, NOLAN YM. The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 2009; 89(3):277-287 7.

LOPES C, DELYRA JL, MARKUS RP, MARIANO M. Circadian rhythm in experimental granulomatous inflammation is modulated by melatonin. *J. Pineal Res*, 1997; 23(2):72-78.

LOPES C, MARIANO M, MARKUS RP. Interaction between the adrenal and the pineal gland in chronic experimental inflammation induced by BCG in mice. *Inflamm. Res*, 2001; 50(1):6-11.

LOTUFO CM, LOPES C, DUBOCOVICH ML, FARSKY SH, MARKUS RP. Melatonin and N-acetyserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur J Pharmacol*, 2001; 430(2-3):351-357.

LOTUFO CM., YAMASHITA CE., FARSKY SH., MARKUS RP. Melatonin effect on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B4. *Eur J Pharmacol*, 2006 534:258-263.

LUO XG, DING JQ, CHEN SD. Microglia in the aging brain: relevance to neurodegeneration. *Mol Neurodegener*, 2010; 24, 5:12.

MAESTRONI GJM. The photoperiod transducer melatonin and the immune-hematopoietic system. *Photochem Photobio*, 1998; 43(3):186-92.

MANTOVANI A, SICA A, SOZZANI S, ALLAVENA P, VECCHI A, LOCATI M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, 2004; 25:677-686.

MARKUS RP, FERREIRA ZS, FERNANDES PA, CECON E. The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *Neuro Immuno Modulation*, 2007; 14:126-133.

MARKUS RP, CECON E, PIRES-LAPA, MA. Immune-Pineal Axis: Nuclear Factor κ B (NF- κ B) Mediates the Shift in the Melatonin Source from Pinealocytes to Immune Competent Cells. *Int J Mol Sci*, 2013; 24:10979-10997.

MARTIN SJ, REUTELINGSPERGER CP., MCGAHON AJ, RADER JA, VAN SCHIE RC, LAFACE DM, GREEN DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med*, 1995; 182, 1545-1556.

MARTINEZ FO, SICA A, MANTOVANI A, LOCATI M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*, 2008; 13:453-461.

MIN KJ, JANG JH, KWON TK. Inhibitory effects of melatonin on the lipopolysaccharide-induced CC chemokine expression in BV2 murine microglial cells are mediated by suppression of Akt-induced NF- κ B and STAT/GAS activity. *J Pineal Res*, 2012; 52:296-304.

MOLLER M, BAERES FM. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell. Tissue Res*, 2002; 309:139-150.

MOSSER DM, EDWARD JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, 2008; 8(12):958-69.

MRAK RE. Microglia in Alzheimer brain: a neuropathological perspective. *Int J Alzheimers Dis*, 2012; 2012:165021.

MUXEL SM, PIRES-LAPA MA, MONTEIRO AW, CECON, E, TAMURA EK, FLOETER-WINTER, LM, MARKUS, RP. NF κ B drives the synthesis of melatonin in RAW 264.7 macrophages by inducing the transcription of the arylalkylamine- N-acetyltransferase (AA-NAT) gene. *PLoS ONE* 2012; 7:e52010.

NAPOLI I, NEUMANN H. Protective effects of microglia in multiple sclerosis. *Exp Neurol* 2010; 225(1):24–28 9.

NELSON RJ, DEMAS GE. Role of melatonin in mediating seasonal energetic and immunologic adaptations. *Brain Research Bulletin*, 1997; 44,423-430.

NIKODEMOVA M, DUNCAN ID, WATTERS JJ. Minocycline exerts inhibitory effects on multiple mitogen-activated protein kinases and I β Ba degradation in a stimulus-specific manner in microglia *Journal of Neurochemistry*, 2006; 96:314–323.

NOSJEAN O, FERRO M, COGE F, BEAUVERGER P, HENLIN JM, LEFOULON F, FAUCHERE JL, DELAGRANGE P, CANET E, BOUTIN JA. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J. Biol. Chem*, 2000; 275: 31311–31317.

