Raymond Sehiji Takiguchi

Efeitos da modulação do sistema melatonérgico sobre o perfil inflamatório sistêmico induzido por endotoxemia letal em ratos.

São Paulo
2018

Efeitos da modulação do sistema melatonérgico sobre o perfil inflamatório sistêmico induzido por endotoxemia letal em ratos.

Raymond Sehiji Takiguchi

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

Orientador: Prof. Dr. Pedro A.C.M. Fernandes

São Paulo
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Takiguchi, Raymond Sehiji
Efeitos da modulação do sistema melatonérgico sobre o perfil inflamatório sistêmico induzido por endotoxemia letal em ratos. / Raymond Sehiji Takiguchi; orientador Pedro Augusto Carlos Magno Fernandes. -- São Paulo, 2018.

94 f. + anexo

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Fisiologia.

1. Cronofarmacologia. 2. Melatonina. 3. Eixo-imune pineal. 4. Processo inflamatório. I. Carlos Magno Fernandes, Pedro Augusto, orient. II. Título.

Bibliotecária responsável pela estrutura da catalogação da publicação:
Elisabete da Cruz Neves – CRB – 8/6228

COMISSÃO JULGADORA

Prof.(a) Dr.(a)	**Prof.(a) Dr.(a)**
Prof.(a) Dr.(a)	**Prof.(a) Dr.(a)**

Prof.(a) Dr.(a) Orientador

A todos que amo

“Espere o melhor, prepare-se para o pior e aceite o que vier.”
Provérbio Chinês

“E amanhã não seremos o que fomos / nem o que somos.”
Ovídio

AGRADECIMENTOS

Ah, quantas coisas para agradecer nestes anos de jornada!

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Universo e a todas as coisas que confluem para que minha vida seja maravilhosa do jeito que é, tranquila em meio a sobressaltos e útil para mim e àqueles a minha volta. Meu muito obrigado a Deus e aos Mestres de Luz.

Agradeço a toda minha família e digo que sou muito sortudo pois em vez de uma, tenho uma dezena de mães, figuras que me ensinaram o que é o amor verdadeiro e absolutamente incondicional. Fui criado em um núcleo de 3 grandes mulheres que fizeram o que sou hoje. Se dizem que isso não é uma família, desisto de entender o conceito. Muito obrigado a tia Mika, tia Nori e Bachan. E agradeço ao meu pai, pois mesmo longe, esteve sempre perto.

Agradeço ao Johny, que acompanhou todo o processo desde a entrada, todas as noites chegando podre de ficar mil horas no Amnis e agora a conclusão! Obrigado pelo amor e paciência! Até amanhã e sonhe conosco.

Aos amigos, minha segunda família, aqueles que apareceram quando achei que amizade era uma invenção de literatura barata. Meu muito obrigado, vocês me resgataram de momentos onde achei que o único caminho era poço adentro. Seu suporte e carinho foram e são fundamentais para minha alegria e saúde mental! E aqui também fui agraciado com uma quantidade incomumente grande de pessoas. Aos Fellas, irmãos que não tive, obrigado a todos, não ia citar nomes, mas enfim, não resistirei: obrigado Ban, Ayu, Kao, Bob, Ricardo Augusto, Sahkun, Dani, Natyroots, Gi, Fer, Shiba, Lari, Marizon, Kenji, Tix, Katits, Dênis, Aline, Chen, Jow e Cachorra! Ao povo do Ibez/ITIO, aqui não citarei todos, pois é uma montanha de gente e a lista ficaria maior que a dissertação em sí, mas faz-se necessária um agradecimento aos Shimui e ao Núcleo Duro, espero que vocês saibam o quão bem fazem ao mundo. Os Fellas só existem por sua causa! Obrigado Laucks, Ademir-da-guia-o-Homem, Beto, Margareth, Nelsinho, Shiuji e um óbvio especial agradecimento à Fumix. Ao povo da físio, poucos, mas fiéis! Mau, Lícia, Sayury, Lulucia!

Aquele grande obrigado às professoras Regina e Zulma por todos os ensinamentos concedidos! E especialmente ao Pedro por possuir a infinita paciência de ensinar alguém que achava que eppendorf era um concorrente do Borussia Dortmund. Muito obrigado pelos ensinamentos e amizade. Nunca esquecerei do que fizeram por mim e do quanto cresci neste período. E obrigado também a todo povo do laboratório, em especial a Débora Moura e o pessoal do BL, Debs, Gabs, Lulis, Paulis e Leandros! A união faz o laboratório!!

Ahn, e espero que não tenha esquecido de ninguém, mas cabeça oca que sou, me perdoe se esqueci e sinta-se imensamente agradecido por mim, hahaha!

Por fim, agradeço ao fundamental apoio financeiro e científico FAPESP (2013/13691-1 e 2015/23348-8) e CAPES. Espero que possam continuar a apoiar a pesquisa no Brasil assim como apoiaram a nossa!

SUMÁRIO

1. Introdução **1**
1.1 Inflamação **1**
1.1.1 - Choques sépticos e Endotóxicos 3
1.1.2 - Regulação do processo inflamatório 5
1.2 Sistema melatonérgico **8**
1.2.1 Gândula Pineal 8
1.2.2 Melatonina 9
1.2.3 Receptores de melatonina 11
1.2.4 Eixo Imune-Pineal 13
1.2.5 Sepse e melatonina 16
2. Objetivos **19**
3. Metodologia **20**
3.1 Animais **20**
3.2 Escolha do modelo **20**
3.3 Determinação das doses letal e não-letal de LPS **21**
3.4 Tratamentos **21**
3.5 Estimulação elétrica de ponto de acupuntura **21**
3.6 Sobrevivência de animais estimulados eletricamente ou tratados com 5-HEAT **22**
3.7 Coleta de soro e pineais **22**
3.8 Obtenção de leucócitos circulantes **23**
3.9 Obtenção de leucócitos peritoneais **23**
3.10 Dosagens de melatonina, corticosterona e citocinas 23
3.11 Marcação de células para citometria **24**
3.12 Citometria de fluxo **25**
3.13 Análise Estatística **26**
4. Resultados **27**
4.1 Caracterização de modelos letais e não letais de endotoxemia **27**
4.1.1 Citocinas plasmáticas 27

4.1.2 Corticosterona e melatonina 29
4.1.3 Sistema melatonérgico em células imunocompetentes 30
4.2 Tratamentos 34
4.2.1 Eletroacupuntura (EA) 34
4.2.2 Agonista MT1 e antagonista MT2 (5-HEAT) 39
5. Discussão 42
5.1 Ativação do sistema melatonérgico 44
5.2 Modulação do sistema melatonérgico 46
6. Considerações finais 53
7. Referências Bibliográficas 54
8. Anexos 79

RESUMO

A inflamação é um processo fisiológico que promove o reconhecimento e retirada de um agente agressor e restauração de tecidos lesados. Em casos onde a resposta imune é mal regulada, como no caso do choque séptico, ela própria torna-se lesiva, comprometendo diversos órgãos e sistemas e podendo levar ao óbito. Estes quadros podem ser mimetizados experimentalmente com a utilização de lipopolissacarídeos (LPS) induzindo o chamado choque endotoxêmico. Dentre os eixos de regulação da resposta imune, temos a ativação do Eixo Imune-Pineal que atuando desde a montagem do processo inflamatório até sua resolução, vem sendo atualmente considerado como uma peça chave na regulação entre os sistemas neuroendócrino e imunológico. Processos inflamatórios mal regulados podem estar associados com uma disfunção na ativação do sistema melatonérgico, mas pouco se sabe sobre as diferenças no seu padrão de ativação durante quadros endotóxicos letais e não letais. O presente trabalho avalia a ativação do Eixo Imune-Pineal frente desafios endotóxicos letal e não letal induzido por LPS. Além disso, os efeitos do tratamento com eletroacupuntura e os efeitos da utilização de fármaco que atua diretamente sobre os receptores de melatonina também foram avaliados. Foi possível observar que o sistema melatonérgico está alterado em um quadro de choque endotoxêmico em relação a uma situação em que o sistema imune está bem regulado. Esta alteração se reflete na produção tanto da melatonina central como na produzida por células imunocompetentes periféricas e em diferentes padrões de expressão dos receptores de melatonina MT1 e MT2. O estímulo neuroimune causado pela eletroacupuntura em ratos que receberam dose letal de LPS alterou os níveis de melatonina, corticosterona e citocinas circulantes sem, no entanto, alterar a letalidade do choque endotóxico. Por fim, a injeção de 5-HEAT, um agonista MT1 e antagonista MT2 alterou a concentração de citocinas em ratos que receberam dose letal LPS e reduziu a mortalidade dos animais. Demonstramos assim que a ativação doe Eixo Imune Pineal está alterada em situação de choque endotóxico e que a modulação adequada dos receptores de melatonina pode ser considerada no tratamento de quadros similares.

ABSTRACT

Inflammation is a physiological process that promotes the recognition and removal of an aggressive agent and restoration of injured tissues. In cases that the immune response is poorly regulated, as in the case of septic shock it becomes harmful itself increasing lethality. This framework can be experimentally mimicked with lipopolysaccharides (LPS) inducing an endotoxemic shock. Among the axes of regulation of the immune response, we have the activation of the Pineal Immune Axis, which has been acting since the assembly of the inflammatory process until its resolution, and is currently considered a key part in the regulation between the neuroendocrine and immunological systems. Poorly regulated inflammatory processes may be associated with a dysfunction in the activation of the melatonergic system, but little is known about the differences in their pattern of activation during lethal and non-lethal endotoxic conditions. The present work evaluates the activation of the Pineal-Immune Axis against lethal and non-lethal endotoxic challenges induced by LPS. In addition, the effects of treatment with electroacupuncture and the effects of the use of drug that acts directly on the melatonin receptors were also evaluated. It has been observed that the melatonergic system is altered in an endotoxemic shock in relation to a situation in which the immune system is well regulated. This change is reflected in the production of both central melatonin and that produced by peripheral immunocompetent cells and in different patterns of MT1 and MT2 melatonin receptor expression. The neuroimmune stimulus caused by electroacupuncture in rats given lethal dose of LPS altered levels of melatonin, corticosterone and circulating cytokines without altering the lethality of the endotoxic shock. Finally, the injection of 5-HEAT, an MT1 agonist and MT2 antagonist altered the concentration of cytokines in rats receiving lethal dose LPS and reduced mortality of the animals. We thus demonstrated that the activation of the Pineal Immune Axis is altered in a situation of endotoxic shock and that the appropriate modulation of the melatonin receptors can be considered in the treatment of similar conditions.

LISTA DE ABREVIATURAS

4P-PDOT	4-fenil-2-proprioaminotetralina
5-HTP	5-hidroxitriptofano
5-HEAT	5-hydroxiethoxi-N-acetiltriptamina
ASMT	Acetilserotonina metiltransferase
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GABA	Ácido gama-aminobutírico
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
ATP	Adenosina trifosfato
mTOR	Alvo da rapamicina de mamíferos
NIS	Amostra nacional de pacientes internos
AANAT	Arilalquilamina N-acetiltransferase
PAANAT	arilalquilamina N-acetiltransferase fosforilada
NF-κB	Ativação do fator nuclear kappa B
qSOFA	Avaliação rápida de falha de órgão relacionada com sepse
BCG	Bacilo Calmette-Guerin
MSC	Células-tronco mesenquimais do estroma
COX-2	Ciclooxigenase-2
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EA	Eletroacupuntura
ROS	Espécies reativas a oxigênio
TNF	Fator de necrose tumoral
PE	Ficoeritrina
PECy7	Ficoeritrina com corante cianina 7
MyD88	Gene de resposta primário de diferenciação mieloide 88
CD14	Grupamento de diferenciação 14
CD4	Grupamento de diferenciação 4

CD8	Grupamento de diferenciação 8
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
ILAS	Instituto Latinoamericano de Sepse
RPMI	Instituto memorial Roswell Park
IL-1	Interleucina 1
IL-1α	Interleucina 1 alfa
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-2	Interleucina 2
IL-33	Interleucina 33
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
JAK	Janus quinases
CLP	Ligamento e punção cecal
Th1	Linfócito T helper 1
T-reg	Linfócito T regulador
LPS	Lipolissacarídeo
MTC	Medicina Tradicional Chinesa
PECAM	Molécula de adesão celular endotelial plaquetária
ICAM	Molécula de adesão intracelular
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
NAS	N-acetilserotonina
NSQ	Núcleo Supraquiasmático
PVN	Núcleos Paraventriculares do Hipotálamo
iNOS	Oxido nítrico-sintase induzível
DAMP	Padrões moleculares associados a dano
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos

E36	Ponto estômago 36
PC6	Ponto pericárdio 6
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc
LBP	Proteína de ligação ao LPS
TSG-6	Proteína gene 6 estimulada por TNF
MD-2	Proteína mielóide diferenciadora 2
PKA	Proteína quinase A
GPR50	Receptor acoplado a proteína G 50
Gi/o	Receptor acoplado a proteína G inibitório
IL-10R	Receptor de interleucina 10
MT1	Receptor de melatonina do subtipo 1
MT2	Receptor de melatonina do subtipo 2
TLR4	Receptor do tipo Toll 4
TLR9	Receptor do tipo Toll 9
GR	Receptores de glicocorticoides
PGE_2	receptores de IL-1, prostaglandina E2
TIR	Receptores toll-interleucina 1
RI	Reflexo antiinflamatório
SIRS	Síndrome de resposta inflamatório sistêmica
SNC	Sistema nervoso central
PBS	Tampão fosfato-salino
Sepsis-3	Terceiro Consenso Internacional para Sepse e Choque Séptico
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
TPH1	Triptofano hidroxilase 1
ZT	Zeitgeber Time

1. INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação

A inflamação é um evento fisiológico descrito desde a antiguidade e já relatado por Celsus (25 a.C. a 50 d.C.) por apresentar “quatro pontos cardeais”: dor, calor, rubor e tumor. A inflamação é uma resposta do organismo contra lesões causadas por traumas, infecções, pós-isquêmicas, toxinas ou autoimunes (Antonelli e Kushner, 2017). Promove a retirada ou resolução do evento lesivo e a restauração estrutural e funcional do tecido afetado. Além disso regula os eventos e células responsáveis pela formação de memória imunológica possibilitando, no caso de infecções, uma montagem de resposta mais específica caso haja reexposição ao agente (Fullerton e Gilroy, 2016).

Durante o processo inflamatório é necessária a integração funcional de diversos mecanismos de controle e regulação que garantam que a resposta de defesa montada tenha a intensidade e duração adequadas. Caso a resposta seja menor que a necessária, o evento iniciador não será resolvido, mantendo sua atividade nociva ao organismo. Caso seja maior que a necessária, a própria resposta imune poderá causar danos agudos e potencialmente letais ao organismo ou então perpetuar-se como ocorre em diversas doenças inflamatórias crônicas (Cash et al., 2014; Ahmed et al., 2014).

O disparo da reação inflamatória é dado pelo reconhecimento de agentes potencialmente danosos para a fisiologia do organismo (revisto por Medzhitov, 2008). Basicamente, há dois tipos de padrões moleculares que agem como antígenos para células que reconhecem e propagam a inflamação, os associados à patógenos e os associados à danos celulares e teciduais. Os padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) são moléculas conservadas encontradas em vírus, bactérias e demais agentes infecciosos (revisto por Kumar et al., 2014). Dentre estes padrões podemos citar os lipopolisacarídeo (LPS) de parede celular de bactérias gram-negativas, reconhecidos pelos receptores do tipo *Toll-like* 4 (TLR4) ou o

zymosan, presente na parede celular de fungos e reconhecidos pelos receptores TLR2 e TLR6 (De Nardo, 2015; Sato et al., 2003). Além de moléculas exógenas, o sistema imune pode ser estimulado através de padrões moleculares associados a dano (DAMP), produzidos pelo próprio organismo atuando como marcadores de dano ou morte celular (revisto por Rubartelli e Lotze, 2007). Elementos normalmente encontrados do meio intracelular como ácido ribonucleico (RNA) (Bernard et al, 2012) e adenosina trifosfato (ATP) (La Sala et al., 2003), quando encontrados no meio extracelular, são reconhecidos pelo sistema imune ativando eixos pró-inflamatórios.

O reconhecimento destes sinais de perigo é feito por células dendríticas e monócitos residentes que quando ativados iniciam a resposta imune, fagocitando o possível agente agressor e liberando fatores associados com a montagem da resposta de defesa, tais como, o fator de necrose tumoral, as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6), quimiocinas dentre outros mediadores (revisto por Ashley et al., 2012). Um dos efeitos imediatos da presença destes mediadores é promover o recrutamento celular mediado pelo aumento na expressão de integrinas e selectinas no endotélio vascular e membranas de neutrófilos circulantes após rolarem e aderir ao endotélio vascular, migram para o tecido alvo através da ação de quimiocinas (Medzhitov, 2008; Delves e Roitt, 2000). No foco inflamatório, os neutrófilos são ativados pelas citocinas liberadas pelas células residentes e por PAMPs, fagocitando patógenos e produzindo fatores tóxicos como as espécies reativas a oxigênio (ROS) e nitrogênio, elastases e proteases, que promovem a eliminação dos agentes infecciosos (revisto por Nathan, 2006). Contudo, se a resposta desencadeada for muito intensa é possível que ocorram danos ao próprio indivíduo (Nathan, 2002).

Dentre as diversas substâncias que são capazes de disparar uma resposta inflamatória, o LPS é uma das mais utilizadas em ensaios pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*, induzindo diferentes graus de endotoxemia a depender da dose utilizada (revisto por Zielen et al., 2015). A vantagem de se utilizar o LPS em estudos de inflamação sistêmica é poder avaliar possíveis alterações no padrão de resposta fisiopatológica decorrentes, exclusivamente, da desregulação do sistema de defesa, ou seja, aspectos

relacionados com a proliferação ou liberação de sinais pelos patógenos não estarão presentes neste modelo (Remik e Ward, 2005; Buras et.al., 2005).

1.1.1 - Choques sépticos e Endotóxicos

A sepse é uma condição estudada desde os primórdios da humanidade e do estudo da fisiologia e da patologia. Homero utilizou o termo em sua obra, derivando da palavra grega “sepo” que significa putrefazer, apodrecer (revisto por Funk et al., 2009) e desde então vem desafiando a comunidade científica. De acordo com as Definições do Terceiro Consenso Internacional para Sepse e Choque Séptico (Sepsis-3) (Singer et al. 2016), a sepse é uma síndrome que afeta o funcionamento de diversos órgãos mediante uma resposta inflamatória não homeostática a uma infecção, aumentando a complexidade e letalidade do quadro do paciente quando comparada a uma infecção ou uma inflamação isoladamente. Quando conjuntamente há comprometimento metabólico e circulatório, temos o choque séptico. É a situação que provoca o maior número de óbitos em pacientes críticos (Gaieski, 2013). Em um estudo que avaliou no ano a Amostra Nacional de Pacientes Internos (*Nationwide Inpatient Sample* - NIS), a maior base de dados de pacientes internos dos Estados Unidos da América, foi constatado que no ano de 2010 de 32,7% a 52% dos óbitos ocorreram em pacientes com sepse (Liu et al., 2014). Em levantamento realizado pelo Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS, 2018), no Brasil, no ano de 2017, 20,6% e 54,2% dos pacientes diagnosticados com sepse e choque séptico respectivamente foram a óbito.