PANDI-PERUMAL SR, SRINIVASAN V, MAESTRONI GJM, CARDINALI DP, POEGGELER B, HARDELAND R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS Journal*, 2006; 273: 2813–2838.

PANDI-PERUMAL SR, TRAKHT I, SRINIVASAN V, SPENCE DW, MAESTRONI GJ, ZISAPEL N, CARDINALI DP. Physiological effects of 82 melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol*, 2008; 85: 335-353.

PARK OK, YOO KY, LEE CH, CHOI JH, HWANG IK, PARK JH, KWON YG, KIM YM, WON MH. Arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) is expressed in astrocytes and melatonin treatment maintains AANAT in the gerbil hippocampus induced by transient cerebral ischemia. *J Neurol Sci*, 2010; 15:7-17.

PEDERSEN EB, FOX LM, CASTRO AJ, MCNULTY JA. Immunocytochemical and electron-microscopic characterization of macrophage/microglia cells and expression of class II major histocompatibility complex in the pineal gland of the rat. *Cell Tissue Res*, 1993; 272(2): 257-265.

PINATO L, da SILVEIRA CRUZ-MACHADO S, FRANCO DG, CAMPOS LMG, CECON E, FERNANDES PACM, BITTENCOURT JC, MARKUS RP. Selective protection of the cerebellum against intracerebro ventricular (icv) LPS is mediated by a local synthesis of melatonin. *Brain Structure and Function*, 2013.

PIRES-LAPA MA, TAMURA EK, SALUSTIANO EM, MARKUS, RP. Melatonin synthesis in human colostrum mononuclear cells enhances dectin-1-mediated phagocytosis by mononuclear cells. *J Pineal Res* 2013; 55:240-246.

POLAZZI E, GIANNI T, CONTESTABILE A. Microglial cells protect cerebellar granule neurons from apoptosis: evidence for reciprocal signaling. *Glia*, 2001; 36(3):271-80.

PONTES GH, CARDOSO EC, CARNEIRO-SAMPAIO MM, MARKUS RP. Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) – melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. *Journal of Pineal Research*, 2006; 41,136-141.

PROKOP S, MILLER KR, HEPPNER FL. Microglia actions in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 2013; 126(4):461-477 6.

REITER RJ, CALVO JR, KARBOWNIK M, QI W, TAN DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2000; 917,376-386.

REITER RJ, PAREDES SD, KORKMAZ A, MANCHESTER LC, TAN DX. Melatonin in relation to the "strong" and "weak" versions of the free radical theory of aging. *Adv Med Sci*, 2008; 53:119-129.

REPPERT SM, WEAVER DR, EBISAWA T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*, 1994; 13: 1177-1185.

REPPER SM, GODSON C, MAHLE CD, WEAVER DR, SLAUGENHAUPT SA, GUSELLA JF. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; 92: 8734-8738.

REZENDE TMB, VIEIRA LQ, CARDOSO FP, OLIVEIRA RR, OLIVEIRA MST, JORGE MLR, RIBEIRO SOBRINHO AP. The effect of mineral trioxide aggregate on phagocytic activity and production of reactive oxygen, nitrogen species and arginase activity by M1 and M2 macrophages. *Int Endod J*, 2007; 40:603-611.

SARGSYAN SA, MONK PN, SHAW PJ. Microglia as potential contributors to motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* 2005; 51(4):241-253 8.

SATO T, KANEKO M, HAMA A, KUSAKARI T, FUJIEDA H. Expression of class II MHC molecules in the rat pineal gland during development and effects of treatment with carbon tetrachloride. *Cell Tissue Res*, 1996; 284: 65-76.

SHAH VB, HUANG Y, KESHWARA R, OZMENT-SKELTON T, WILLIAMS DL, KESHVARA L. Beta-glucan activates microglia without inducing cytokine production in Dectin-1-dependent manner. *J Immunol*, 2008;180:2777-2785.