Mesmo com o avanço da ciência moderna, os mecanismos fisiopatológicos associados à sepse ainda precisam melhor compreendidos (revisto por Perner et al., 2016). Sabe-se que durante a sepse há uma produção não regulada de diversas citocinas tanto pró-inflamatórias como reguladoras em uma situação chamada de tempestade de citocinas (do inglês *cytokine storm*) (revisto por Chousterman et al., 2017). Este quadro leva à uma resposta inflamatória desregulada, com desequilíbrio hemodinâmico e lesão de tecidos e órgãos (Rittirsch et al., 2008). Este processo não é uniforme entre indivíduos com sepse e o diagnóstico é

predominantemente clínico. Em humanos, segundo critérios definidos no Sepsis-3, um indivíduo é diagnosticado com sepse se houver suspeita ou confirmação de infecção, pontuação de 2 ou 3 no qSOFA (Avaliação rápida de falha de órgão relacionada com sepse, do inglês *quick sepsis related organ failure assessment*) ou um aumento de um total de 2 pontos no SOFA (Singer et al., 2016). Para o choque séptico, considera-se que o indivíduo esteja em sepse e presente hipotensão arterial, necessitando de drogas vasoativas para manutenção de pressão arterial média de 65mm/Hg e lactato sérico de 2mmol/L após reanimação volêmica (Shankar-Hari et al., 2016).

O papel do LPS foi primeiramente observado por Richard Pfeiffer (1858–1945) quando estudou a cólera e percebeu que a manifestação da doença não dependia da viabilidade do vibrião colérico e postulou que os sintomas no indivíduo infectado são dados após a morte do vibrião, quando seu conteúdo intracelular altamente tóxico é liberado, chamando esta substância de endotoxina (endo, do grego, interno) (Rietschel & Cavaillon, 2003). Hoje sabe-se que o LPS é presente primariamente no folheto exterior da camada externa da membrana citoplasmática de bactérias gram-negativas. Trata-se de uma molécula anfifílica, importante para manutenção estrutural da membrana, não permitindo a difusão passiva de substâncias como antibióticos, detergentes ou demais substâncias que poderiam ser nocivas à bactéria (Zhang et al., 2013).

Estruturalmente, o LPS é composto de 3 partes, o O antígeno, um centro de oligossacarídeos e o lipídio A, responsável por desencadear a atividade biológica da resposta imune (Kabanov & Prokhorenko, 2010). Extremamente imunogênico, pequenas doses como 2 ng/kg em humanos já elicitam hipertermia, taquipnéia, taquicardia e aumento do número de leucócitos circulantes, reações semelhantes a sepse (Calvano & Coyle, 2012) O reconhecimento do LPS pelas células apresentadoras de antígenos se dá através da associação com as proteínas acessórias CD14 (grupamento de diferenciação, do inglês *cluster of differentation*) (Wright et al.,1990) e a proteína de ligação ao LPS (LBP, do inglês *LPS-binding protein*), o LPS é reconhecido pelo heterodímero composto pelo receptor do tipo Toll 4 (TLR4) e a proteína mielóide diferenciadora 2 (MD-2) (Shimazu et al. 1999), que se oligomerizam e promovem cascatas de sinalização através da interação com

domínios de receptores toll-interleucina 1 (TIR, do inglês *Toll-interleukin-1 receptor*) dependentes ou não dependentes do gene de resposta primário de diferenciação mieloide 88 (MyD88) (Kagan & Medzhitov, 2009). Esta ativação induz, dentre outras, na ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB), permitindo a transcrição de diversas citocinas reguladoras do processo inflamatório com o TNF (fator de necrose tumoral), interleucina 1 beta (IL-1β) e interferons do tipo I (Lu et al. 2008). Em células dendríticas, a ativação do TLR4 faz com estas se maturem e migrem para linfonodos, onde apresenta antígenos além de secretar citocinas modulatórias como, por exemplo, a IL-12 (revisto por Mellman, 2012). Na presença deste fator, linfócitos T *naives* são induzidos à diferenciação, através da regulação positiva do fator de transcrição *Tbet,* polarizando linfócito T helper em um padrão de atividade do tipo 1 (Th1). Este fenótipo celular produz INFγ (interferon gama), uma citocina que age positivamente na diferenciação de outros linfócitos T CD4+ *naives* para o padrão Th1, além de aumentar a capacidade fagocítica de macrófagos (Sallusto, 2016).

A administração de LPS como modelo experimental é extensamente utilizada pois mimetiza diversos aspectos da fisiopatologia inflamatória vista em infecções bacterianas de maneira dose-dependente (Comstock et al., 1998), permitindo assim um controle rigoroso através do estímulo de um único mediador pró-inflamatório (Buras et.al., 2005).

Quando o LPS injetado é devidamente neutralizado e eliminado pelo sistema imunológico, o organismo possui diversos mecanismos para a resolução do processo inflamatório e retorno a condição de normalidade (Serhan et al., 2015).

1.1.2 - Regulação do processo inflamatório

Durante muito tempo pensou-se que a resolução do processo inflamatório seria passivamente realizada com a diminuição dos mediadores pró-inflamatórios, barrando a migração e ativação dos neutrófilos e possibilitando a regeneração do local (Haslett e Henson, 1988; para revisão ver Headland e Norling, 2015). Entretanto, foi demonstrado que tão ativa quanto o disparo do processo, a fase de resolução também está associada

com diversos mecanismos de ação (Buckley et al., 2013). Estes processos envolvem a desativação dos leucócitos, o *clearance* celular com a migração e/ou morte das células que participaram do processo inflamatório e a fagocitose de resíduos celulares e dos agentes infecciosos que restaram, possibilitando a restauração tecidual (Serhan et al., 2007).

Diversos são os mecanismos existentes para o controle e resolução da inflamação. Concomitantemente aos mecanismos associados com a remoção efetivo dos agentes agressores locais, os linfócitos T reguladores (T-reg) entram em ação, liberando IL-10, uma interleucina de ação anti-inflamatória e a ação das células-tronco mesenquimais do estroma (MSC) que atuam secretando antagonistas de receptores de IL-1, prostaglandina E_2 (PGE_2) e proteína gene 6 estimulada por TNF (TSG-6), agentes que, em um primeiro momento, previnem uma reação inflamatória exacerbada e, posteriormente, promovem o retorno do local à condição pré-inflamatória (revisto por Buckley et al., 2014; Prockop et al., 2012).

A IL-10 é produzida por diversas células imunocompetentes tais como linfócitos Th1, Treg, linfócitos B, macrófagos, células dentríticas e outras (Ouyang et al., 2011). Atuam de maneira autocrina e paracrina através da ativação do receptor IL-10R e da via das janus quinases/transdutor de sinal e ativador de transcrição, (JAK/STAT, do inglês *signal transducer and activator of transcription*), especialmente a STAT3. Esta via inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF e IL-12, regulando a resposta Th1. (Moore et al., 2001). Pela inibição da via do alvo da rapamicina de mamíferos *(*mTOR, *do inglês "mammalian target of rapamycin"),* atua também alterando o metabolismo de macrófagos e suprimindo sua polarização pró-inflamatória (Ip et al., 2017).

Além das respostas imunológicas celulares e humorais, foram encontrados também mecanismos neuronais de controle do processo inflamatório, dentre eles o chamado Reflexo Inflamatório (RI) (Tracey, 2002). Neste sistema, o nervo vago sinaliza o processo inflamatório ao sistema nervoso central (SNC) por meio de suas fibras vagais aferentes, estimuladas por substâncias como TNF, IL-1β e endotoxinas. Considerando as vias descendentes, as fibras eferentes colinérgicas vagais modulam diretamente, por meio de receptores nicotínicos do tipo alfa 7 (Wang et al., 2003), ou

indiretamente, como no caso do baço, a liberação de noradrenalina por nervos simpáticos, inibindo a síntese de TNF e outros mediadores imunes por macrófagos e linfócitos (Andersson e Tracey, 2012; Rosas-Ballina e Tracey, 2009).

Alguns trabalhos têm demonstrado que estas aferências podem ser utilizadas como forma de regulação da resposta imunológica, como é o caso do estímulo elétrico do nervo vago, capaz de modular processos inflamatórios como a sepse (revisto por Wang et al., 2016). Uma outra forma de estímulo destes eixos imunomodulatórios é a acupuntura (Scognamillo-Szabó et al., 2004; Torres-Rosas et al., 2014). Esta técnica milenar que compõe a medicina tradicional chinesa utiliza como ferramenta para produção de aferências a punção de pontos com localização tradicionalmente determinada, por agulhas filiformes, sem luz, desprovidas de substâncias ativas. Seu efeito é causado pelo estímulo mecânico da punção, podendo ser somados a este, estímulos elétricos, como na eletroacupuntura (Birch e Felt, 2002). Com o avanço das pesquisas nas últimas décadas, a acupuntura vem ganhando cada vez mais espaço, integrando-se à medicina moderna. Alguns de seus mecanismos de ação têm sido elucidados, sendo que hoje há estudos clínicos suficientes para que a prática seja reconhecida pela Organização Mundial da Saúde no tratamento de diversos males (OMS, 2003).

Um dos pontos mais estudados é conhecido pela sigla E36 (ST36 no inglês), localizado lateral à tuberosidade da tíbia. Pesquisas de seus efeitos demonstram que a estimulação deste ponto diminui a mortalidade de animais submetidos à sepse experimental através da modulação de vias dopaminérgicas (Torres-Rosas et al., 2014), suprime o processo inflamatório em patas de ratos através de opioides periféricos (Kim et al, 2006) e atenua a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF e IL-1β além de inibir o influxo de íons de cálcio pela inativação de sinalização por TLR4/NF-κB (Chen T. et al., 2018). Estes efeitos estão associados com a ativação do sistema nervoso autônomo que, por sua vez, controla a atividade das células imunocompetentes periféricas e estudos que avaliam os sistemas neuroimunomodulatórios já são bem descritos e aceitos na literatura (revisto po Tracey, 2009).

Além das modulações simpáticas e parassimpáticas, o padrão de resposta de defesa também é regulado por vias neuroendócrinas como o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Malek et al., 2015; Bellavance e Rivest, 2014) e o eixo imune-pineal (Markus et al., 2018). Estes eixos são modulados por aferências neurais e, uma vez que possuem componentes fora da barreira hematoencefálica, diretamente por sinais imunológicos presentes na circulação sanguínea. A seguir serão abordados com mais detalhes o papel do sistema melatonérgico no controle de respostas de defesa, em condições inflamatórias dentre elas os choques sépticos e endotóxicos.

1.2 Sistema melatonérgico

1.2.1 Gândula Pineal

A história da glândula pineal está enraizada na própria origem da cultura ocidental. Foi primeiramente descrita na Grécia por Herófilo por volta do século III a.C. Galeno, no século II d.C. nomeou a estrutura como *coronariun* (cone em latim) e, mais tarde, de *pinealis*, palavra que deriva de *pinea*, pinha em latim, nome esse mantido até os dias atuais (Erlich et al., 1985).

As funções da glândula pineal foram primeiramente associadas a temas espirituais e metafísicos na antiguidade. Na época de Galeno a pineal era considerada uma válvula que regulava a passagem da *pneuma* (do grego, respiração, o equivalente ao conceito de alma nos dias atuais) entre os ventrículos cerebrais. Avançando no tempo, no século XVII, para Descartes a pineal era considerada o local de fusão do corpo e o espírito, onde seriam gerados os pensamentos e a consciência (Shoja et al. 2016). Foi apenas no final da década de 1950 que a fisiologia da glândula pineal passou a ser desvendada por Lerner et al. (1958), que isolaram uma substância ativa de pineais oriundas de bois capaz de clarear a pele de sapos e peixes, batizada de melatonina, do grego *melas* (preto) e *tosos* (trabalho) (Axelrod, 1974).

A glândula pineal é uma pequena estrutura que pesa cerca de 100 miligramas no ser humano e 1 mg em camundongos. Deriva

embriologicamente do tubo neural e está localizada entre o mesencéfalo e o diencéfalo em uma posição centralizada no encéfalo (Axelrod, 1974; Møller & Baeres, 2002). Trata-se de um órgão circunventricular, ou seja, cujo sistema vascular é composto por vasos que não possuem propriedades da barreira hematoencefálica, havendo uma grande permeabilidade passiva de solutos circulantes (revisto por Daneman & Prat, 2015). Esta estruturação morfológica permite que a pineal seja sensível às alterações sistêmicas que, por ventura, possam ocorrer no organismo como, por exemplo, variações hormonais, de citocinas ou agentes biológicos/patogênicos como vírus e bactérias.

Estruturalmente, a pineal é composta em menor quantidade por células endoteliais, células da glia (principalmente astrócitos e micróglia), fagócitos perivasculares e neurônios e em maior quantidade (aproximadamente 90% do total) por pinealócitos, células neuroendócrinas responsáveis pela produção de melatonina (revisto por Karasek & Reiter, 1992; Møller & Baeres, 2002).

Funcionalmente, a glândula pineal é uma componente chave do relógio biológico endógeno que recebe aferências nervosas, trazendo informações sobre a luminosidade ambiental e, por meio da produção de melatonina, regula ciclos diários e sazonais no organismo como, por exemplo, os ciclos de vigília-sono e reprodutivos (Goldman, 2001). Mais recentemente, como será comentado mais adiante, diversas funções imunoregulatórias da pineal têm sido descritas (Carrillo-Vico et al., 2013; Markus et al., 2018)

1.2.2 Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma indolamina produzida a partir do triptofano e que, produzida pela glândula pineal, atua como um marcador de ausência de luz (Reiter, 1991). Sua produção se inicia a partir da captação de triptofano da circulação que é hidroxilado em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela triptofano hidroxilase 1 (TPH1) e descarboxilado, formando serotonina (5-hidroxitriptamina) pela ação da 5-HTP descarboxilase (Martínez et al., 2001). Quando não há luz no ambiente,

o Núcleo Supraquiasmático (NSQ) ativa os Núcleos Paraventriculares do Hipotálamo (PVN) através da liberação de glutamato, ativando a coluna intermédio-lateral da medula espinal (Kalsbeek, 2002). Fibras emergentes simpáticas do gânglio cervical superior liberam noradrenalina e ATP na glândula pineal, ativando, respectivamente, receptores β-adrenérgicos e purinérgicos P2Y1 em pinealócitos (Ferreira et al., 2003). Em pineais de primatas, este estímulo leva a fosforilação da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT) formando a PAANAT e induzindo sua conjugação com a chaperona 14-3-3. Nesta conformação a AANAT fica ativa e protegida da ação de protessomas (Ganguly et al., 2001). Em roedores, o estimulo β-adrenérgico sobre a pineal promove a transcrição do gene e tradução da enzima AANAT e também a formação de PAANAT, (Schomerus et al., 2000). Apesar da ativação isolada de receptores α-adrenérgicos em pinealócitos não induzir a transcrição de AANAT, esta é capaz de potencializar os efeitos do estímulo β-adrenérgico (Klein et al., 1983).

A PAANAT promove a acetilação da serotonina, formando N-acetilserotonina (NAS) que é metilada pela enzima acetilserotonina metiltransferase (ASMT, previamente chamada de hidroxiindol-O-metiltransferase, HIOMT) (Axelrod e Weissbach, 1960), produzindo a melatonina, que é liberada na corrente sanguínea. Na presença de luz, o pigmento especializado presente nas células ganglionares fotossensíveis da retina chamado melanopsina (Hattar et al., 2002) é estimulado, fazendo com que o NSQ iniba o PVN, a partir de uma via mediada por ácido gama-aminobutírico (GABA). Com isso há a inibição da expressão/atividade da AANAT e, consequentemente, da produção de melatonina (para revisão ver Simonneaux e Ribelayga, 2003).

Amplamente conhecida por suas funções cronobióticas, a melatonina possui uma miríade de efeitos nos mais variados seres vivos. Trata-se de uma molécula filogeneticamente conservada, sendo produzida por cianobactérias, células procariotas que surgiram no início da de vida na Terra (Tilden et al., 1997). Nestes organismos, acredita-se que a melatonina tem como função combater os efeitos nocivos do oxigênio e seus subprodutos, já que apresenta potente efeito antioxidante, sendo considerada por muitos

como essencial para o surgimento da vida aeróbia na Terra (revisto por Manchester et al, 2015).

Em mamíferos, além da glândula pineal, a melatonina também é produzida por diversos outros tecidos e células pela mesma via de biossíntese. Stefulj et al. (2001) detectou o RNA mensageiro (RNAm) para AANAT e ASMT em todos os 16 tecidos analisados, como coração, pulmão, timo, estômago, núcleos da rafe e testículos. De fato, em muitos tecidos, a melatonina é encontrada em concentrações maiores do que a circulante, não oscilando de maneira circadiana (Acuña-Castroviejo et al., 2014). Em mamíferos, há uma grande concentração de melatonina no sistema digestório, sendo maior no intestino grosso (Messner et al., 2001). No intestino a melatonina é produzida nestes tecidos por células enterocromafins, ricas em serotonina, reagindo a ingesta de alimentos e situações inflamatórias como colite e proctite ulcerativa (Chojnacki et al., 2013). Por fim, como será abordado mais a frente, a melatonina produzida por células imunocompetentes apresenta uma série de papeis imunorreguladores.

1.2.3 Receptores de melatonina

Em vertebrados, a melatonina age em dois receptores conhecidos como MT1 e MT2 (antigamente chamados Mel1a ou ML_{1A} e Mel1b ou ML_{1B}). São receptores acoplados a proteína Gαi/o que quando ativados inibem a produção de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), induzindo uma menor ativação de proteína quinase A (PKA) e fosforilação, dentre outros alvos intracelulares, da proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc (CREB) (Liu et al., 2016). Além disso, a ativação destes receptores também pode sinalizar pela via da proteína quinase ativada por motógeno (MAPK) e da fosfolipase C (para revisão ver Jockers et al., 2016, Cecon et al., 2017).

Pela sua alta homologia com MT1 e MT2 (50%) o receptor acoplado a proteína G 50 (GPR50) também é considerado da família dos receptores de melatonina sem, no entanto, apresentar afinidade a ela ou a qualquer outra substância conhecida, sendo considerado um receptor órfão (Reppert et al., 1996). Recentemente foi constatado que o GPR50 age formando complexos

com outros receptores, se oligomerizando com MT1 e MT2. O heterodímero MT1/GPR50 tem uma menor afinidade com a melatonina do que o MT1 isolado, diminuindo assim sua ação biológica (Levoye *et al*., 2006).

Os receptores de melatonina estão presentes nas mais variadas células de mamíferos, no sistema nervoso central pode ser encontrano nos NSQs, tálamo, cerebelo e outros (Mazzucchelli et al., 1996), na retina, aorta, glândula parótida, rins, adipócitos, células imunocompetentes e muitas outras (Hardeland el al., 2011; Zlotos et al., 2014)

A administração de melatonina e outros agonistas MT1/MT2 vem ganhando espaço tanto em pesquisas básicas quanto em ensaios pré-clínicos e clínicos pelo mundo. Como efeitos imunomoduladores da administração de melatonina podemos citar estudos relacionados com os modelos onde a melatonina foi administrada via oral por 6 semanas e diminuiu o estado inflamatório de ratos obesos diabéticos, verificado pela diminuição dos níveis de TNF, IL-6 e proteína C reativa em comparação a ninhadas não obesas (Agil et al., 2012, 2013). A administração de melatonina por 30 dias diminuiu níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1β), marcadores de apoptose além de prevenir dano ao RNA por estresse oxidativo no pulmão de ratos idosos (Puig et al., 2016). Quando macrófagos são incubados com melatonina e exposto a LPS, foi observado que houve uma diminuição da produção de TNF, IL-1β, IL-6, IL-8 e IL-10 modulando a cascata de sinalização do TLR4 (Xia et al., 2012). Ainda em macrófagos, análise com *microarray* demonstrou que a melatonina modula sinalização dos fatores reguladores de interferon (IRFs) e das STATs, suprime expressão gênica relacionada a infecção viral além de diminuir a atividade fagocítica pela desestabilização da actina e alterando o citoesqueleto do macrófago (Kadena et al., 2017).