SICA A, MANTOVANI A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*, 2012; 122:787-795.

SIMONNEAUX V, RIBELAYGA C. Generation of the Melatonin Endocrine Message in Mammals: A Review of the Complex Regulation of Melatonin Synthesis by Norepinephrine, Peptides, and Other Pineal Transmitters. *Pharmacological Reviews*, 2003; 55:325-395.

SKWARLO-SONTA K. Functional connections between the pineal gland and immune system. *Acta Neurobiol Exp*, 1996; 56:341-357.

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

SRINIVASAN V, SPENCE DW, TRAKHT I, PANDI-PERUMAL SR, CARDINALI DP, MAESTRONI GJ. Immunomodulation by melatonin: its significance for seasonally occurring diseases. *Neuro immune modulation*, 2008; 15,93-101.

STEFULJ J, HORTNER M, GHOSH M, SCHAUENSTEIN K, RINNER I, WOLFLER A, SEMMLER J, LIEBMANN PM. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J. Pineal Res*, 2001, 30:243-247.

STEIN M, KESHAV S, HARRIS N, GORDON S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*, 1992; 176:287-292.

STENCE N, WAITE M, DAILEY ME. Dynamics of microglial activation: A confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia*, 2001; 33:256-266.

TAJES ORDUÑA M, GABALDA CP, HORTENSI JV, LLIBERIA MP, ESPUNY AC. An evaluation of the neuroprotective effects of melatonin in an in vitro experimental model of age-induced neuronal apoptosis. *J Pineal Res*, 2009; 46(3):262-7.

TAN DX, MANCHESTER LC, BARCELO ES, MEDIAVILLA MD, REITER, RJ. Significance of high levels of endogenous melatonin in mammalian cerebrospinal fluid and in the central nervous system. *Current Neuropharmacology* 2010; 8:162-167.

TAN DX, MANCHESTER LC, TERRON MP, FLORES LJ, REITOR RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *J Pineal Res*, 2007; 42:28-42.

TAYLOR PR, BROWN GD, REID DM, WILLMENT JA, MARTINEZ-POMARES L, GORDON S, WONG SYC. The beta-glucan receptor, Dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J. Immunol*, 2002; 269:3876-3882.

TAYLOR PR, MARTINEZ-POMARES L, STACEY M, LIN HH, BROWN GD, GORDON S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 2005; 23:901-944.

TECLEMARIAM-MESBAH R, TER HORST GJ, POSTEMA F, WORTEL J, BUIJS RM. Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway. *J Comp Neurol*, 1999; 406: 171-182.

TRICOIRE H, LOCATELLI A, CHEMINEAU P., MAULPAUX B. Melatonin Enters the Cerebrospinal Fluid through the Pineal Recess. *Endocrinology*, 2002; 143:84–90.

TRICOIRE H, MOLLER M, CHEMINEAU P, MALPAUX B. Origin of cerebrospinal fluid melatonin and possible function in the integration of photoperiod. *Reprod Suppl*, 2003; 61:311-321.

TSAI SY, O'BRIEN TE, MCNULTY JA. Microglia play a role in mediating the effects of cytokines on the structure and function of the rat pineal gland. *Cell Tissue Res*, 2001; 303(3):423-431.

TSIEN RW. Calcium channel in excitable cell membrane. *Annu. Re. Physiol*, 1983; 42: 341-381.

UNDERHILL DM, OZINSKY AM, HAJJAR SA, WILSON MCB, BASSETTI AA. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*, 1999; 401:811–815.

UNDERHILL, DM, OZINSKY AM. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol*, 2002; 20:825– 852.

VARIN A, GORDON S. Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology. *Immunobiology*, 2009; 214:630–641.

VECCHIARELLI A, PULITI AM. TOROSANTUCCI AC, BISTONI F. In vitro production of tumor necrosis factor by murine splenic macrophages stimulated with mannoprotein constituents of *Candida albicans* cell wall. *Cell. Immunol*, 1991; 134:65–76.