Interessante notar que a melatonina administrada *in vivo* nestas pesquisas está na faixa de contração de mM enquanto que a concentração plasmática fisiológica está na faixa de pM a nM tanto em humanos como em roedores (Nogueira et al., 2013; Bubenik et al., 1997). Assim, apesar de muito se pesquisar os efeitos da administração da melatonina no organismo, ainda há muito a ser desvendado sobre seu mecanismo de ação. Neste contexto,

temos a produção ajustada de melatonina como um ponto central na modulação de resposta imunológicas pelo chamado Eixo Imune-Pineal (Markus et al., 2018).

1.2.4 Eixo Imune-Pineal

Como mencionado anteriormente, o sistema melatonérgico tem uma intrínseca ligação com o sistema imune. A alternância entre o foco de produção de melatonina da glândula pineal para células imunocompetentes e de volta para a pineal ajusta a resposta imunológica, permitindo tanto sua montagem assim como a resolução das respostas de defesa. A esta interação entre os sistemas imunológico e melatonérgico foi dado o nome de Eixo Imune-Pineal (Markus et al., 2007, 2018).

Esta relação foi primeiramente observada por Lopes et al. (1997), que constatou que o tamanho da pata de camundongos infectados cronicamente com o bacilo Calmette-Guerin (BCG) apresentava uma oscilação rítmica circadiana. Interessantemente, nestes experimentos foi constado que o tamanho da pata inflamada era maior na fase de claro ambiental quando comparado a fase de escuro e que este ritmo era abolido em animais pinealectomizados e reestabelecido caso a melatonina fosse suplementada na fase de escuro. Estes dados indicavam que a produção de melatonina pela pineal poderia estar inibindo o processo inflamatório durante a noite. No caso de inflamações crônicas este tipo de efeito é importante pois permite ao indivíduo de hábito noturno realizar as atividades necessárias para sua sobrevivência.

De maneira concordante com as observações anteriores, foi observado que, em concentrações compatíveis com as encontradas no sangue durante a noite, a melatonina inibe o rolamento e a adesão de leucócitos pela camada endotelial de vasos sanguíneos, impedindo a migração dos mesmos para tecidos adjacentes (Lotufo et al., 2001). Este efeito, em situações de higidez, impede a montagem de processos inflamatórios inadequados através da inibição da produção de óxido nítrico na parede dos vasos (Silva et al, 2007) e da expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular (Tamura et al., 2010; Marçola et al., 2013).

Contudo, a produção noturna de melatonina pela pineal dificultaria a instalação de respostas inflamatórias adequadas fundamentais para a sobrevivência dos indivíduos. Portanto, seria de se esperar que padrões associados a patógenos e/ou sinais produzidos nas fases inicias de respostas de defesa pudessem bloquear ou diminuir a produção de melatonina pela pineal. Corroborando, a hipótese da glândula pineal como uma aferência do sistema imunológico, Fernandes et al. (2006) demonstraram que a glândula pineal quando incubada com a citocina pró-inflamatória TNF apresenta transcrição reduzida da enzima AANAT e, consequentemente, inibição da produção de NAS, o precursor imediato da melatonina. A correlação negativa entre TNF e melatonina circulante também pôde ser observado *in vivo* em mulheres com mastite (Pontes et al., 2006) ou após parto por cesárea (Pontes et al., 2007) que apresentavam aumento de TNF circulante e uma supressão nos níveis noturnos de melatonina. Já da Silveira Cruz-Machado et al. (2010) demostraram que a glândula pineal possui o receptor TLR4 e quando incubada com LPS apresenta ativação de subunidades inibitórias da via do NF-κB, produção aumentada de TNF e receptores de TNF e redução na produção de melatonina. Por fim, dados obtidos *in vivo* mostraram que ratos inflamados sistemicamente com injeção intravenosa de LPS 0,5 mg/kg apresentaram redução na concentração circulante de melatonina nas primeiras horas da resposta (Tamura et al., 2010; Fernandes et al., 2017). Esta redução está relacionada com a diminuição na expressão das moléculas de adesão ICAM (molécula de adesão intracelular, do inglês *intracellular adhesion molecule)* e PECAM (Molécula de adesão intracelular de plaquenas e células do endotélio, do inglês *platelet endotelial cell adhesion molecule)* no endotélio vascular e com a diminuição da adesão de células polimorfonucleares ao endotélio vascular (Tamura et al., 2010). Deste modo, a diminuição da produção central de melatonina por TNF ou LPS auxilia a montagem da resposta inflamatória, uma vez que libera a migração de células imunocompetentes para os tecidos afetados.

Corticosteroides, hormônios produzidos pelas glândulas adrenais e intrinsicamente ligados a processos imunorregulatórios apresentam ações duais sobre o sistema melatonérgico. Quando receptores de glicocorticoides

(GR) são estimulados conjuntamente a receptores α e β-adrenérgicos, é observado uma inibição da produção de melanina pela glândula pineal (Fernandes et al., 2017). Esta situação é compatível com momentos de estresse imune, onde há um aumento do tônus simpático (Pongratz e Straub, 2014) associada a uma ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e estaria contribuindo com a inibição inicial da melatonina. Já quando a ativação de GRs ocorre conjuntamente com apenas receptores β adrenérgicos, há um aumento da produção de melatonina (Fernandes et al., 2017). O conceito do Eixo Imune-Pineal propõe que nas fases de regulação do processo inflamatório, uma diminuição do estímulo simpático faz com que receptores β-adrenérgicos sejam predominantemente ativados na pineal e, em conjunto com ativação de GRs por glicocorticoides, restaure a produção noturna de melatonina. Além disso, outros mediadores imunológicos como o interferon-gama também podem aumentar a produção de melatonina pela pineal nas diferentes fases da resposta inflamatória (Barbosa-Lima, 2015).

Inversamente ao que ocorre na glândula pineal, em células imunocompetentes, citoninas pró-inflamatórias ou PAMPs que ativam a via do NF-κB através da translocação dos dímeros c-Rel/c-Rel, c-Rel/p50 e c-Rel/RelA, promovendo a transcrição de AANAT e induzem a produção de melatonina (Murxel et al., 2012). A produção de melatonina por estas células atua de maneira autócrinas e parácrina induzindo, por exemplo, o aumento da atividade fagocítica de monócitos através do aumento de expressão de dectina-1 (Pires-Lapa et al., 2013), a proliferação e apresentação de antígenos por linfócitos-T, induzindo a produção de interleucina 2 (IL-2), INF-ɣ e IL-6 por células mononucleares presentes na circulação periférica (Miller et al., 2006). Nas fases regulatórias da resposta imunológica, a presença de melatonina pode atuar inibindo a síntese de TNF, IL1β, IL6, IL-8 e IL-10 em leucócitos, além de atenuar a regulação positiva de ciclooxigenase-2 (COX-2) e de oxido nítrico-sintase induzível (iNOS), contribuindo para o retorno ao estado quiescente destas células (Xia et al., 2012).

Deste modo, a troca do local de produção da melatonina, da pineal para tecidos e órgãos periféricos é o conceito chave do eixo imune-pineal e sua ativação apropriada é de extrema importância para que os organismos sejam capazes de lidar tanto com situações de higidez quanto de perigo.

1.2.5 Sepse e melatonina

Apesar a existência de inúmeros processos fisiológico regulando tanto a montagem quanto o controle do processo inflamatório, há situações onde este equilíbrio é quebrado apresentando graves riscos à integridade do organismo. Nos contextos em que ocorrem ativações descontroladas do sistema imunológico (como na sepse e choque séptico), é provável que um ou mais dos eixos de regulação do processo inflamatório estejam mal ajustados, dentre eles o eixo imune-pineal.

Diversos estudos têm avaliado as alterações na produção de melatonina em quadros inflamatórios desregulados e a eficácia do tratamento com melatonina em proteger os indivíduos da instalação do quadro ou revertera mortalidade e comorbidades associadas.

Estudo abordando a correlação entre a concentração de melatonina plasmática e a intensidade do choque séptico em humanos mostrou que o ritmo circadiano de melatonina está alterado em pacientes em estado crítico e com sepse grave (Mundigler et al., 2002). Outro estudo em humanos mostra que a concentração de melatonina circulante está aumentada em pacientes com choque séptico em relação a pacientes não sépticos ou voluntários controle (Bagci et al., 2011). Nas fases iniciais do choque séptico, a ritimicidade de melatonina é perdida por um aumento mais pronunciado durante o dia. Além disso, este aumento se correlaciona positivamente ao aumento das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-6 (Li et al., 2013). Apesar dos autores não discutirem tal possibilidade, um efeito destas citocinas sobre a produção de melatonina por células imunocompetentes ou outras fontes extra pineal poderia explicar o aumento de melatonina observado.

Estudos realizados em roedores demonstram que o tratamento com melatonina diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias (Carrillo-Vico et al., 2005; Wu et al., 2008), degeneração hepática (Sewerynek et al., 1995), falência circulatória (Wu et al., 2001) e aumenta a sobrevivência dos animais (Wu et al., 2001; Carrillo-Vico et al., 2005). Um dos aspectos relacionados com as alterações vasculares observadas em choques sépticos/endotóxicos é a produção exacerbada de óxido nítrico (Mestriner et al., 2007, Nardi et al.,

2014, Scheschowitsch et al., 2015). Concentrações de melatonina compatíveis às encontradas na circulação durante a noite reduzem a produção de óxido nítrico por células endoteliais vasculares (Tamura et al., 2009, Escames et al., 2003).

A redução na migração tecidual de neutrófilos durante quadros de inflamação sistêmica está associada a uma maior letalidade (para revisão ver Sônego et al., 2014). Esta diminuição na migração de células imunocompetentes para o foco infeccioso é mediada por uma maior ativação de receptores de TNF (Secher et al., 2009). Como mencionado anteriormente, o TNF inibe a produção hormonal da pineal (Fernandes et al., 2006) mas, aumenta a produção de melatonina por células imunocompetentes (Pontes et al.,2006; Muxel et al., 2012). No contexto do eixo imune-pineal, a redução da melatonina circulante facilita a migração de leucócitos mono e polimorfonucleares e que nos diferentes compartimentos (periféricos ou do sistema nervoso central) algumas células imunocompetentes (fagócitos e linfócitos, por exemplo) passam a produzir melatonina localmente, controlando aspectos imunológicos tais como produção de citocinas e capacidade fagocítica (Markus et al., 2018). Considerando o papel inibitório da melatonina sobre adesão de neutrófilos ao endotélio vascular (Lotufo et al., 2001, Tamura et al., 2010), uma produção indevida desta indolamina pela pineal ou fontes extra pineais poderia, nas fases iniciais do processo inflamatório, agravar o quadro. A migração inadequada das células imunológicas entre os diferentes compartimentos corpóreos poderia resultar, por exemplo, em uma imunomodulação prejudicada e/ou ativação dessas células em locais inadequados.

Até o momento, além da produção de melatonina circulante e metabólitos urinários, nenhum trabalho comparou o padrão de ativação do sistema melatonérgico entre processos inflamatórios sistêmicos bem ajustados (não letais) e desregulados (letais). Além da alternância na produção de melatonina preconizada pelo Eixo Imune-Pineal, alterações na capacidade de células imunocompetentes em perceber a melatonina também devem ser consideradas. Neste sentido, a análise do padrão de expressão dos receptores de melatonina MT1 e MT2 em células imunocompetentes nas situações inflamatórias letais e não letais pode ser uma fonte de informação

potencialmente relevante, não apenas para o entendimento mais profundo do papel deste sistema melatonérgico durante processos inflamatórios, mas também para a proposição de terapêuticas melhores direcionadas de quadros inflamatórios desregulados e letais.

Com base neste referencial teórico, as seguintes hipóteses de trabalham foram testadas na presente dissertação: 1) a ativação do eixo imune-pineal durante quadros endotóxicos letais está alterada em comparação a um quadro não letal; 2) estas diferenças estão associadas tanto com a dinâmica de produção de melatonina pela glândula pineal e células imunocompetentes quanto com a expressão de receptores de melatonina MT1 e MT2 em células imunológicas; 3) a proteção dada pela estimulação elétrica do ponto de acupuntura E36 estará associada com o ajuste na ativação do eixo imune-pineal e 4) a modulação d a atividade dos receptores de melatonina Mt1 e MT2 será capaz de mortalidade induzida por choque endotóxico letal.

2. OBJETIVOS

Esta dissertação tem como objetivo caracterizar o padrão de ativação e avaliar a relevância do eixo imune-pineal em processos inflamatórios sistêmicos letais e não letais induzidos por injeção intravenosa de LPS em ratos.

Além disso, foram avaliados os efeitos de tratamentos que visam restabelecer o funcionamento do sistema melatonérgico. Para tanto, duas estratégias foram utilizadas: i) tratamento dos animais com estimulação elétrica de ponto de acupuntura que induz efeitos imunoreguladores (E36) e ii) tratamento com fármaco agonista MT1 e antagonista MT2 (5-HEAT).

Nos experimentos foram avaliados os perfis temporais de produção de melatonina, corticosterona e citocinas no plasma, expressão das enzimas da via de síntese de melatonina, AANAT, PAANAT e ASMT, assim como dos receptores desta indolamina, MT1 e MT2 em macrófagos e linfócitos, sanguíneos e teciduais. A sobrevivência dos animais também foi determinada na caracterização dos modelos e para avaliar a eficácia dos tratamentos.

3. METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar livres de patógenos específicos com 2 a 3 meses de idade provenientes do biotério do IB-USP. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12/12h, com ZT0 às 20:00 (ZT: *Zeitgeber Time*, termo advindo do alemão significando “doador de tempo”, ZT0 é definido como o momento em que as luzes se acendem) e recebendo ração e água *ad libitum.* Eutanásia realizada por decapitação por guilhotina. Todos os procedimentos descritos foram aprovados pela CEUA do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Protocolo CEUA IBUSP 207/2014).

3.2 Escolha do modelo

A endotoxemia por administração de LPS i.v. foi escolhida em detrimento de outros modelos de choque inflamatório pela possibilidade de controle da intensidade da reação (letal ou não letal) através da mudança de dose administrada, não sendo necessária a adição de outros procedimentos. Além disto, trata-se de uma inflamação estéril, onde não há a presença de microorganismos perpetuando a reação inflamatória e modulando a resposta imune. Deste modo, no presente trabalho a mortalidade decorrente do choque endotóxico era dependente exclusivamente da desregulação da resposta imunológica.

O padrão ouro para modelo de choque séptico, o ligamento e punção cecal (CLP) tem como base o extravasamento de conteúdo cecal no peritônio, promovendo a migração de bactérias da flora intestinal para a circulação (Rittirsch et al., 2009). A partir dos dados obtidos na presente dissertação servirão de base de comparação para estudos futuros que utilizem outros modelos de inflamação sistêmica letal.

3.3 Determinação das doses letal e não-letal de LPS

Foi realizado um ensaio de sobrevivência para determinar a dose ideal de LPS a ser administrada para deflagrar uma reação inflamatória não-letal e um choque endotóxico letal. Para tanto, ratos foram divididos em três grupos, variando a dose de LPS (0,5, 10 ou 15 mg/kg). O LPS foi injetado sempre no ZT17 e foram acompanhados por até 8 dias, três vezes ao dia. Em caso de óbito, o dia e hora foram anotados.

3.4 Tratamentos

- *Caracterização do modelo:* animais injetados por via intravenosa (veia caudal) com salina (Nacl 0,9%), dose não letal de LPS (0,5 mg/Kg, diluído em salina) ou dose letal de LPS (15 mg/Kg, diluído em salina) foram eutanasiados 30 min, 1h, 2h ou 6h após as injeções, sempre no ZT18.
- *Tratamento com eletroacupuntura:* animais foram anestesiados e divididos em grupos Sham (ponto sem ação) e tratado (ponto E36). Após 30 minutos de estimulação elétrica os animais foram injetados com salina, LPS letal (15 mg/Kg) e eutanasiados 30 min, 1h, 2h ou 6h após as injeções, sempre no ZT18.
- *Tratamento com 5-HEAT:* animais foram injetados com veículo (DMSO 2% em solução salina), LPS não letal, LPS letal ou LPS letal + 5-HEAT (1 mg/Kg; na mesma seringa do LPS). Os animais foram eutanasiados 1h ou 6h após as injeções.

3.5 Estimulação elétrica de ponto de acupuntura

Neste grupo, os ratos receberam estímulo elétrico neuromodulatório através da eletroacunpuntura ou estímulo sham. Antes da inserção de agulhas, os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de solução contendo ketamina (72mg/kg) e xylasina (9,6mg/kg).

Após 30 minutos na injeção com anestésico foi inserida agulha de acupuntura com profundidade de 3 mm no ponto E36 Zusanli, localizado a 2 mm lateral ao tubérculo anterior da tíbia no músculo tibial anterior e 4 mm

abaixo da região mais distal da articulação do joelho. Nos grupos Sham, foi estimulado um ponto sem efeito na via da inflamação, localizado à 3 cm distal ao ponto E36, a 5 mm da base da calda, no músculo Semitendíneo. Em ambos os grupos, foi realizado um estímulo elétrico nas agulhas durante 20 minutos com amplitude de onda de 4V, corrente de 40 mA, largura de pulso de 50 µs e frequência de 10 Hz (baseado em Torres-Rosas et al., 2014) utilizando um eletroestimulador apropriado (Cosmotron – Brasil). Após 30 minutos do estímulo neuromodulatório ou sham, os animais dos grupos Eletroacupuntura/LPS e Sham/LPS receberam injeção intravenosa de LPS 15 mg/kg 1, 2 e 6 horas antes da eutanásia. Os grupos Sham/Salina e Eletroacupuntura/Salina receberam injeção intravenosa de solução salina, nos mesmos tempos dos grupos que receberam LPS.

3.6 Sobrevivência de animais estimulados eletricamente ou tratados com 5-HEAT

Foram realizados ensaios de sobrevivência para verificar o efeito da eletroacupuntura e tratamento com 5-HEAT na sobrevivência de ratos que receberam dose letal de LPS. Nos ensaios com EA, os ratos foram divididos em dois grupos, recebendo eletroestimulação no ponto E36 ou ponto Sham e após 30 minutos, ambos os grupos receberam injeção i.v. de 15mg/kg de LPS, no ZT17. Nos ensaios com 5-HEAT, os animais foram divididos em injetados (i.v.) com veículo + LPS letal (injetados simultaneamente no ZT17) ou 5-HEAT+ LPS letal (injetados simultaneamente no ZT17). Os animais foram acompanhados, três vezes ao dia, durante oito dias. Em caso de óbito, o dia e hora foram anotados.

3.7 Coleta de soro e pineais

Logo após a eutanásia, foram realizados dois cortes paralelos à sutura sagital mediana no crânio, que foi rebatida e a pineal coletada. O sangue foi coletado em recipiente com 300 µl de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) na concentração de 0,5M e centrifugado a 500g por 15 minutos à

temperatura ambiente. Soro e pineal obtidos foram armazenados a -80 ^{o}C para posterior análises.

3.8 Obtenção de leucócitos circulantes

Após a retirada do soro foi adicionado ao sangue 10 ml de tampão de lise contendo 11,5 mM de NH_4Cl, 0,01 mM de EDTA e 1mM de $KHCO_3$. Foi feita uma incubação por 4 minutos a temperatura ambiente seguida de centrifugação a 400 g por 5 minutos também a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 10 ml de tampão fosfato-salino (PBS) para filtragem em separador celular com trama de 100 µm. A solução resultante foi novamente centrifugada a 400 g por 5 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 1 ml de meio RPMI para contagem em câmara de Neubauer.

3.9 Obtenção de leucócitos peritoneais

Logo após a eutanásia foi realizado lavado peritoneal através de uma incisão de 1,5 cm do músculo reto abdominal com 15 ml de PBS gelado e conteúdo coletado foi centrifugado a 400G, 4°C por 15 minutos. Sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 1 ml de RPMI para contagem em câmara de Neubauer.

3.10 Dosagens de melatonina, corticosterona e citocinas

As dosagens de melatonina, corticosterona e citocinas (TNF, IFN-γ, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12) no plasma foram feitas por kits comerciais (IBL, Hamburgo, Alemanha) ou kits multiplex magnéticos (Merck-Millipore, EUA) conforme recomendações dos fabricantes. Os limites inferiores de detecção dos kits são: corticoesterona – 5 nmol/L, melatonina – 3 pg/ml, TNF – 2,4 pg/ml, IFN-γ – 14,6 pg/ml, IL-4 – 4,9 pg/ml, IL-6 – 73,2 pg/ml, IL-10 – 7,3 pg/ml e IL-12 – 12,2 pg/ml).

O conteúdo de NAS e melatonina nas glândulas pineais foi determinado pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção eletroquímica, segundo método descrito por Ferreira e col. (1994) e Mortani-Barbosa e col. (2000) com pequenas modificações. O sistema cromatográfico utilizado (Waters System, Milford, MA, EUA) foi constituído por bomba Waters® 1525µ operada isocraticamente, coluna de fase reversa, Resolve C18 (partícula esférica de 5µm; 3,9x150mm) mantida em forno à temperatura de 35°C, injetor automático Waters Autosampler 2707 e detector eletroquímico Waters® 2465 operado em modo DC (corrente contínua). Todos os parâmentros da análise foram controlados pelo programa computacional Empower (Waters System, Milford, MA, EUA) e o potencial do detector eletroquímico ajustado para +0,90 V versus eletrodo de referência Ag/AgCl.

Soluções estoque de NAS (1 mM) e melatonina (1 mM) foram preparadas em HCl 0,1 M acrescido de 0,02% de metabissulfito de sódio e 0,02% de EDTA e diluídas, no momento da análise, em ácido perclórico 0,1 M acrescido de 0,02% de metabissulfito de sódio e 0,02% de EDTA de modo a se obter concentrações da ordem de 0,05 a 8,0 ng. As glândulas pineais foram homogeneizadas com pistilo de teflon durante 15 segundos em banho de gelo em 120 ul de uma solução de ácido perclórico 0,1 M acrescido de 0,02% de metabissulfito de sódio e 0,02% de EDTA. Este material foi então centrifugado a 18000 x g por 10 min a 4oC e 20 ul do sobrenadante foi injetado diretamente no HPLC. A fase móvel utilizada para a análise de NAS foi constituída de acetato de sódio 0,1 M, ácido cítrico 0,1 M, EDTA 0,15 mM e metanol (96/4, V/V), pH 3,7 a um fluxo de 0,5 ml/min. Para a análise de melatonina o volume de metanol foi acrescido para 25%.

3.11 Marcação de células para citometria

As células obtidas do peritônio e do sangue foram divididas em placas de 96 poços com fundo em “u” (10^6 células por poço), fixadas por paraformaldeído (4% em PBS), permeabilizadas com triton (0,1% em PBS),

ligações inespecíficas bloqueadas com solução de albumina bovina (BSA, 2% em PBS) e marcadas com anticorpos primários para CD11b\c conjugados com PE (Biolegend - EUA) ou PECy7 (Biolegend - EUA) para marcação de fagócitos ou anticorpos primários anti- CD3 conjugado a PE (Biolegend - EUA) e ou anti-CD4 conjugado a PECy7 (Biolegend - EUA) para marcação de linfócitos T. Anticorpos primários anti-AANAT, anti-PAANAT, anti-ASMT,anti- MT1 ou anti-MT2 anti-rat (Rheabiotech - Brasil) foram incubados por 1h e, após lavagem com PBS foram incubados com anticorpo secundário FITC anti-rabbit (Santa Cruz - EUA) por mais uma hora. Após lavagem com PBS, realizada análises por citômetro de fluxo acoplado à microscopia Amnis Flow Sight (EMD Millipore – Alemanha) utilizando-se laser 488 e uma ampliação de 20 vezes.

3.12 Citometria de fluxo

Após coletadas, as amostras foram analisadas no software IDEAS (EMD Millipore – Alemanha). Foi aplicada uma matriz de compensação obtida através da passagem de amostras contendo apenas um fluoróforo e realizada separação dos fagócitos das outras células por regiões (Figura 1) e quantificada a fluorescência dos anticorpos relacionadas às enzimas e receptores de interesse.

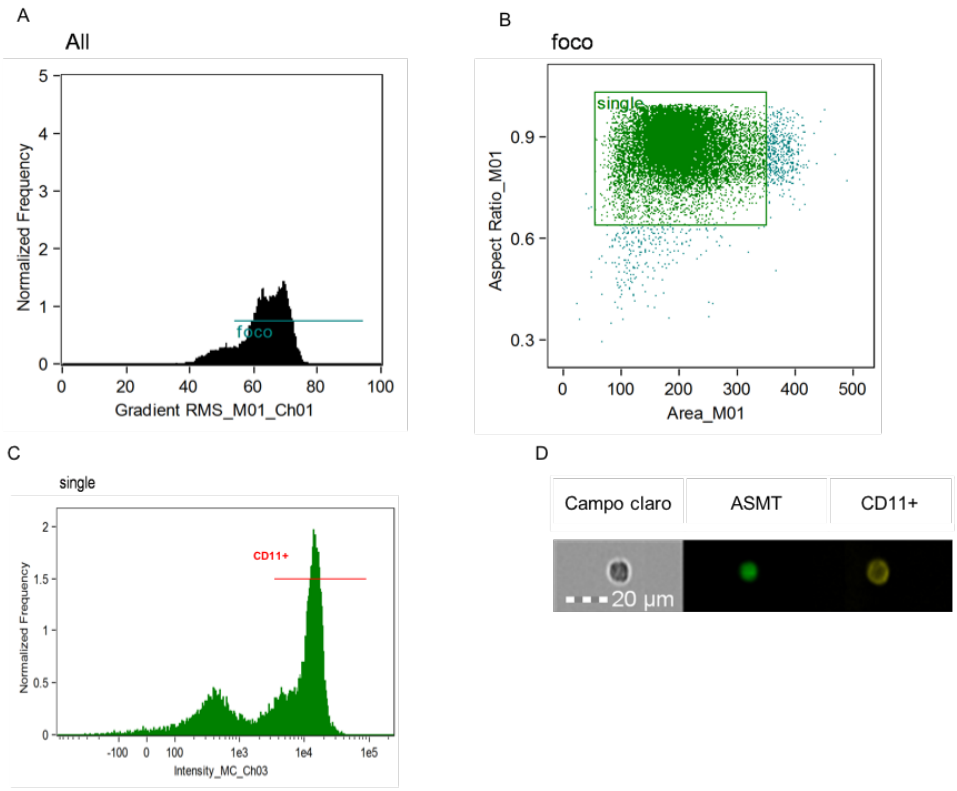

Figura 1 – Regiões de separação para citometria. Com os dados coletados, foi realizada separação por regiões de interesse. (A) Com o gradiente RMS (do inglês *root mean square*, raiz da média dos quadrados), escolhe-se a região com maior valor determinando um melhor foco ótico da amostra. (B) Dentro das células com foco adequado, são separadas as células únicas, determinadas pelo *aspect ratio*, que é a relação da altura com a largura da célula com sua área. (C) Das células únicas, é escolhida a região positiva para marcação com o anticorpo de interesse (anti-CD11b/c, no exemplo) delimitando assim os fagócitos da população coletada. (D) Imagens obtidas de cada célula, com campo claro e fluorescência, neste caso de fagócito expressando CD11b/c (PE) e ASMT (FITC)

3.13 Análise Estatística

Os dados coletados serão comparados por análise de variância de uma ou duas vias seguidas pós-testes de Tukey ou Bonferroni. Comparação entre dois grupos será feita por teste t de Students. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média. Análises univariadas de sobrevivência foram feitas utilizando curvas de Kaplan-Meier e os testes log-rank (Mantel-Cox) e Gehan-Breslow-Wilcoxon. Foi adotado nível de significância de 5% ($p<0,05$). As análises estatísticas foram realizada pelo software Graph Pad Prism versão 6.0 (GraphPad Software).

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização de modelos letais e não letais de endotoxemia

Primeiramente, foi determinada a dose letal de injeção intravenosa de LPS. Para tanto, foi realizado ensaio de sobrevivência variando-se a dose de LPS administrada. Não foi observada mortalidade nos animais injetados com LPS 0,5 mg/kg, animais que receberam 10 mg/kg de LPS apresentaram mortalidade de 25% e 100% dos animais que receberam 15 mg/kg de LPS evoluíram a óbito (Fig 2). A partir destes dados, a dose de 15 mg/kg de LPS foi selecionada como letal e a de 0,5 mg/kg como dose não-letal.

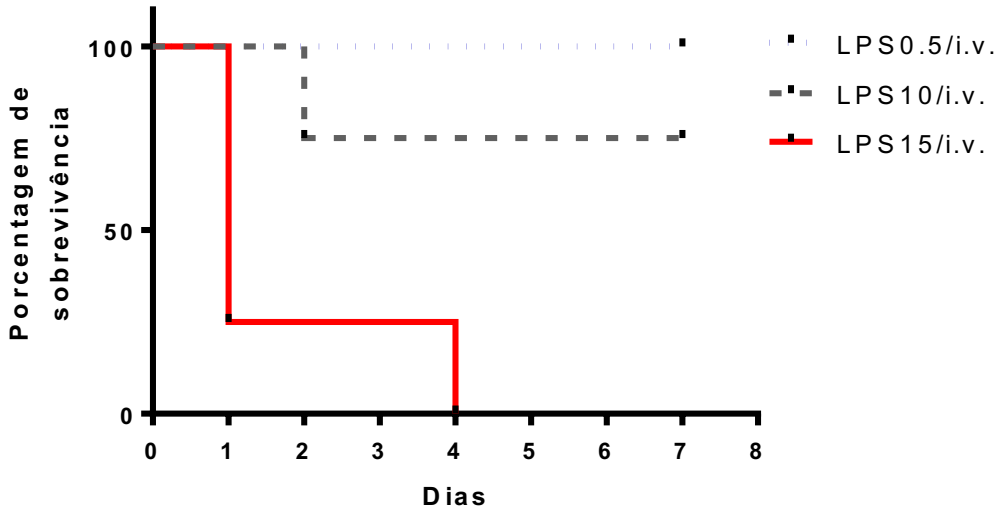

Figura 2 – Ensaio de sobrevivência à diferentes doses de LPS. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier de animais injetados com LPS (0,5, 10 ou 15 mg/kg; i.v.) em ZT17. Animais foram verificados três vezes ao dia e, em caso de óbito, hora e dia foram anotados e o animal retirado da caixa. n= 6-8 ratos por grupo.

4.1.1 Citocinas plasmáticas

A seguir foram comparados os perfis de expressões das citocinas TNF, IL-6, IL-10, IFN-γ, IL-4 e IL-12 nos diferentes tempos de estímulo com LPS letal e não-letal (Figura 3). O aumento na concentração plasmática de TNF após uma hora de administração de LPS foi significativamente maior na dose letal do que na não letal (Figura 3A). Produções significativamente maiores das citocinas IL-6 (Figura 3B), IL-10 (Figura 3C), IFN-γ (Figura 3D), IL-4 (Figura 3E) e IL-12 (Figura 3F) também foram observadas no grupo

injetado com dose letal de LPS. No caso da IL-6 e da IL-10 estes aumentos já foram observados após 2 horas e persistiram até as 6 horas de inflamação. Já para IFN-γ, IL-4 e IL-12, os aumentos relativos ao grupo não letal só ficaram evidentes após 6 horas de estímulo com LPS letal. Curiosamente, a produção de IL-12 foi significativamente menor 1 hora após a injeção letal em relação a dose não letal.

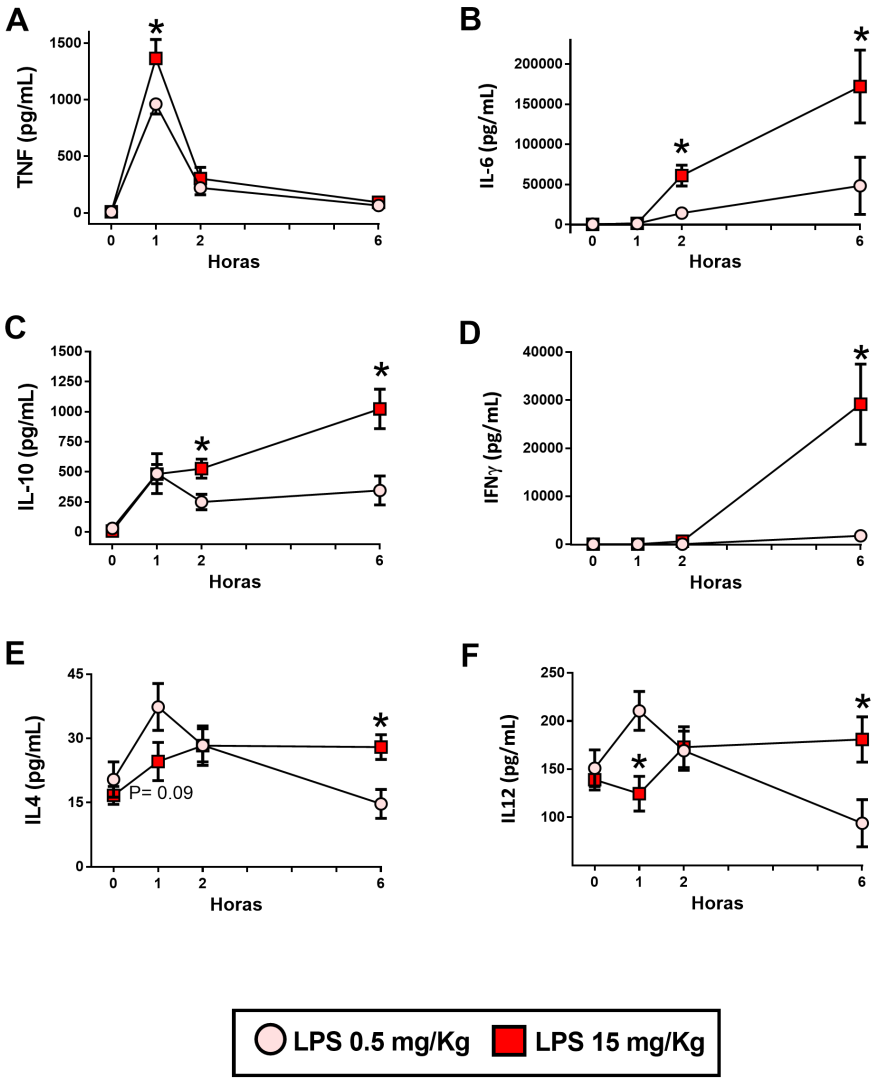

Figura 3. Decurso temporal dos níveis de citocinas circulantes. Animais injetados i.v. com dose não-letal de LPS (0,5 mg/Kg; círculos rosas) ou dose letal de LPS (15 mg/kg; quadrados vermelhos) tiveram os níveis de TNF (A), IL-6 (B), IL-10 (C), IFNγ (D), IL-4 (E) e IL-12(F) determinados após 1, 2 ou 6 h de injeção. Dados são apresentados como média ± epm (n = 6-8 animais por ponto). * P < 0,05 vs tempo de injeção correspondente do grupo LPS 0,5 mg/kg

4.1.2 Corticosterona e melatonina

Os padrões de produção temporal de corticosterona e de melatonina também são diferentes quando comparamos os estímulos letal e não-letal. Apesar dos níveis de corticosterona começarem a aumentar após uma hora em ambos os grupos, este foi significativamente maior nos animais que receberam a dose letal de LPS (Figura 4A). As concentrações de melatonina circulante, por outro lado, apresentaram diferentes perfis de variação temporal quando comparamos as injeções letal e não-letal de LPS. Na dose não-letal, há uma diminuição dos níveis de melatonina circulante em todos os tempos observados, já na dose letal, há primeiro um aumento de produção na primeira hora e então uma diminuição aos mesmos níveis do estímulo não-letal com 2 e 6h (Figura 4B). Na glândula pineal, foi possível observar uma diminuição da produção de NAS (Figura 4C) e melatonina (Figura 4D) após uma hora de estímulo com LPS tanto no grupo letal como não letal. Além disso, em ambas as situações após 6 horas de inflamação sistêmica tanto a produção de NAS quanto a de melatonina na pineal voltaram aos valores observados no grupo salina.

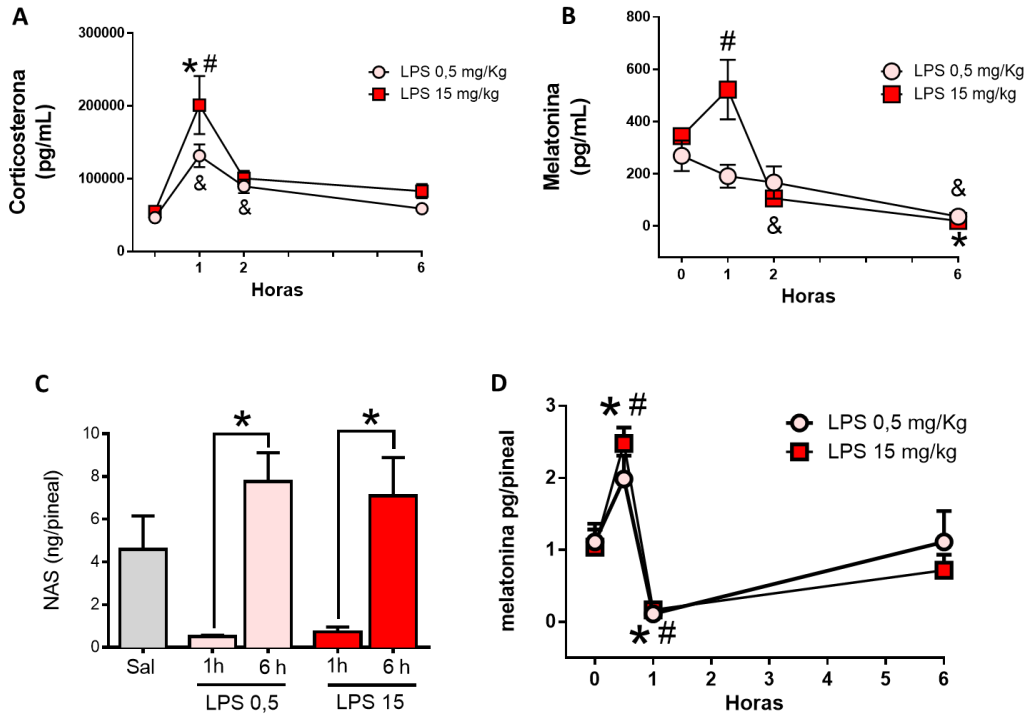

Figura 4. Decurso temporal dos níveis de corticosterona e melatonina no plasma e na pineal. Animais injetados i.v. com salina (tempo 0), dose não-letal de LPS (0,5 mg/Kg; círculos rosas) ou dose letal de LPS (15 mg/kg; quadrados vermelhos) tiveram os níveis de corticosterona (A) e melatonina (B) determinados após 1, 2 ou 6 h de injeção. Dados são apresentados como média ± epm (n = 4-6 animais por ponto). * P < 0,05 vs grupo salina da curva de LPS 15 mg/Kg; # P < 0,05 vs tempo de injeção correspondente do grupo LPS 0,5 mg/Kg. A produção de NAS (C) e melatonina (D) também foram determinadas na glândula pineal. * P < 0,05 vs grupo salina (curva LPS 15 mg/Kg), # P < 0,05 vs grupo salina (curva LPS 0.5 mg/Kg),

4.1.3 Sistema melatonérgico em células imunocompetentes

A expressão das enzimas da via de síntese de melatonina e dos receptores de melatonina do tipo MT1 e MT2 foram analisadas em fagócitos (CD11b/c+) e linfócitos T *helper* (CD3/CD4+) presentes na cavidade peritoneal e no sangue. Os resultados mostram que diversas alterações nos perfis temporais de expressão destas enzimas e receptores são dependentes da intensidade do estímulo aplicado.