WALDHAUSER F, WALDHAUSER M, LIEBERMAN HR, DENG MH, LYNCH HJ, WURTMAN RJ. Bioavailability of oral melatonin in humans. *Neuroendocrinol*, 1984; 39: 307-313.

WANG Q, ROWAN MJ, ANWYL R. Beta-amyloid-mediated inhibition of NMDA receptor-dependent long-term potentiation induction involves activation of microglia and stimulation of inducible nitric oxide synthase and superoxide. *J Neurosci*, 2004; 24:6049-6056.

WITT-ENDERBY PA, BENNETT J, JARZYNSKA MJ, FIRESTINE S, MELAN MA. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci*, 2003; 72: 2183–2198.

YENARI MA, KAUPPINEN TM, SWANSON RA. Microglial activation in stroke: therapeutic targets. *Neurotherapeutics*, 2010; 7(4):378– 391 11.

YUNE TY, LEE JY, JUNG GY, KIM SJ, JIANG MH, KIM YC, OH YJ, MARKELONIS GJ, OH TH. Minocycline all eviates death of oligodendrocytes by inhibiting pro-nerve growth factor production in microglia after spinal cord injury. *J Neurosci*, 2007; 27:7751-7761.

ZLOTOS DP, JOCKERS R, CECON E, RIVARA . WITT ENDERBY PA. MT(1) and MT(2) Melatonin Receptors: Ligands, Models, Oligomers, and Therapeutic Potential. *J Med Chem*, *in press*, 2013.

SÚMULA CURRICULAR

ADRIESSA APARECIDA DOS SANTOS***Informações Pessoais***

Sexo: *Feminino*

Data e local e nascimento: *16/03/1986 - Arujá, São Paulo.*

Nacionalidade: *Brasileira*

Endereço eletrônico: *adriessasantos@yahoo.com.br*

Endereço residencial: *Avenida Rio de Janeiro, 93. Parque Santa Tereza. Santa Isabel – SP – Brasil – 07500-000*

Telefones: *(11) 97367 3801 (11) 4656 2262*

Formação Acadêmica

2012 - Atual

Mestranda no curso de Fisiologia Geral.

Instituição: *Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil.*

Título: *Melatonina sintetizada por microglias de cerebelo em cultura regula o processo de fagocitose.*

Orientadora: *Regina Pekelmann Markus- Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.*

Bolsas: *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/ Processo: 130249/2012-2).*

2014 - Atual

Pós-graduação em Neuroeducação

Instituição: *Instituto de Neuroeducação - Associada à Faculdade de Conchas (FACON)*

2007 - 2010

Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas

Instituição: *Universidade de Mogi das Cruzes, UMC, São Paulo, Brasil.*

Título da iniciação científica: *Efeito de fragmentos de heparina sobre arritmia induzida eletricamente em átrio isolado de ratos jovens.*

Orientador: *Carlos Marcelo Gurjão de Godoy - Universidade de Mogi das Cruzes, UMC, São Paulo, Brasil.*

Bolsas: *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).*

Histórico Profissional

INSTITUTO DE EDUCAÇÃO ATHENAS - Arujá, São Paulo.

Atual

Cargo: Coordenadora Pedagógica - Sistema ETAPA

INSTITUTO DE EDUCAÇÃO ATHENAS - Arujá, São Paulo.

Atual

Cargo: Docente de Cursos Técnicos

SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM COMERCIAL – SENAC - GUARULHOS, São Paulo.

2011 - 2012

Cargo: Docente do Curso Jovem Aprendiz

PRÉ-VESTIBULAR DA ASSOCIAÇÃO AFRO BRASILEIRA DA PARÓQUIA NOSSA SENHORA APARECIDA – SANTA ISABEL / SP

2011 - 2012

Cargo: Docente Voluntária de Biologia

PREFEITURA MUNICIPAL DE MOGI DAS CRUZES, São Paulo.