Nos fagócitos da cavidade peritoneal estimulados em dose letal de LPS observamos um aumento da expressão de AANAT após 0,5h de estímulo em relação ao grupo não letal. Entretanto, após 2h de estímulo, este padrão é invertido, sendo observado um aumento no grupo não letal, significativamente maior que no grupo letal (Figura 5A). Com relação a PAANAT, forma ativa da enzima AANAT, há um aumento de sua expressão

no grupo letal em relação ao grupo não letal após 0,5 e 2h de estímulo. (Figura 5B). A expressão da enzima ASMT apresentou perfis similares em ambas as doses de LPS utilizadas (Figura 5C). Quando analisamos os receptores de melatonina, constatamos que a dose letal de LPS reverteu significativamente a diminuição na expressão de MT1 observada 0,5h e 1h após a injeção da dose não letal de LPS (Figura 5D). A dose letal de LPS também alterou o perfil de expressão dos receptores do tipo MT2 em comparação à dose não letal. Neste caso, temos a impressão que a dose letal retardou o aumento na expressão de MT2 induzida pela inflamação, uma vez que o aumento observado com uma hora de inflamação não letal só foi observado após 2h da injeção letal (Figura5E).

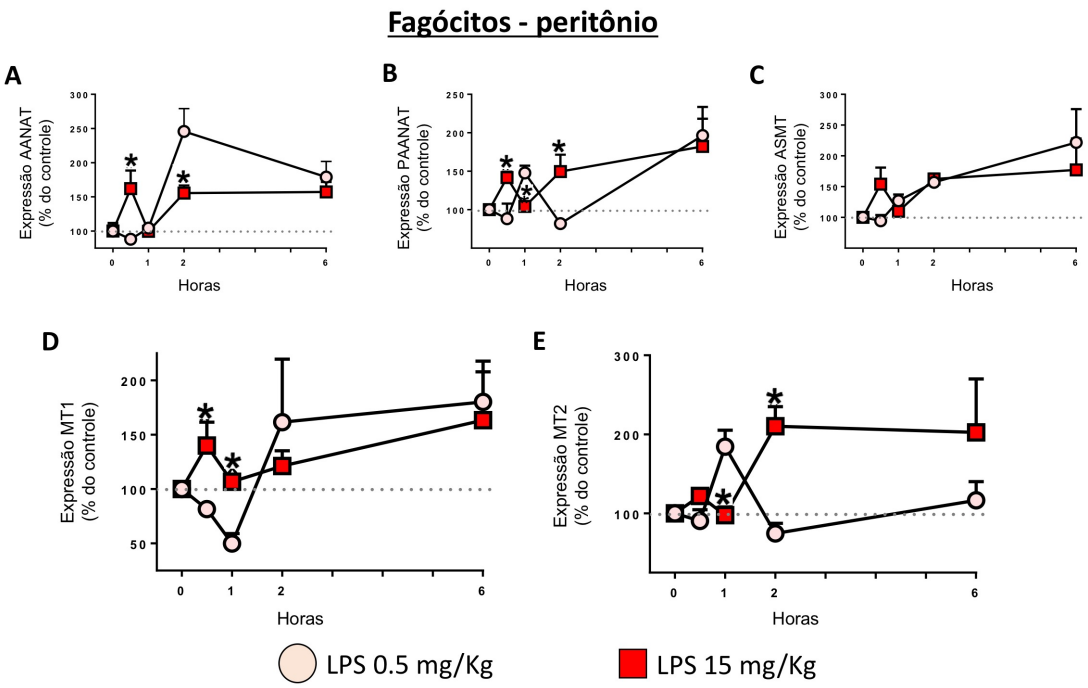

Figura 5. Decurso temporal da expressão das enzimas e receptores de melatonina em fagócitos (CD11b/c$^+$) da cavidade peritoneal. Animais injetados i.v. com dose não-letal de LPS (0,5 mg/Kg; círculos rosas) ou dose letal de LPS (15 mg/kg; círculos vermelhos) tiveram a expressão de AANAT (**A**), PAANAT (**B**), ASMT (**C**), MT1 (**D**) e MT2 (**E**) determinadas após 30 min, 1, 2 ou 6 h de injeção de LPS por citometria de fluxo. Dados foram normalizadas pela média dos respectivos grupos salina (controle) e são apresentados como média ± epm (n = 4-6 animais por ponto). * P < 0,05 vs respectivo ponto de animais injetados com LPS 0,5 mg/Kg.

Nos fagócitos circulantes, a dose letal de LPS também alterou os perfis temporais da expressão das enzimas de síntese e dos receptores de melatonina em comparação à dose não letal. Tais alterações foram diferentes das encontradas nos fagócitos peritoneais, ocorrendo uma diminuição da

expressão de AANAT (Figura 6A) e de PAANAT (Figura 6B) em relação à observada na dose não letal e uma potenciação da expressão de receptores do tipo MT1 após 6h de estímulo inflamatório letal (Figura 6D). As expressões de ASMT (Figura 6C) e MT2 (Figura 6E) foram similares em ambos os grupos.

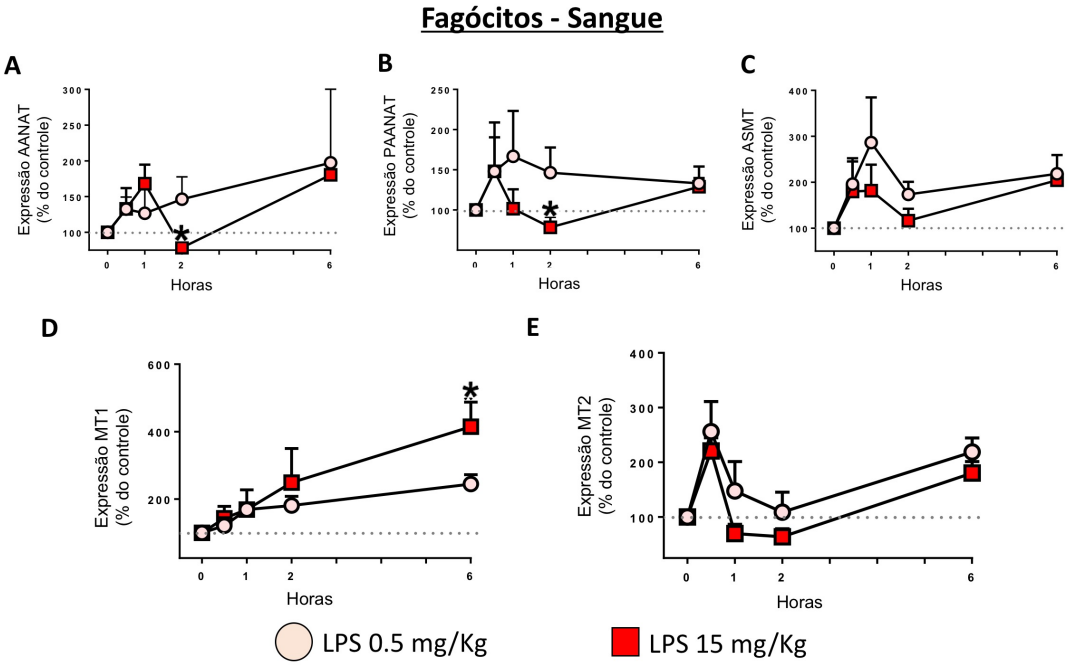

Figura 6. Decurso temporal da expressão das enzimas e receptores de melatonina em fagócitos (CD11b/c$^+$) do sangue. Animais injetados i.v. com dose não-letal de LPS (0,5 mg/Kg; círculos rosas) ou dose letal de LPS (15 mg/kg; círculos vermelhos) tiveram a expressão de AANAT (**A**), PAANAT (**B**), ASMT (**C**), MT1 (**D**) e MT2 (**E**) determinadas após 30 min, 1, 2 ou 6 h de injeção de LPS por citometria de fluxo. Dados foram normalizadas pela média dos respectivos grupos salina (controle) e são apresentados como média ± epm (n = 4-6 animais por ponto). * P < 0,05 vs respectivo ponto de animais injetados com LPS 0,5 mg/Kg.

Foram avaliadas também as expressões das enzimas de síntese e de receptores de melatonina em linfócitos T CD3/CD4 positivos nos modelos de endotoxemia não letal e letal.

Nos linfócitos T peritoneais, o grande aumento da expressão de AANAT observado no grupo injetado com LPS 0.5 mg/Kg foi significativamente menor no grupo letal após 2h de estimulo (Figura 7A). Por outro lado, a expressão de PAANAT no grupo letal não apresentou a mesma

redução observada após 1h no grupo não letal (Figura7B). Em relação a expressão de ASMT, há uma maior expressão no grupo não letal após 2h de estímulo (Figura 7C). Já no grupo letal, o aumento da expressão de ASMT é significativamente maior após 6h. Com relação aos receptores, apesar dos perfis serem similares, a redução na expressão de MT1 (Figura 7D) e MT2 (Figura7E) após 1 h de injeção não letal de LPS não foi observada no grupo letal.

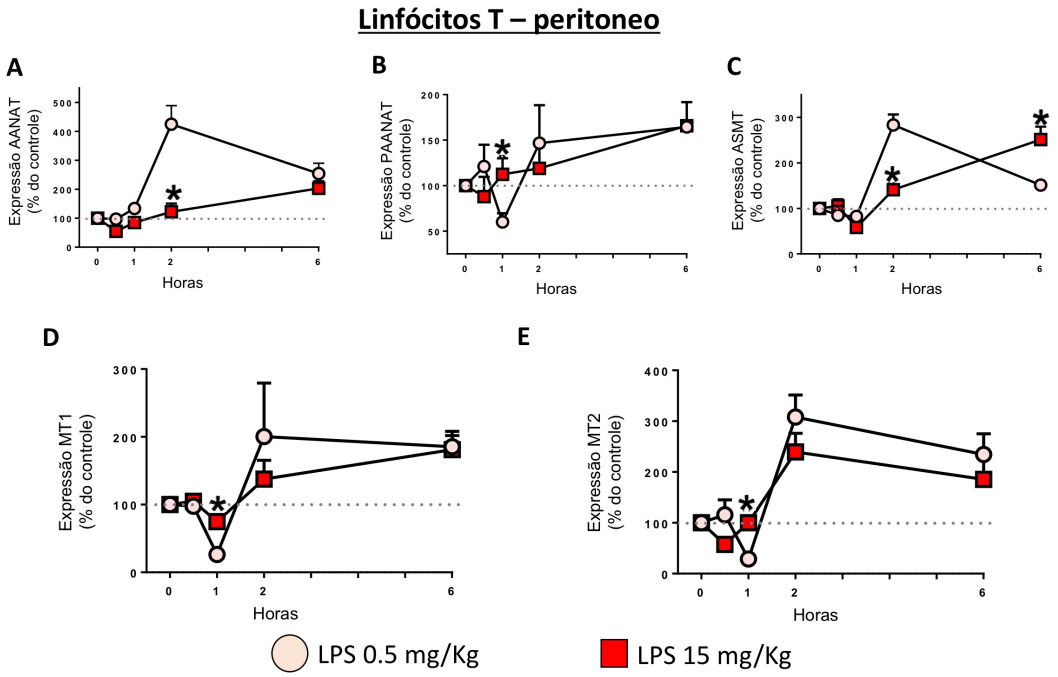

Figura 7. Decurso temporal da expressão das enzimas e receptores de melatonina em Linfócitos T ($CD3^+CD4^+$) da cavidade peritoneal. Animais injetados i.v. com dose não-letal de LPS (0,5 mg/Kg; círculos rosas) ou dose letal de LPS (15 mg/kg; círculos vermelhos) tiveram a expressão de AANAT (**A**), PAANAT (**B**), ASMT (**C**), MT1 (**D**) e MT2 (**E**) determinadas após 30 min 1, 2 ou 6 h de injeção de LPS por citometria de fluxo. Dados foram normalizadas pela média dos respectivos grupos salina (control) e são apresentados como média ± epm (n = 4-6 animais por ponto). * P < 0,05 vs respectivo ponto de animais injetados com LPS 0,5 mg/Kg.

Por fim, nos linfócitos T do peritônio não foram observadas diferenças significantes na expressão das enzimas da via de biossíntese da melatonina e do receptor do tipo MT1 (Figura. 8A, 8B, 8C e 8D). Contudo, o aumento na expressão de MT2 após 2h horas de estimulação com LPS 0,5 mg/Kg só ocorre após 6 da estimulação com LPS 15 mg/Kg (Figura 8E).

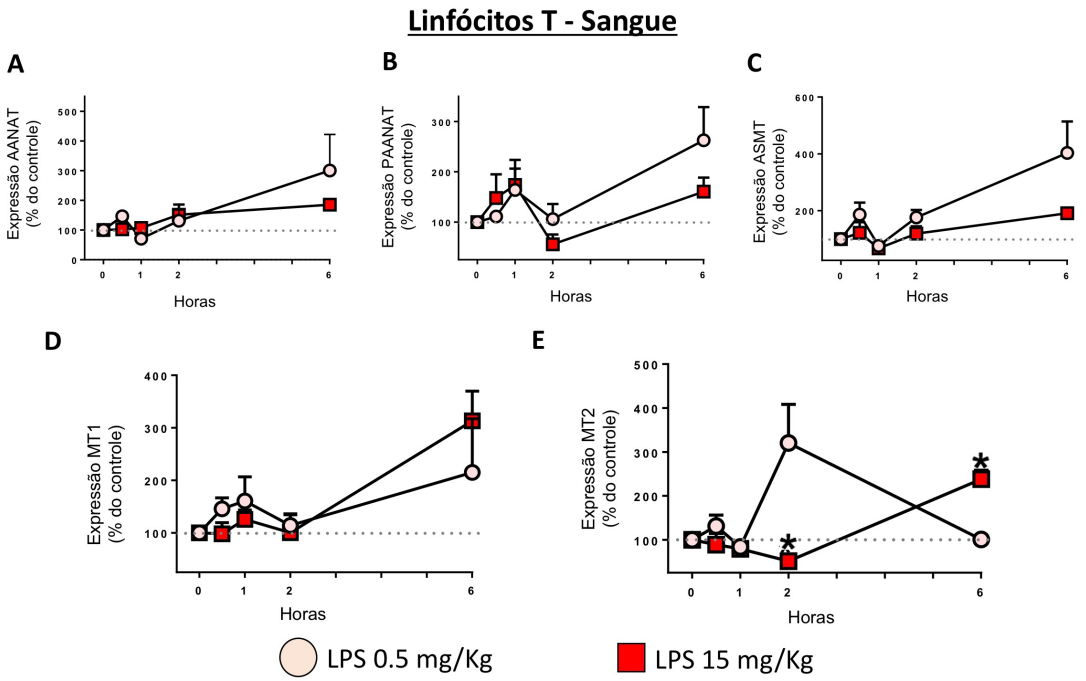

Figura 8. Decurso temporal da expressão das enzimas e receptores de melatonina em Linfócitos T ($CD3^+CD4^+$) do sangue. Animais injetados i.v. com dose não-letal de LPS (0,5 mg/Kg; círculos rosas) ou dose letal de LPS (15 mg/kg; círculos vermelhos) tiveram a expressão de AANAT (**A**), PAANAT (**B**), ASMT (**C**), MT1 (**D**) e MT2 (**E**) determinadas após 30 min 1, 2 ou 6 h de injeção de LPS por citometria de fluxo. Dados foram normalizadas pela média dos respectivos grupos salina (control) e são apresentados como média ± epm (n = 4-6 animais por ponto). * P < 0,05 vs respectivo ponto de animais injetados com LPS 0,5 mg/Kg.

4.2 Tratamentos

4.2.1 Eletroacupuntura (EA)

A primeira forma de tratamento avaliada neste projeto foi a eletroacupuntura do ponto E36 que, em camundongos, diminuiu a mortalidade dos animais em resposta a endotoxemia com LPS (Torres-Rosas et al., 2014).

Foram quantificadas as citocinas TNF, IL-10, IL-4, IL-12, IL-6 e IFN-γ circulantes após 1, 2 e 6h de injeção i.v. com LPS 15 mg/kg em animais pré-tratados com estimulação elétrica em pontos Sham (cujo estímulo não apresenta efeito sobre a resposta imunológica) ou no ponto de acupuntura E36 (Figura 9). Em relação ao grupo Sham, o tratamento com EA reduziu significantemente o pico de TNF após 1h de injeção com LPS letal (Figura 9A), aumentou a produção de IL-10 após 1h e diminuiu sua produção após

6h de injeção com LPS (Figura 9C) e aumentou a produção de IL-4 (Figura 9E) e IL12 (Figura 9F) 1 h de inflamação. Interessante notar que os efeitos observados resultaram em um perfil de produção destas citocinas mais próximo ao observados em animais injetados com dose não letal de LPS (círculos rosas apresentados nas figuras). As citocinas IL-6 (Figura 9B) e IFN-γ (Figura 9D) não foram alteradas pelo tratamento com EA.