2010 - 2011

Cargo: Estagiária na Secretaria do Verde e Meio Ambiente

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES – UMC, São Paulo.

2009 - 2010

Cargo: Aluno de Iniciação Científica - Desenvolvimento de um projeto com bolsa financiado pelo CNPq na área de Engenharia Biomédica no Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca do Núcleo de Pesquisas Tecnológicas (NPT) da Universidade de Mogi das Cruzes.

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES - UMC, São Paulo.
2007 - 2008
Cargo: Técnica de Biotério

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES - UMC, São Paulo.
2007 - 2008
Cargo: Estagiária em Laboratório de Biologia Molecular - Laboratório de Biologia Molecular no Núcleo de Pesquisas Ambientais (NCA) da Universidade de Mogi das Cruzes.

Formação Complementar

Extensão Universitária em Vacina Contra o Câncer. (Carga horária: 4h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil. 2013.

Extensão Universitária em Escrita Científica: Estrutura e Linguagem.
(Carga horária: 8h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. 2013.

Extensão Universitária em Curso de Proteção Radiológica. (Carga horária: 8h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. 2013.

Extensão Universitária em Sistema de Gestão Integrada. (Carga horária: 50h). Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial, SENAC. 2011.

Extensão Universitária em Tópicos de Fisiologia Comparada. (Carga horária: 120h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. 2011.

Extensão Universitária em Farmacologia. (Carga horária: 82h).
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil. 2010.

Extensão Universitária em Produção de Textos. (Carga horária: 12h). Centro de Integração Empresa Escola. 2010

Extensão Universitária em Técnicas da PCR: usos e aplicações. (Carga horária: 20h). Universidade de Mogi das Cruzes, UMC, Brasil. 2009.

Extensão Universitária em Genética na conservação utilizando marcadores moleculares. (Carga horária: 4h). Universidade de Mogi das Cruzes, UMC, Brasil. 2009.

Trabalhos publicados em anais de eventos

FRANCO, D.G., SANTOS, A.A., MARKUS, R.P. (2012). Neuroprotective effects of melatonin synthesized by cerebellar granule cells cultures. In: 10th International Congress of Cell Biology and 16th Congress of the Brazilian Society for Cell Biology. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Cursos e Palestras

Palestrante. Tema: Transgênicos: Verdades e Desafios. VIII Workshop de Agronegócio. Faculdade de Tecnologia de Mogi das Cruzes. Mogi das Cruzes, Brasil, 2014.

Palestrante. Tema: Bioética além dos Hospitais. Semana da Enfermagem. Instituto de Educação Athenas. Arujá, Brasil, 2014.

Monitora da disciplina: Fisiologia para o Ensino Médio para alunos de graduação em Biologia na Universidade de São Paulo (USP). Carga horária: 8h semanais. Duração: 1º semestre de 2013.

Palestrante. Tema: Câncer: Verdades e Desafios. Semana Internacional de Combate ao Câncer. Jardineiros da Floresta. Mogi das Cruzes, Brasil, 2013.

Aluno Palestrante. Tema: Eixo Imuno Pineal. X Curso de Inverno em Fisiologia Comparativa. Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil, 2013.

Aluno Palestrante. Tema: Eixo Imuno Pineal. IX Curso de Inverno em Fisiologia Comparativa. Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil, 2012.

Palestrante. Tema: Bioética. III Semana da Enfermagem. Instituto de Educação Athenas. Arujá, Brasil, 2012.

Palestrante. Tema: Bioética. II Semana da Enfermagem. Instituto de Educação Athenas. Arujá, Brasil, 2011.

Curso de Nivelamento para alunos ingressantes (Carga Horária: 20h). Universidade de Mogi das Cruzes (UMC), Brasil, 2009.

Participação em Eventos

Encontro para Orientação Inicial de Professores e Coordenadores do Sistema ETAPA. (Carga horária: 4h). Sistema ETAPA, Brasil. 2015.

1st PanAmerican Congress of Physiology without Borders. (Congresso). Iguassu Falls, Brazil, 2014.