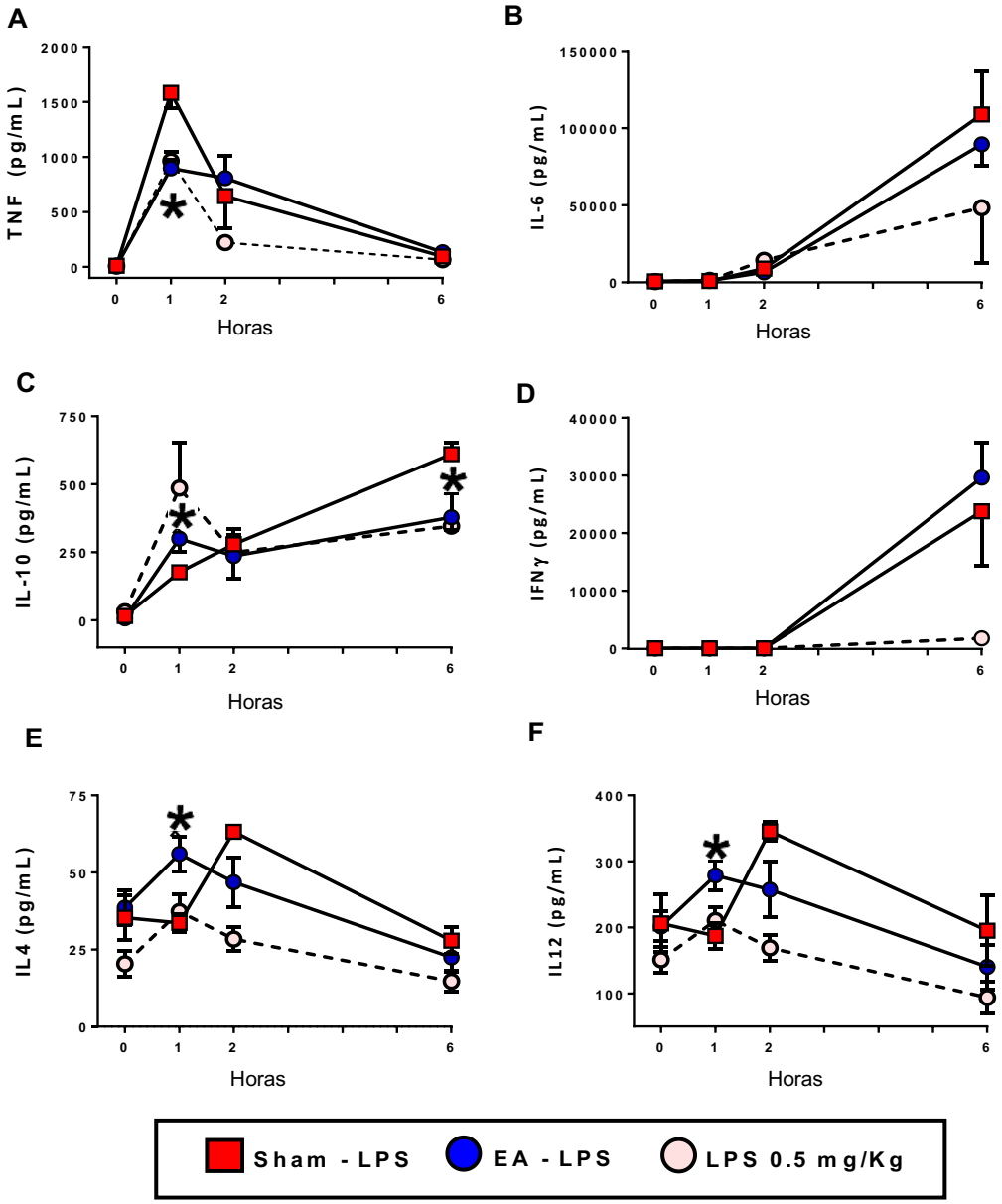

Figura 9. Decurso temporal dos níveis de citocinas circulantes. Animais tratados com EA (círculos azuis) ou estimulação Sham (quadrados vermelhos) foram injetados i.v. com salina (tempo 0) ou dose letal de LPS (15 mg/kg) tiveram os níveis séricos de TNF (**A**), IL-10 (**B**), IL-4 (**C**), IL-12 (**D**), IL-6 (**E**) e IFNγ (**F**) determinados após 1, 2 ou 6 h de injeção. Dados apresentados como média ± epm (n = 4 animais por ponto). * P < 0,05 vs grupo salina de animais Sham – LPS; & P < 0,05 vs grupo salina de animais EA - LPS; # P < 0,05 vs tempo de injeção correspondente do grupo Sham-LPS.

Quando analisado o perfil de produção de corticosterona nos grupos avaliados, foi possível observar que o tratamento com EA reduziu, em relação ao grupo Sham, o pico de produção deste hormônio duas horas após a injeção com LPS (Figura 10A). A produção de melatonina também foi alterada pela estimulação elétrica do ponto E36. O pico de melatonina observado após 6 h de injeção com LPS letal no grupo Sham não foi observado nos animais pré-tratados com EA (Figura 10B). Interessantemente, nos animais tratados com EA, os perfis temporais de ambos os hormônios ficaram similares aos observadas em animais injetados com dose não letal de LPS. (Figura 10).

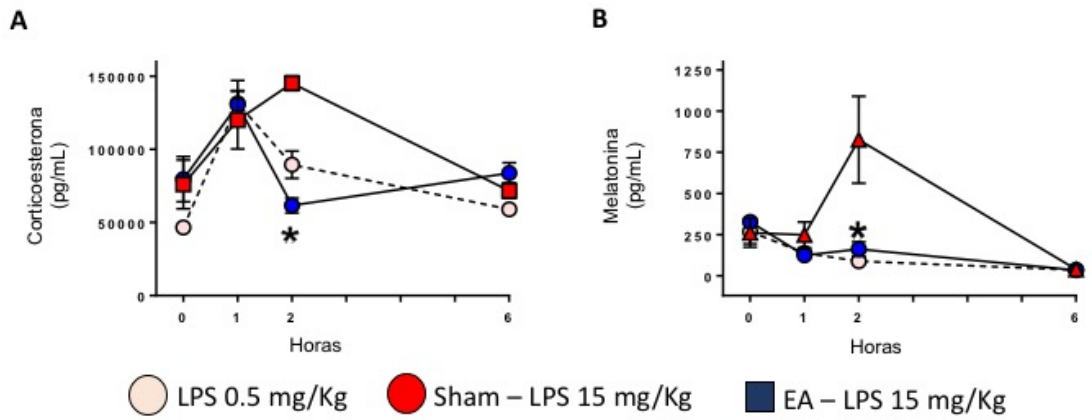

Figura 10. Decurso temporal dos níveis de corticosterona e melatonina circulantes. Animais tratados com EA (círculos azuis) ou estimulação Sham (quadrados vermelhos) foram injetados i.v. com salina (tempo 0) ou dose letal de LPS (15 mg/kg) e tiveram os níveis de corticosterona (**A**) e melatonina (**B**) determinados após 1, 2 ou 6 h de injeção. Dados são apresentados como média ± epm (n = 4-6 animais por ponto). * P < 0,05 vs tempo de injeção correspondente do grupo Sham-LPS. Curva de animais injetados com dose não letal de LPS (0.5 mg/Kg, círculos rosas) é apresentada para comparação.

Foram avaliadas as expressões das enzimas da via de síntese de melatonina e dos receptores de melatonina em fagócitos CD11b/c+ da cavidade peritoneal coletados 1, 2 e 6 h após estímulo i.v. com LPS 15mg/kg. Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos que receberam tratamento com acupuntura ou sham (Figura 11).

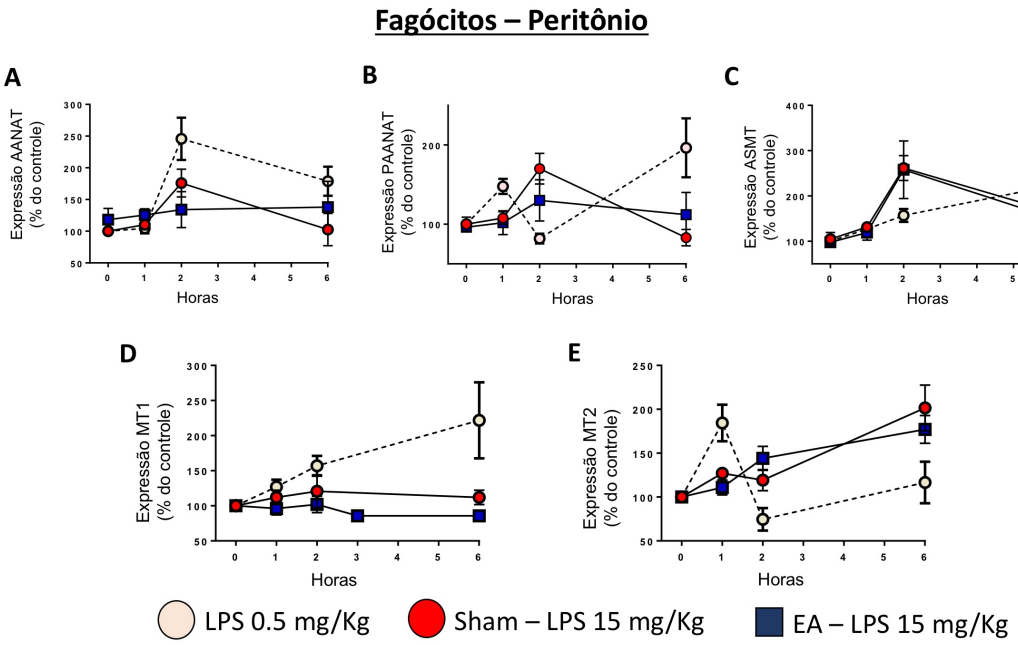

Figura 11 – Decurso temporal da expressão das enzimas da via de produção e receptores de melatonina em fagócitos peritoneais de ratos injetados com LPS. Grupos Sham e EA injetados com LPS (15mg/kg i.v.) e eutanasiados após 1, 2 e 6 horas. Isoladas as células da cavidade peritoneal e marcadas para CD11b/c, enzimas da via de produção AANAT(a), PAANAT(b), ASMT(c) e receptores de melatonina MT1(d) e MT2(e). Fluorescência quantificada em citometria de fluxo. Dados são apresentados como média ± epm (n = 4-6 animais por ponto). * P < 0,05 vs tempo de injeção correspondente do grupo Sham-LPS. Curva de animais injetados com dose não letal de LPS (0.5 mg/Kg, círculos rosas) é apresentada para comparação.

Foi avaliada também a expressão das enzimas da biossíntese da melatonina (Figuras 11A, 11B e 11C) e seus receptores (Figuras 11D e 11E) em linfócitos T CD3/CD4+ do peritônio após 2 e 6 h de estímulo com LPS em animais tratados com EA ou estímulo Sham. Não foram encontradas diferenças entre os grupos analisados.

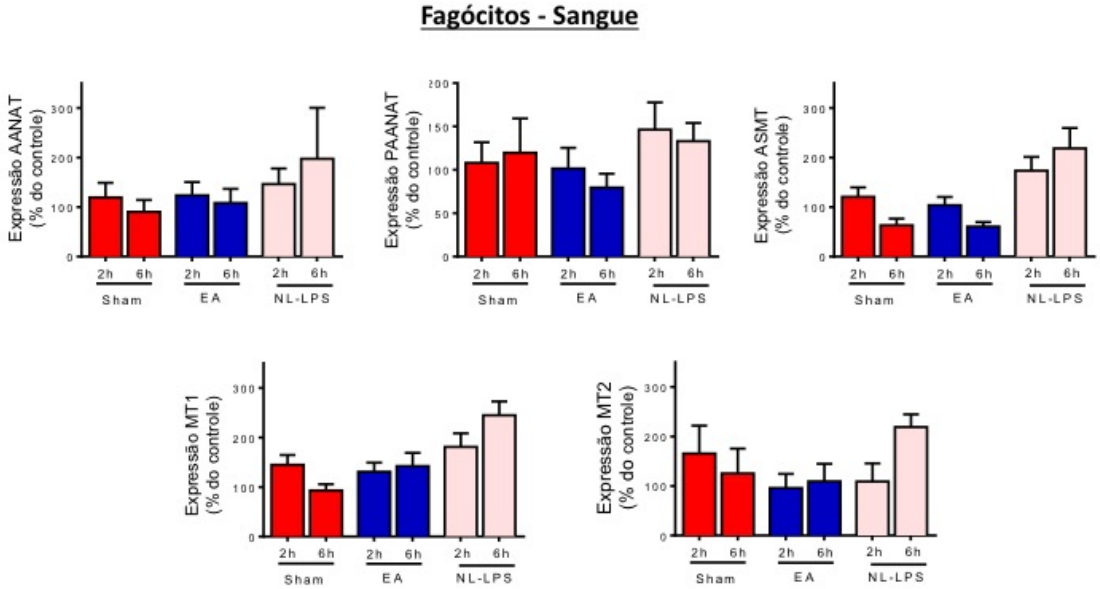

Figura 12 – Decurso temporal da expressão das enzimas e receptores de melatonina em fagócitos (CD11b/c^{+}) do sangue. Animais tratados com EA (barras azuis) ou estimulação Sham (barras vermelhas) tiveram a expressão de AANAT (**A**), PAANAT (**B**), ASMT (**C**) MT1 (**D**) e MT2 (**E**) determinadas após 2 ou 6 h de injeção de LPS por citometria de fluxo. Dados foram normalizadas pela média dos respectivos grupos Sham-salina (control) e são apresentados como média ± epm (n = 4-6 animais por ponto). Dados de animais injetados com dose não letal de LPS (0,5 mg/Kg, barras rosas) é apresentada para comparação.

Por fim, apesar das alterações na produção de citocinas e da corticosterona e da melatonina circulantes, a mortalidade destes animais não foi diminuída pelo tratamento (Figura 12).

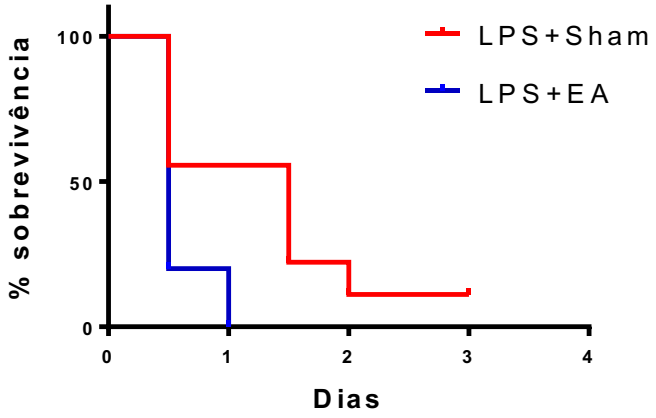

Figura 12 – Ensaio de sobrevivência ao estímulo com dose letal e eletroestimulação de ponto E36 ou Sham. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier de animais injetados com LPS (15 mg/kg; i.v.) em ZT17. Animais foram verificados três vezes ao dia e, em caso de óbito, hora e dia foram anotados e o animal retirado da caixa. n=8-10 ratos por grupo.

4.2.2 Agonista MT1 e antagonista MT2 (5-HEAT)

Tendo em vista que a dose letal de LPS inibiu as variações nos perfis temporais dos receptores de melatonina MT1 e MT2 observados em fagócitos e linfócitos (peritoneais e circulantes) após estimulação com LPS não letal, avaliamos como o tratamento com um fármaco de ação dupla sobre os receptores de melatonina, influencia a produção de citocinas e a mortalidade dos animais. Animais foram injetados com LPS 0,5mg/kg, LPS 15mg/kg ou LPS 15 mg/Kg concomitantemente à injeção com 5-HEAT, um agonista MT1 e antagonista MT2. O tratamento com 5-HEAT reduziu a produção de TNF após 1 h (Figura 13A) e de IL6 após 6h da injeção letal de LPS (Figura 13B) para níveis similares aos observados em animais injetados com dose não letal de LPS. Como visto anteriormente, a produção de INFγ é muito maior no grupo injetado com LPS 15 mg/Kg do que no injetado com LPS 0.5 mg/Kg (Figura 13D). Neste caso uma tendência de diminuição na produção desta citocina induzida pelo 5-HEAT para níveis próximos aos observados nos animais injetados com LPS não letal. Nos animais injetados com LPS letal, a produção de IL-4 (Figura 13E) e IL-12 (Figura 13F) são menores, em comparação ao grupo injetado com LPS não letal, após 1 h e maiores após 6h de inflamação. Nestes casos, o tratamento com 5-HEAT

aumentou a produção destas citocinas após 1h do estímulo inflamatório letal, mas não afetou as produções após 6h de injeção com LPS.

Por fim, realizamos um ensaio de sobrevivência, no qual é possível observar que o tratamento com 5-HEAT reduziu a mortalidade dos animais injetados com LPS letal em, aproximadamente 75% (Figura 14).

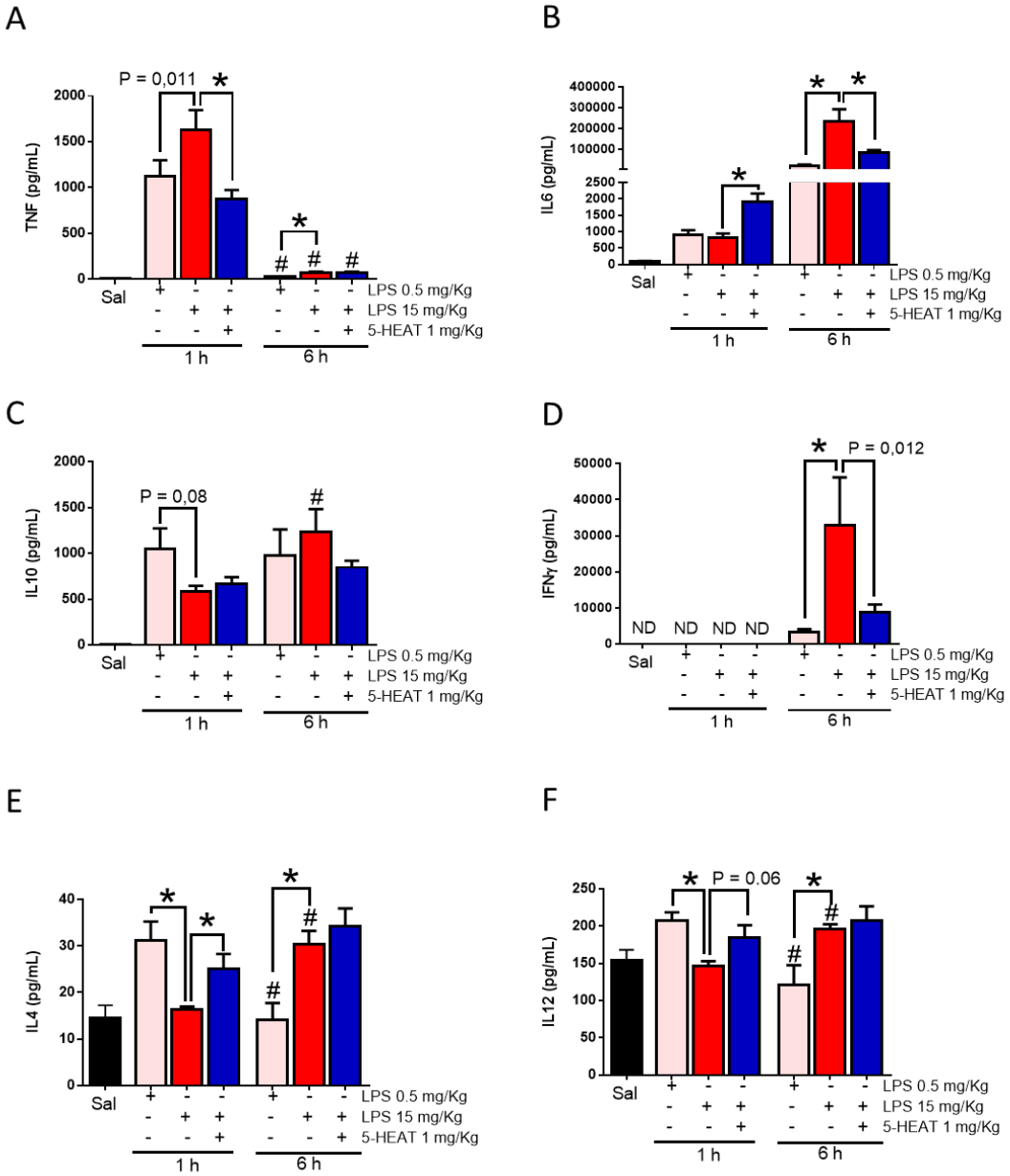

Figura 13. Efeito do 5-HEAT sobre a produção de citocinas no plasma. Animais injetados i.v. com salina (Sal), dose não-letal de LPS (0,5 mg/Kg; barras rosas), dose letal de LPS (15 mg/kg; barras vermelhas) e dose letal de LPS +5-HEAT (1,0 mg/kg; barras azuis) tiveram os níveis plasmáticos de TNF (**A**), IL-6 (**B**), IL-10 (**C**), IFNγ (**D**), IL-4 (**E**) e IL12 (**F**) determinados após 1, ou 6 h de injeção. Dados são apresentados como média ± epm (n = 4-5 animais por grupo). * P < 0,05; # P < 0,05 vs respectivo grupo injetado por 1h.