Encontro Preparatório de Diretores e Coordenadores do Sistema ETAPA de preparação para o ENEM. (Carga horária: 4h). Sistema ETAPA, Brasil. 2014.

Encontro de Formação de Professores - Sistema ETAPA. (Carga horária: 4h). Sistema ETAPA, Brasil. 2014.

Segunda Semana de Inovações Biológicas Biotecnológicas Aplicadas à Saúde (SIBBAS). (Carga horária: 30h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. 2013.

Simpósio Científico FAPESP – Fundação Bunge. Seminário sobre Defesa Sanitária Animal e Vegetal. (Seminário). Fundação de Amparo à Pesquisa Científica do Estado de São Paulo, FAPESP, 2011.

Simpósio Científico FAPESP – Fundação Bunge. Seminário sobre Oceanografia. (Seminário). Fundação de Amparo à Pesquisa Científica do Estado de São Paulo, FAPESP, 2011.

XVIII Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP (SIICUSP). Apresentação oral do trabalho *Efeito de Fragmentos de Heparina em Arritmias Induzidas Eletricamente em Átrio Direito Isolado de Ratos Jovens*. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

X Congresso Nacional de Iniciação Científica (CONIC – SEMESP). Apresentação oral do trabalho *Efeito de Fragmentos de Heparina em Arritmias Induzidas Eletricamente em Átrio Direito Isolado de Ratos Jovens*. Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2010.

XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica (CBEB). Apresentação oral do trabalho *Utilização de Protocolo Experimental de Indução de Arritmia para o Estudo do Efeito de Enoxaparina em Átrios Direitos Isolados de Ratos em Diferentes Idades*. Tiradentes, Minas Gerais, 2010.

XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica (CBEB). Apresentação oral do trabalho *Utilização de Protocolo Experimental para*

Estudo do Efeito Inotrópico de Tioridazina em Átrio Esquerdo Isolado de Rato. Tiradentes, Minas Gerais, 2010.

XI Encontro de Iniciação a Pesquisa Científica da Universidade de Mogi das Cruzes, UMC, Brasil, 2010.

Seminário Internacional: Ciências Florestais, Medicina Preventiva e Saúde Pública. (Congresso). Fundação de Amparo à Pesquisa Científica do Estado de São Paulo, FAPESP, 2010.

XIII Congresso de Iniciação Científica da Universidade de Mogi das Cruzes, UMC, Brasil, 2010.

Sistemática e Evolução (Simpósio). Universidade de Mogi das Cruzes, UMC. 2009.

Liga de Genética (Congresso). Universidade de Mogi das Cruzes, UMC, Brasil. 2008.

Liga de Cardiologia. (Congresso). Universidade de Mogi das Cruzes, UMC, Brasil. 2008.

Semana da Biologia "Trilhando Diferentes Caminhos". (Congresso). Universidade de Mogi das Cruzes, UMC, Brasil. 2008.

Semana da Biologia "Da Teoria a Prática". (Congresso). Universidade de Mogi das Cruzes, UMC, Brasil. 2007.

Organização de Eventos

Comissão de Organização da II Feira de Ciências do Instituto de Educação Athenas. Tema: Agricultura Familiar e Água – Instituto de Educação Athenas. 2014.

Comissão de Organização do II Curso para Professores: Biologia para o Ensino Médio – Universidade de São Paulo (USP). 2013.

Comissão de Organização do Módulo: Bases Cronobiológicas da Fisiologia. X Curso de Inverno em Fisiologia Comparativa – Universidade de São Paulo (USP) Função: Coordenadora. 2013.

Comissão de Organização do X Curso de Inverno em Fisiologia Comparativa – Universidade de São Paulo (USP). 2013.

Comissão de Organização da I Semana dos Cursos Técnicos – Instituto de Educação Athenas. 2013.

Comissão de Organização da IX Curso de Inverno em Fisiologia Comparativa – Universidade de São Paulo (USP). 2012.