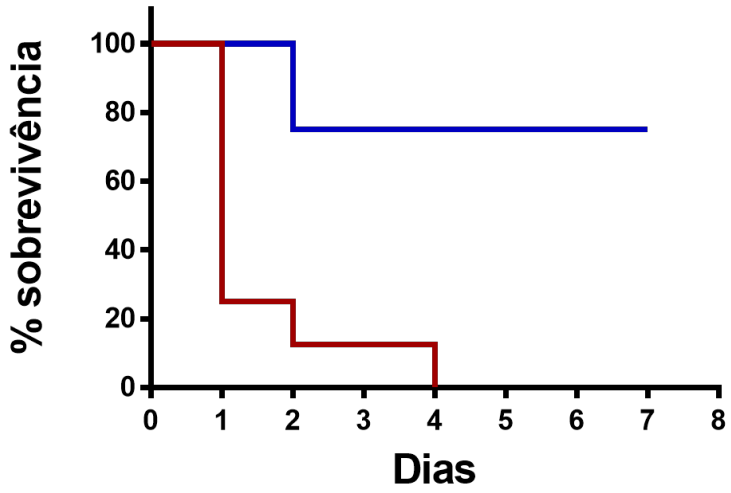

Figura 14. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier. A sobrevivência de animas injetados com dose letal de LPS (15 mg/Kg; linha vermelha) ou dose letal de LPS + 5-HEAT (1,0 mg/Kg; linha azul) foi acompanhada por até 8 dias após a injeção (n = 8 animais por curva).

5. DISCUSSÃO

Respostas imunológicas são compostas por intrincados mecanismos envolvendo múltiplos eixos e cascatas de sinalização que coordenam funcionalmente os variados sistemas fisiológicos nas diferentes fases de respostas de defesa. A regulação geralmente se inicia no microambiente associado à infecção ou lesão tecidual onde, dentre outros eventos, células apresentadoras de antígeno reconhecem sinais de perigo (PAMPs e DAMPs). Além da eliminação de *debris* celulares e patógenos pela fagocitose, estas células secretam uma série de mediadores imunológicos (citocinas, quimiocinas, catecolaminas e melatonina, dentre outros). Atuando de forma autocrina, parácrina e hormonal, tais sinais regulam o padrão de ativação do sistema imunológico localmente, em órgãos linfoides e em estruturas do sistema nervoso central (Antonelli e Kushner, 2017; Iwasaki e Medzhitov, 2015; Fullerton et al., 2016). Devido à complexidade das respostas imunológicas, muito há a ser elucidado sobre os processos fisiopatológicos envolvidos.

Esta dissertação pretende adicionar algumas gotas relacionadas aos papeis do sistema melatonérgico neste mar de conhecimento. Neste sentido, caracterizamos o padrão de ativação do sistema melatonérgico em modelo de endotoxemia letal e não-letal. Além disso, utilizamos duas estratégias de modulação do sistema melatonérgico (eletroacupuntura e tratamento com 5-HEAT, um agonista MT1 e antagonista MT2) no intuito de tentar reverter a letalidade do choque endotóxico. Os resultados obtidos proporcionam um maior entendimento sobre a integração funcional dos componentes do sistema neuroimunoendócrinos e, poderão servir de base para novas estratégias terapêuticas no tratamento de quadros inflamatórios sistêmicos desregulados.

Os mecanismos fisiológicos envolvidos nos choques endotoxêmicos ou sépticos não estão completamente elucidados (revisto por Marshall, 2018). Durante muito tempo se pensou que os efeitos deletérios destas situações eram associados exclusivamente pela situação de “hiperinflamação” característica de uma resposta imune exacerbada que, sem controle, acabaria por levar o indivíduo ao óbito, conforme definido no

Primeiro Consenso Internacional para Sepse e Choque Séptico (Sepsis-1) (Bone et al., 1992), onde a sepse foi definida com uma síndrome de resposta inflamatório sistêmica (SIRS, do inglês *systemic inflammatory response syndrome)*. De fato, assim como encontrado na literatura, nos nossos dados podemos observar o aumento acentuado de citocinas que estão intrinsicamente ligadas à fase inflamatória/celular da resposta imunológica (Conway-Morris et al., 2018). Mais especificamente, observamos o aumento circulante de TNF no sangue 1 hora após estímulo com LPS letal em comparação como o grupo não letal e de INFγ e IL-6 6 horas após o estímulo inflamatório no grupo que recebeu dose letal de LPS.

Tendo em vista a concentração elevada de citocinas pró-inflamatórias durante quadros de choque endotóxico ou séptico, diversas tentativas de coibir a montagem e manutenção da fase pró inflamatória, como a utilização de anticorpos anti-TNF (Abraham et al., 2001), antagonistas para MD2-TLR4 (Opal et al., 2013) e antagonistas para receptores de IL-1 (Opal et al., 1997) foram realizados. Contudo, apesar de promissores em pesquisas iniciais, tais estratégias não obtiveram êxito em estudos multicêntricos com maior número de sujeitos (pesquisa clínica fase III), indicando que outros mediadores das respostas imunológicas estão associados aos danos/mortalidade associados a estes quadros.

Quadros endotóxicos letais não apresentam apenas uma maior produção de mediadores pró-inflamatórias na fase aguda do quadro. Concomitantemente à montagem da resposta inflamatória nos estágios iniciais da endotoxemia, há também uma grande elevação sustentada de mediadores anti-inflamatórios como as citocinas IL-10 (Surbatovic et al., 2015), IL33 (Nascimento et al., 2017) e glicocorticoides (Zhang et al., 2014). Com o decorrer do processo, a produção exacerbada e temporalmente desregulada destes mediadores pode ser intensa o suficiente para suprimir a capacidade imunológica dos indivíduos (revisto por Venet e Monneret, 2018; Munford e Pugin, 2001). Foi observado, por exemplo, que células imunocompetentes coletados de baço e pulmão de pacientes que foram a óbito em decorrência da falência múltipla de órgãos causada pela sepse apresentam um perfil supressor inflamatório, com menor produção de TNF e

INF-γ após estímulo com LPS, quando comparadas a células de pacientes não sépticos (Boomer et al., 2011). Este quadro imunossuprimido intenso, conhecido como paralisia imunológica, pode ser observado mesmo após meses da resolução da sepse (Arens et al., 2016). Altos níveis de IL-10, correlacionam-se com maior gravidade do quadro e mortalidade em indivíduos sépticos (Kellum et al., 2007; Andaluz-Ojeda et al., 2012). Nossos resultados mostram, nas fases inicias do processo, um aumento na produção de IL-10 no grupo que recebeu dose letal de LPS após 2 e 6 horas de estímulo e de corticosterona 1 hora após o estímulo letal em comparação ao grupo não letal. Efeitos similares são observados em outros estudos como, por exemplo, o realizado por Córdoba-Moreno e col. (2018) que avaliou o papel destes mediadores anti-inflamatórios em fases agudas e imunossupressora de camundongos injetados com LPS. Deste modo, basear os estudos que busquem aprofundar o entendimento da fisiopatologia associada com inflamações sistêmicas letais a análises mais amplas das alterações dos diversos moduladores imunológicos pode favorecer o surgimento de propostas terapêuticas mais eficientes.

5.1 Ativação do sistema melatonérgico

Tal como observado na produção de citocinas, no quadro de choque endotóxico letal, a produção de melatonina encontra-se alterada em relação ao observando em uma reação inflamatória não letal. Com base no contexto do Eixo Imune-Pineal (Markus et al., 2018), é esperada a diminuição da produção de melatonina na pineal e consequente diminuição de sua concentração circulante observada no grupo que recebeu dose não letal de LPS (0,5 mg/kg). Este efeito é provavelmente devido à uma associação inibitória entre níveis circulantes de LPS (da Silveira Cruz-machado et el., 2010), TNF (Fernandes et al., 2006) e corticosterona (Fernandes et al., 2017) sobre a glândula pineal. Entretanto, o oposto foi observado no grupo que recebeu dose letal de LPS, quando constatamos o aumento da concentração de melatonina circulante após 1 hora de estímulo com LPS. O observado na circulação não parece estar associado com diferenças na produção pineal de melatonina visto que, de modo similar ao observado com a dose não letal,

tanto a produção de NAS quanto de melatonina estão reduzidas após 1 h de estimulação com LPS letal. Com relação à produção de melatonina pela pineal, é interessante notar que antes da queda de produção, após 30 minutos da injeção com LPS (letal e não letal) há um aumento na produção de melatonina. Este dado poderia ser explicado pela ação dual da corticosterona sobre a produção de melatonina (Fernandes et al., 2017).

Tendo em vista que as alterações na glândula pineal foram similares para ambas as doses de LPS, o aumento observado após 1 hora da injeção letal poderia ser explicado por um aumento na produção extra pineal de melatonina. Neste sentido, como forma de inferir uma possível alteração na produção de melatonina por células imunocompetentes avaliamos a expressão das enzimas de síntese de melatonina em macrófagos e linfócitos T circulantes e do peritônio. Contudo, apesar de aumentos pontuais de AANAT e PAANAT em macrófagos e linfócitos do peritônio, no geral não observamos grandes alterações na via de síntese de melatonina, em especial nas células do sangue. O aumento na produção de melatonina pode ser decorrente de alterações na produção a em células imunocompetentes presentes em outros órgãos e tecidos (Acuña-Castroviejo et al., 2014), ou ainda, por uma menor degradação de melatonina pelo fígado, órgão comumente lesado durante um quadro de sepse (para revisão ver Strnad et al., 2016).

A desregulação na produção de melatonina circulante pode estar associada com uma desregulação imunológica, visto que a melatonina circulante altera a migração de leucócitos circulantes pelo endotélio vascular (Lotufo et al., 2001, Tamura et al., 2010). Durante a sepse e choque séptico, foi observada uma diminuição da capacidade de migração de neutrófilos para o tecido inflamado e que estes são, muitas vezes, ”sequestrados” por diversos órgãos como pulmões e rins, produzindo uma resposta autoimune que pode culminar com sua falência (Brown et al., 2006). De fato, foi observado que a quimiotaxia de neutrófilos possui uma relação inversamente proporcional à letalidade de quadros inflamatórios (Lu et al., 2016). Estes dados levantam a questão se endotélios vasculares associados a diferentes órgãos e tecidos podem apresentar responsividades diferentes à melatonina. Estudos recentes demonstram que a concentração sérica de melatonina está

aumentada em pacientes com sepse ou choque séptico, e que este aumento apresenta correlação positiva com a severidade do quadro (Lorente et al., 2017; El-Mashad et al., 2016). Nestes casos, é possível hipotetizar que este aumento de melatonina seja fruto de produção extra pineal, visto que este efeito foi detectado em amostras de sangue coletadas ao meio dia (Lorente et al., 2017), horário em que a concentração de melatonina circulante fisiologicamente deveria ser mínima.

Como mencionado anteriormente, diversas pesquisas vêm demonstrando o potencial uso da administração de melatonina no tratamento da sepse. An et al., (2016) realizou injeção i.p. de 30mg/kg em ratos que realizaram CLP e verificou que os animais apresentaram menor nível de dano ao miocárdio, mortalidade e de produção de citocinas pró-inflamatórias. A administração de melatonina em modelo de sepse por CLP em ratos levou a menor ativação do inflamossoma, do domínio de ligação ao nucleotídeo e família de repetição rica em leucina, contendo pirina 3 (NLRP3) pela inibição da atividade transcricional do NFκB, diminuindo expressivamente o dano ao tecido cardíaco em comparação aos que não receberam o tratamento com melatonina (Rahim et al., 2017; Garcia et al., 2015). A administração desta indolamina nestes casos, além das funções antioxidantes, tendo um papel mais profundo no retorno do padrão circadiano do relógio biológico celular.

5.2 Modulação do sistema melatonérgico

O sistema melatonérgico deve ser entendido e investigado enquanto um sistema regulador e, para tanto, é importante entender o papel de cada um dos seus componentes nos diferentes contextos imunológicos. Uma vez detectadas diferenças no padrão de ativação do eixo imune-pineal em modelos de endotoxemia letal e não-letal, foram testadas duas estratégias que visaram reestabelecer o padrão observado na situação não letal.

A primeira estratégia utilizada foi a estimulação elétrica periférica no ponto de acupuntura E36, sabidamente regulador de respostas inflamatórias (Meng et al., 2018; Jin et al., 2017; Lim et al., 2016). Contudo, não houve mudança na sobrevivência dos ratos após desafio com LPS letal como o observado em outros estudos envolvendo choque endotóxico ou séptico

(Torres-Rosas et al., 2014; Chen, Y et al., 2016). As diferenças nos resultados foram de certo modo surpreendentes. Não existe um padrão ouro para o uso da neuromodulação através da acupuntura na escolha de pontos e metodologia de estímulo na sepse. Torres-Roas e col. (2014) utilizaram o ponto E36 com estímulo elétrico. Chen Y. e col. (2016) utilizaram o ponto E36 em conjunto com o ponto VG20 e diferentes formas de ondas elétricas para estimulação. Huang e col (2006) utilizaram o ponto E36 com estímulo manual, mecânico. Yang e col. (2016) utilizou eletroacupuntura nos pontos E36 e VC4. Escolhemos o modelo proposto por Torres-Rosas e col. (2014) pois estes padronizaram melhor os parâmetros para realização da eletroacupuntura em função da resposta de citocinas que participam do processo inflamatório.

Uma outra diferença importante que poderia explicar os resultados conflitantes é o horário em que induzimos a endotoxemia letal. Hoje se sabe que diversos hormônios, além da melatonina, possuem uma oscilação com ritmo de 24 horas. Prolactina, hormônio estimulante da tireoide (TSH), insulina e cortisol são alguns exemplos de hormônios que apresentam oscilação diária de sua secreção fisiológica (revisto por Haus, 2007). Este controle é realizado pelo relógio biológico central do sistema nervoso central, o NSQ que, grosso modo, regula a atividade de aferências neuronais e humorais que ajustam o funcionamento do organismo como um todo integrado no tempo. Neste contexto, diversos trabalhos demonstram que o sistema imunológico também apresenta padrões oscilatórios circadianos. Linfócitos T apresentam ritmo circadiano em humanos, com a contagem de linfócitos T CD4+ e CD8+ *naives* apresentando pico durante a noite, correlacionando-se negativamente com a oscilação de cortisol enquanto que linfócitos CD8+ efetoras apresentaram maior a contagem de células durante o dia, correlacionando-se positivamente com o ritmo sérico de epinefrina (Dimitrov et al., 2009). O TLR9, receptor presente em células apresentadoras de antígeno que reconhece DNA bacteriano e viral tem sua expressão e função regulada por genes do relógio, apresentando maior expressão de *TLR9* em macrófagos e linfócitos B de camundongos no período de escuro. Animais que passaram por cirurgia de CLP, modelo de sepse dependente de TLR9, apresentaram quadro séptico mais severo quando o procedimento foi

realizado no período de escuro comparados à animais cuja sepse foi induzida no período de claro (Silver et al., 2012).

Nos trabalhos relacionados com endotoxemia mencionados anteriormente, as injeções com LPS eram sempre realizadas durante o dia enquanto que, na nossa pesquisa, a dose letal de LPS utilizada foi escolhida com base em ensaios de sobrevivência realizados com estímulo em ZT17 (cinco horas após o apagar das luzes). Alguns relatos da literatura apontam que nesta fase do dia há menor mortalidade quando comparada com a mesma dose administrada na fase de repouso dos roedores (revisto por Scheiermann et al., 2013). Esta relação temporal de mortalidade após desafio imune foi primeiramente descrita na década de 1960 por Halberg e col. (1960). Quando a endotoxina foi injetada em ZT 10, a mortalidade foi de 80%, já quando a mesma dose foi injetada em ZT 18, a mortalidade foi de apenas 10%. Marpegan e col. (2009) confirmaram esses achados em camundongos injetados com LPS no ZT 11 (maior mortalidade) e no ZT 19 (menor mortalidade). As doses letais para ratos e camundongos de LPS para ratos e camundongos são similares. Enquanto Torres-Rosas e col (2014) utilizou 5 mg/kg de LPS em camundongos, Song e col. (2012) utilizou 6 mg/kg em ratos. No nosso caso, foi necessária uma dose de 15 mg/Kg de LPS para induzir 100% de letalidade, ou seja, muito maior que a utilizada em outros ensaios de neuromodulação em que o tratamento com EA foram capazes de reverter o quadro. É sabido que a magnitude e duração de respostas inflamatórias induzidas por endotoxemia é dependente da dose utilizada (Vedder et al., 1999). Deste modo, como a dose utilizada em nossa pesquisa foi maior que o dobro das utilizadas em outros estudos, provavelmente o sistema imune dos ratos não foi capaz de resolver seu estado inflamatório/imunossupressivo, levando a óbito mesmo após a eletroestimulação.

Interessantemente, apesar dos animais em ambos os grupos testados (eletroestimulação ponto E36 ou Sham) irem a óbito, o tratamento com EA alterou a amplitude e/ou o perfil temporal de produção das citocinas TNF, IL-10, IL-4, IL-12 em um sentido mais próximo ao que foi observado em animais injetados com doses não letais de LPS. O TNF é uma citocina pró-inflamatória considerada como um marcador de evolução do quadro da sepse

(Kurt et al., 2007) sendo sua redução um importante marcador de eficácia de tratamento. Inclusive, como mencionado anteriormente, no trabalho de Torres-Rosas a frequência a ser utilizada nos tratamentos com EA foi escolhida por apresentar o efeito mais pronunciado sobre a produção de TNF. O tratamento com eletroacupuntura também induziu uma redução na produção de IL-10, de modo que os animais tratados com eletroacupuntura apresentaram níveis séricos compatíveis com os de animais que receberam dose não letal e LPS. Curiosamente, outros trabalhos que avaliaram o efeito da EA em modelo de choque endotóxico mostrou efeito inverso, ou seja, o tratamento diminuiu a produção de IL-10 (Gu et al., 2011). Nestes casos, os autores estimularam, além do ponto E36, o ponto PC6 cuja estimulação aumenta a atividade vagal (Ouyang et al., 2002) e realizaram os tratamentos durante a fase de claro do dia.

Interessante mencionar que na medicina tradicional chinesa (MTC), do qual a acupuntura faz parte, as variações diárias e sazonais dos organismos são aspectos importantes a serem considerados. De forma similar aos conceitos de cronobiologia, a MTC entende que, assim como o ambiente varia com a passagem das horas de um dia, o funcionamento do corpo também varia de forma que um mesmo padrão de desequilíbrio (o que entendemos no ocidente como sintomas e doenças) pode receber diagnósticos e, consequentemente, tratamentos diferentes dependendo da hora do dia ou da estação do ano em que ocorre (Zhang et al., 2016). Deste modo, tanto as abordagens cronobiológicas quanto os fundamentos da MTC convergem no sentido de que efeitos opostos sobre uma determinada variável podem ser decorrentes do horário do dia em que os estímulos foram aplicados.