Comissão de Organização da III Semana da Enfermagem – Instituto de Educação Athenas. 2012.

Comissão de Organização da II Semana da Enfermagem – Instituto de Educação Athenas. 2011.

Comissão de Organização da I Semana do Técnico em Química – Instituto de Educação Athenas. 2011.

Comissão de Organização do I Encontro de Nutrição – Instituto de Educação Athenas. 2011.

Comissão de Organização da IV Semana da Biologia – Biodiversidade: O mundo Interage. Função: Presidente. 2010.

Comissão de Organização da III Semana da Biologia – Visão Científica um Compromisso com a Vida. Função: Diretora de Patrocínio. 2009.

Prêmios

Menção Honrosa pelo trabalho *Efeito de Fragmentos de Heparina em Arritmias Induzidas Eletricamente em Átrio Direito Isolado de Ratos Jovens* como apresentação oral no XVIII Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP (SIICUSP).

Trabalho Finalista no Concurso Jovem Pesquisador – XXII Congresso de Engenharia Biomédica com o trabalho *Utilização de Protocolo Experimental para Estudo do Efeito Inotrópico de Tioridazina em Átrio Esquerdo Isolado de Rato*.

Orientações

Andressa Aparecida Barbosa da Silva. Tabagismo e os Aspectos Nutricionais. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do título de Técnico em Nutrição e Dietética. Instituto Educacional Athenas. Orientação: Adriessa Santos.

Anna Flávia Garcia de Andrade. A Digestão começa pela Boca. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do título de Técnico em Nutrição e Dietética. Instituto Educacional Athenas. Orientação: Adriessa Santos.

Maria Eduarda Peres. Elaboração de um Jogo Didático que explique Bioquimicamente a pergunta: O Açúcar Engorda?. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do título de Técnico em Nutrição e Dietética. Instituto Educacional Athenas. Orientação: Adriessa Santos.

Cleonice Barbosa da Silva Figueiredo. Medicamentos para Emagrecer. Quem receita? 2014. Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do título de Técnico em Nutrição e Dietética. Instituto Educacional Athenas. Orientação: Adriessa Santos.

Nathalia Lima Soares da Silva. Os Mistérios dos alimentos Exóticos. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do título de Técnico em Nutrição e Dietética. Instituto Educacional Athenas. Orientação: Adriessa Santos.

Thainá Souza dos Santos. Alimentos Transgênicos: Você sabe o que é?. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do título de Técnico em Nutrição e Dietética. Instituto Educacional Athenas. Orientação: Adriessa Santos.

Juliana Andrade Santos. Alimentos Funcionais na Preservação de Doenças Cardiovasculares em Pessoas de 20 a 40 anos. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do título de Técnico em Nutrição e Dietética. Instituto Educacional Athenas. Orientação: Adriessa Santos.

Gabriela Barros Moreira. Estudo de Caso: Você é o que você Come. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do título de Técnico em Nutrição e Dietética. Instituto Educacional Athenas. Orientação: Adriessa Santos.

Benedita Oliveira da Cruz. Infertilidade Masculina e Alimentação: Estudo de Caso. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do título de Técnico em Nutrição e Dietética. Instituto Educacional Athenas. Orientação: Maria da Glória Silva; Co-orientação: Adriessa Santos.

Dayane da Silva Santos. Incidência do Uso de Suplementos Alimentares por Praticantes de Atividades Físicas em Academia: A Importância da Divulgação. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do título de Técnico em Nutrição e Dietética. Instituto Educacional Athenas. Orientação: Maria da Glória Silva; Co-orientação: Adriessa Santos.

Caroline de Souza Ribeiro. Melatonina aumenta fagocitose em microglias. 2012. Instituto de Biociências. Estágio do X Curso de Inverno em Fisiologia Comparativa. Universidade de São Paulo. Orientação: Adriessa Santos.

Dayara Santana de Oliveira. Elaboração de panfletos informativos para gestantes que abordam a importância do diagnóstico da alergia ao leite materno e intolerância a lactose. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do título de Técnico em Análises Clínicas. Instituto Educacional Athenas. Orientação: Adriessa Santos.

Fernanda Alves Silva. Os efeitos do Narguilé no sistema nervoso central. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do título de Técnico em Análises Clínicas. Instituto Educacional Athenas. Orientação: Adriessa Santos.

Kerolin Daiane de Souza Freitas. Importância do conhecimento das funções do sódio por Unidades Produtoras de Refeições. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do título de Técnico em Nutrição e Dietética. Instituto Educacional Athenas. Orientação: Ana Paula Chagas Almeida; Co-orientação: Adriessa Santos.

José Carlos Galhardi Junior. Jovens X Álcool: Consequências do álcool no sistema nervoso central. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do título de Técnico em Análises Clínicas. Instituto Educacional Athenas. Orientação: Adriessa Santos.

Luana de Jesus Vieira. Como o sistema imunológico reage durante uma gravidez? Abordagem com gestantes. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do título de Técnico em Análises Clínicas. Instituto Educacional Athenas. Orientação: Adriessa Santos.

Rafael Falabella. Revisão Bibliográfica: Tratamentos para Esclerose Múltipla. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do título de Técnico em Análises Clínicas. Instituto Educacional Athenas. Orientação: Adriessa Santos.

Stefanie Larissa Souza. Descriminalização e Legalização da maconha: Início da discussão. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do título de Técnico em Análises Clínicas. Instituto Educacional Athenas. Orientação: Adriessa Santos.

Tamires Souto Santos. Perfil de Conhecimento de jovens de 16 a 18 anos de escola pública e particular sobre o tema – O uso de Células Tronco no Tratamento contra Doenças Neurodegenerativas. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do título de Técnico em Análises Clínicas. Instituto Educacional Athenas. Orientação: Adriessa Santos.

Marcia de Oliveira. Efeito protetor da melatonina em cultura de células do cerebelo: papel da glia. 2012. Instituto de Biociências. Estágio do IX Curso de Inverno em Fisiologia Comparativa. Universidade de São Paulo. Orientação: Adriessa Santos, Daiane Gil Franco.

Paula Kempe. Efeito protetor da melatonina em cultura de células do cerebelo: papel da glia. 2012. Instituto de Biociências. Estágio do IX Curso de Fisiologia Comparativa. Universidade de São Paulo. Orientação: Adriessa Santos, Daiane Gil Franco.

ANEXO I

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

OF.CEUA/IB/025/2012
Ref. 2012.1.621.41.6

São Paulo, 05 de setembro de 2012.

Prezada Senhora

Dirijo-me a V. Sa. para informar que a Comissão de Ética em Uso de Animais do IB (CEUA), em reunião realizada no dia 20 de agosto de 2012, **APROVOU** o Projeto "Produção de melatonina na cultura de células cerebelares; importância das células da glia" - **Protocolo 159/2012**, de sua responsabilidade (Colaboradora: Adriessa Aparecida dos Santos).

Lembramos que, para utilização de animais silvestres, a pesquisadora responsável deve, ainda, ter/portar as autorizações de coleta, transporte e manutenção emitidas pelos órgãos ambientais competentes.

A pesquisadora responsável deverá comunicar à esta Comissão qualquer alteração e/ou intercorrência que houver durante a realização da pesquisa. Além disso, deverá ser encaminhado um breve relatório parcial, ou de finalização, a cada 2(dois) anos.

Atenciosamente,

Prof.ª. Dra. Mariz Vainzof
Coordenadora da Comissão de Ética no
Uso de Animais do IB (CEUA)

Ilma. Sra.

Prof.ª. Dra. REGINA PEKELMANN MARKUS
Departamento de Fisiologia do IBUSP.

Rua do Matão - Travessa 14 nº 321 - CEP 05508-090 - Cidade Universitária
São Paulo - Brasil - <http://www.ib.usp.br>