Assim como observado para as citocinas, a EA do ponto E36 também trouxe os perfis de produção de corticosterona e melatonina para padrões mais próximos aos observados em animais injetados com LPS não letal. Estes dados demonstram claramente que reestabelecer o perfil de produção de melatonina (é de outros mediadores) não é condição suficiente para proteger os animais contra a letalidade do choque endotóxico.

No presente trabalho também avaliamos as variações temporais dos receptores de melatonina MT1 e MT2 em células imunocompetentes durante

processos inflamatórios letais e não letais e de fato, foram encontradas alterações em sua expressão nas células imunocompetentes do peritônio e circulantes, sendo que em alguns casos, a expressão dos receptores apresentou padrões inversos quando comparados os dois grupos. Neste sentido, apesar dos níveis de melatonina no grupo que recebeu tratamento por eletroacupuntura serem similares ao dos animais que receberam dose não letal de LPS, o tratamento não foi capaz de restaurar o padrão temporal de expressão dos receptores MT1 e MT2, indicando que a capacidade de células imunocompetentes (e possivelmente de outras células) em perceber/responder à melatonina continuava diferente da observada em situações não letais.

Os efeitos da melatonina sobre parâmetros imunológicos são dependentes do contextos e modelos que estão sendo analisados. Quando comparado o efeito in vitro da incubação de leucócitos de pacientes saudáveis com os adquiridos de portadores de lúpus eritematoso sistêmico, foi visto que a melatonina apresentou um efeito anti-inflamatório, diminuindo a produção de TNF e IL-1β. Entretanto nas células de portadores de lúpus, que recebiam corticoterapia, um tratamento imunodepressor, a melatonina causou o aumento da produção destas mesmas citocinas, apresentando um efeito pró-inflamatório (Medrano-Campillo et al., 2015). Maestroni e col. (1996) demonstraram que o tratamento com melatonina nas primeiras horas de um choque endotóxico modula a sobrevivência de camundongos de forma bimodal. Enquanto baixas doses de melatonina (1 e 2 mg/Kg) não têm efeito, doses intermediárias (3-5 mg/Kg) aumentam a sobrevivência. Contudo, uma dose de 10 mg/Kg de melatonina deixou de induzir efeito protetor. Effenberger-Neidnicht e col. (2014) observaram em ratos um aumento de TNF após 1 hora e de IFN-γ, IL-1α, IL-1β, IL-6, e IL-10 circulantes após 6 horas de injeção i.v. com LPS (2,5 mg/kg) no grupo que recebeu melatonina (3 mg/kg). Por outro lado, Carrillo-Vico et al. (2005) verificou uma diminuição de TNF no fluido peritoneal e aumento de IL10 circulante em camundongos que receberam 10 mg/kg de melatonina. Já Erbas et al. (2013) observaram a diminuição de TNF circulante em ratos com sepse induzida por CLP após administração de diferentes doses de melatonina.

Estas diferenças observadas nos efeitos da melatonina poderiam ser explicadas por ações diferentes exercidas pelos receptores de melatonina. A detecção de sítios de ligação de alta afinidade a melatonina foi primeiramente realizada na década de 1980 (Dubocovich e Takahashi, 1987; Dubocovich, 1985) e, já nesta época, foram demonstradas diferenças farmacológicas destes receptores (Dubocovich, 1988). Contudo, ainda hoje pouco se sabe sobre os efeitos diferenciais causados pela ativação/inibição destes receptores isoladamente sobre o sistema imunológico. Um dos desafios neste sentido está na inexistência de agonistas/antagonistas seletivos para receptores do tipo MT1 (para revisão ver Jockers et al., 2016), sendo necessária a utilização de modelos que não expressam este receptor. Estudo realizado com linhagem celular derivada de linfócitos T humanos, a deleção do receptor MT1 inibiu a produção de IL-2 por estas células. Utilizando-se modelo animal, foi demonstrado que os efeitos protetores da melatonina sobre a esclerose múltipla são inexistentes em animais knockout para o receptor MT1 (Farez et al., 2015). Estudos que utilizaram o antagonista de MT2 4-fenil-2-proprioaminotetralina (4P-PDOT) também apresentaram resultados que demonstram efeitos específicos deste receptor. O bloqueio de receptores do tipo MT2 inibe o rolamento de leucócitos ao endotélio vascular (Lotufo et al., 2001). Ahmad et al., (2012) verificaram que a proliferação de esplenócitos, utilizada como marcação para aumento da atividade do sistema imune, induzida pela melatonina é inibida por luzindol mas não por 4P-PDOT. De modo similar, Barberino et al. (2017) verificaram que a prevenção de dano a células de ovário por quimioterápicos dada pela melatonina é inibida por luzindol mas não por 4P-PDOT.

Nossos resultados também apontam para efeitos diferenciais dos receptores de melatonina sobre o desenvolvimento de respostas imunológicas induzidas por choque endotóxico uma vez que, quando ativamos o receptor MT1 e bloqueamos o receptor MT2 com 5-HEAT, os ratos que receberam dose letal de LPS apresentaram um padrão na concentração circulante de algumas citocinas similar ao observado em ratos que receberam dose não-letal, ou seja, cujos organismos apresentam uma resposta inflamatória regulada. Mais ainda, diferentemente do observado com o tratamento com EA que também ajustou alguns parâmetros imunológicos

medidos na circulação, o tratamento com 5-HEAT diminuiu a letalidade de 100% para 25%. Em conjunto, estes dados sugerem que que o efeito protetor da melatonina em um quadro de inflação não regulada é dado pela ativação de MT1. Um possível efeito pró-inflamatório do MT2 precisa ser melhor investigado por meio da utilização de fármacos seletivos e/ou em modelos animais que não expressem esse receptor.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De posse destes dados é possível observar que o sistema melatonérgico participa ativamente do controle quadros inflamatórios tanto regulados como não-regulados, com alterações da produção de melatonina pela pineal e, provavelmente, por células imunocompetentes circulantes e residentes.

Tendo em vista que a eletroacupuntura produziu alteração na produção de citocinas, interleucinas e melatonina sem, no entanto, produzir o efeito clínico de resgate do óbito e que o estímulo do receptor MT1 e inibição do MT2 em animais que receberam dose letal de LPS, além de restaurar alguns parâmetros, também resgatou-os do óbito, estudos futuros que visem refinar o entendimento do papel do sistema melatonérgico sobre a regulação do sistema imunológico devem considerar o papel da produção temporal de melatonina em associação com a forma com que células e tecidos responderão ao estímulo ao longo das diferentes fases da resposta imunológica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham E, Laterre PF, Garbino J, Pingleton S, Butler T, Dugernier T, Margolis B, Kudsk K, Zimmerli W, Anderson P, Reynaert M, Lew D, Lesslauer W, Passe S, Cooper P, Burdeska A, Modi M, Leighton A, Salgo M, Van der Auwera P; Lenercept (p55 tumor necrosis factor receptor fusion protein) in severe sepsis and early septic shock: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase III trial with 1,342 patients. Crit Care Med. 2001 Mar;29(3):503-10.

Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Díaz-Casado ME, Lima-Cabello E, López LC, Rosales-Corral S, Tan DX, Reiter RJ. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. Cell Mol Life Sci. 2014 Aug;71(16):2997-3025.

Agil A, Rosado I, Ruiz R, Figueroa A, Zen N, Fernández-Vázquez G. Melatonin improves glucose homeostasis in young Zucker diabetic fatty rats. J Pineal Res. 2012 Mar;52(2):203-10.

Agil A, Reiter RJ, Jiménez-Aranda A, Ibán-Arias R, Navarro-Alarcón M, Marchal JA, Adem A, Fernández-Vázquez G. Melatonin ameliorates low-grade inflammation and oxidative stress in young Zucker diabetic fatty rats. J Pineal Res. 2013 May;54(4):381-8.

Ahmad R, Haldar C, Gupta S. Melatonin membrane receptor type MT1 modulates cell-mediated immunity in the seasonally breeding tropical rodent Funambulus pennanti. Neuroimmunomodulation. 2012;19(1):50-9.

Ahmed TJ, Kaneva MK, Pitzalis C, Cooper D, Perretti M. Resolution of inflammation: examples of peptidergic players and pathways.Drug Discov Today. 2014 Aug; 19(8);1166-71

An R, Zhao L, Xi C, Li H, Shen G, Liu H, Zhang S, Sun L. Melatonin attenuates sepsis-induced cardiac dysfunction via a PI3K/Akt-dependent mechanism. Basic Res Cardiol. 2016 Jan;111(1):8.

Andaluz-Ojeda D, Bobillo F, Iglesias V, Almansa R, Rico L, Gandía F, Resino S, Tamayo E, de Lejarazu RO, Bermejo-Martin JF. A combined score of pro- and anti-inflammatory interleukins improves mortality prediction in severe sepsis. Cytokine. 2012 Mar;57(3):332-6.

Andersson U., Tracey KJ. Neural reflexes in inflammation and immunity J Exp Med. 2012 June 4; 209(6): 1057–1068.

Antonelli M, Kushner I. It's time to redefine inflammation. FASEB J. 2017 May;31(5):1787-1791.

Arens C, Bajwa SA, Koch C, Siegler BH, Schneck E, Hecker A, Weiterer S, Lichtenstern C, Weigand MA, Uhle F. Sepsis-induced long-term immune paralysis--results of a descriptive, explorative study. Crit Care. 2016 Feb 29;20:93.

Ashley TW, Weil ZM, Nelson RJ. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 2012. 43:385–406

Axelrod J, Weissbach H. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. Science. 1960 Apr 29;131(3409):1312.

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

Bagci S, Yildizdas D, Horoz OO, Reinsberg J, Bartmann P, Mueller A. Use of nocturnal melatonin concentration and urinary 6-sulfatoxymelatonin excretion to evaluate melatonin status in children with severe sepsis. Pediatr Endocrinol Metab. 2011;24(11-12):1025-30.

Barberino RS, Menezes VG, Ribeiro AEAS, Palheta RC Jr, Jiang X, Smitz JEJ, Matos MHT. Melatonin protects against cisplatin-induced ovarian damage in mice via the MT1 receptor and antioxidant activity. Biol Reprod. 2017 Jun 1;96(6):1244-1255.

Barbosa-Lima LE. Caracterização dos efeitos moleculares do interferon-gama sobre a produção de melatonina por glândulas pineais de ratos. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Geral). IB-USP, São Paulo. 2015

Bellavance MA, Rivest S. The HPA - Immune Axis and the Immunomodulatory Actions of Glucocorticoids in the Brain. Front Immunol. 2014 Mar 31;5:136.

Bernard JJ, Cowing-Zitron C, Nakatsuji T, Muehleisen B, Muto J, Borkowski AW, Martinez L, Greidinger EL, Yu BD, Gallo RL. Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. Nat Med. 2012 Aug;18(8):1286-90.

Birch SJ, **Felt RL**. Entendendo a acupuntura. **São Paulo**: **Roca**; **2002**.

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest. 1992 Jun;101(6):1644-55.

Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, Bricker TL, Jarman SD 2nd, Kreisel D, Krupnick AS, Srivastava A, Swanson PE, Green JM, Hotchkiss RS. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. JAMA. 2011 Dec 21;306(23):2594-605.

Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. Lancet. 2006 Jul 8;368(9530):157-69.

Bubenik GA, Brown GM. Pinealectomy reduces melatonin levels in the serum but not in the gastrointestinal tract of rats. Biol Signals. 1997 Jan-Feb;6(1):40-4.

Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN, Stockinger B, Tak PP. The resolution of inflammation. Nat Rev Immunol. 2013 Jan;13(1):59-66.

Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. Immunity. 2014 Mar 20;40(3):315-27.

Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. Nat Rev Drug Discov. 2005 Oct;4(10):854-65.

Calvano SE, Coyle SM. Experimental human endotoxemia: a model of the systemic inflammatory response syndrome? Surg Infect (Larchmt). 2012 Oct;13(5):293-9.

Carlson DE, Chiu WC. The absence of circadian cues during recovery from sepsis modifies pituitary-adrenocortical function and impairs survival. Shock. 2008 Jan;29(1):127-32.

Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Naji L, Fernández-Santos JM, Martín-Lacave I, Guerrero JM, Calvo JR. Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. J Pineal Res. 2005 Nov;39(4):400-8.

Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Alvarez-Sánchez N, Rodríguez-Rodríguez A, Guerrero JM. Melatonin: buffering the immune system. Int J Mol Sci. 2013 Apr 22;14(4):8638-83.

Cash JL, Norling LV, Perretti M. Resolution of inflammation: targeting GPCRs that interact with lipids and peptides. Drug Discov Today. 2014 Aug; 19(8) 1186-92.

Cecon E, Oishi A, Jockers R. Melatonin receptors: molecular pharmacology and signalling in the context of system bias. Br J Pharmacol. 2017 Jul 13. doi: 10.1111/bph.13950.

Chen L, Xu A, Yin N, Zhao M, Wang Z, Chen T, Gao Y, Chen Z. Enhancement of immune cytokines and splenic CD4+ T cells by electroacupuncture at ST36 acupoint of SD rats. PLoS One. 2017 Apr 13;12(4):e0175568

Chen SJ, Huang SH, Chen JW, Wang KC, Yang YR, Liu PF, Lin GJ, Sytwu HK. Melatonin enhances interleukin-10 expression and suppresses chemotaxis to inhibit inflammation in situ and reduce the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. Int Immunopharmacol. 2016 Feb;31:169-77.

Chen T, Xiong Y, Long M, Zheng D, Ke H, Xie J, Yin N, Chen Z. Electro-acupuncture Pretreatment at Zusanli (ST36) Acupoint Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Rats by Inhibiting Ca2+ Influx Associated with Cannabinoid CB2 Receptors. Inflammation. 2018 Aug 30. doi: 10.1007/s10753-018-0885-5.

Chen Y, Lei Y, Mo LQ, Li J, Wang MH, Wei JC, Zhou J. Electroacupuncture pretreatment with different waveforms prevents brain injury in rats subjected to cecal ligation and puncture via inhibiting microglial activation, and attenuating inflammation, oxidative stress and apoptosis. Brain Res Bull. 2016 Oct;127:248-259.

Chojnacki C, Wiśniewska-Jarosińska M, Kulig G, Majsterek I, Reiter RJ, Chojnacki J. Evaluation of enterochromaffin cells and melatonin secretion

exponents in ulcerative colitis. World J Gastroenterol. 2013 Jun 21;19(23):3602-7.

Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. Semin Immunopathol. 2017 Jul;39(5):517-528.

Comstock KL, Krown KA, Page MT, Martin D, Ho P, Pedraza M, Castro EN, Nakajima N, Glembotski CC, Quintana PJ, Sabbadini RA. LPS-induced TNF-alpha release from and apoptosis in rat cardiomyocytes: obligatory role for CD14 in mediating the LPS response. J Mol Cell Cardiol. 1998 Dec;30(12):2761-75.

Conway-Morris A, Wilson J, Shankar-Hari M. Immune Activation in Sepsis. Crit Care Clin. 2018 Jan;34(1):29-42.

Córdoba-Moreno MO, Todero MF, Fontanals A, Pineda G, Daniela M, Yokobori N, Ramos MV, Barrientos G, Toblli JE, Isturiz MA, Rearte B. Consequences of the Lack of IL-10 in Different Endotoxin Effects and its Relationship with Glucocorticoids. Shock. 2018 Jul 23. doi: 10.1097/SHK.0000000000001233.

Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015 Jan 5;7(1):a020412

Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. N Engl J Med. 2000 Jul 6;343(1):37-49.

Dimitrov S, Benedict C, Heutling D, Westermann J, Born J, Lange T. Cortisol and epinephrine control opposing circadian rhythms in T cell subsets. Blood. 2009 May 21;113(21):5134-43.

Dubocovich ML. Characterization of a retinal melatonin receptor. J Pharmacol Exp Ther. 1985 Aug;234(2):395-401.

Dubocovich ML, Takahashi JS. Use of 2-[125I]iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Jun;84(11):3916-20.

Dubocovich ML. Pharmacology and function of melatonin receptors. FASEB J. 1988 Sep;2(12):2765-73.

Effenberger-Neidnicht K, Brencher L, Broecker-Preuss M, Hamburger T, Petrat F, de Groot H. Immune stimulation by exogenous melatonin during experimental endotoxemia. Inflammation. 2014 Jun;37(3):738-44.

El-Mashad AR, Elmahdy H, El-Dib M, Elbatch M, Aly H. Can melatonin be used as a marker for neonatal sepsis? J Matern Fetal Neonatal Med. 2016 Sep;29(17):2870-3.

Erbaş O, Ergenoglu AM, Akdemir A, Yeniel AÖ, Taskiran D. Comparison of melatonin and oxytocin in the prevention of critical illness polyneuropathy in rats with experimentally induced sepsis. J Surg Res. 2013 Jul;183(1):313-20.

Erlich SS, Apuzzo ML. The pineal gland: anatomy, physiology, and clinical significance. J Neurosurg. 1985 Sep;63(3):321-41.

Escames G, León J, Macías M, Khaldy H, Acuña-Castroviejo D. Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. FASEB J. 2003 May;17(8):932-4.

Farez MF, Mascanfroni ID, Méndez-Huergo SP, Yeste A, Murugaiyan G, Garo LP, Balbuena Aguirre ME, Patel B, Ysrraelit MC, Zhu C, Kuchroo VK, Rabinovich GA, Quintana FJ, Correale J. Melatonin Contributes to the Seasonality of Multiple Sclerosis Relapses. Cell. 2015 Sep 10;162(6):1338-52.

Fernandes PA, Cecon E, Markus RP, Ferreira ZS. Effect of TNF-alpha on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a 'feedback' of

the immune response on circadian timing. J Pineal Res. 2006 Nov;41(4):344-50.

Fernandes PA, Tamura EK, D'Argenio-Garcia L, Muxel SM, da Silveira Cruz-Machado S, Marçola M, Carvalho-Sousa CE, Cecon E, Ferreira ZS, Markus RP. Dual Effect of Catecholamines and Corticosterone Crosstalk on Pineal Gland Melatonin Synthesis. Neuroendocrinology. 2017;104(2):126-134.

Ferreira ZS, Garcia CR, Spray DC, Markus RP. P2Y(1) receptor activation enhances the rate of rat pinealocyte-induced extracellular acidification via a calcium-dependent mechanism. Pharmacology. 2003 Sep;69(1):33-7.

Fullerton JN, Gilroy DW. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. Nat Rev Drug Discov. 2016 Aug;15(8):551-67.

Funk DJ, Parrillo JE, Kumar A. Sepsis and septic shock: a history. Crit Care Clin. 2009 Jan;25(1):83-101, viii.

Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, Carr BG. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. Crit Care Med. 2013 May;41(5):1167-74

Ganguly S, Gastel JA, Weller JL, Schwartz C, Jaffe H, Namboodiri MA, Coon SL, Hickman AB, Rollag M, Obsil T, Beauverger P, Ferry G, Boutin JA, Klein DC. Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jul 3;98(14):8083-8.

García JA, Volt H, Venegas C, Doerrier C, Escames G, López LC, Acuña-Castroviejo D. Disruption of the NF-κB/NLRP3 connection by melatonin requires retinoid-related orphan receptor-α and blocks the septic response in mice. FASEB J. 2015 Sep;29(9):3863-75.

Goldman BD. Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. J Biol Rhythms. 2001 Aug;16(4):283-301.

Gu G, Zhang Z, Wang G, Han F, Han L, Wang K, Liu J, Li W. Effects of electroacupuncture pretreatment on inflammatory response and acute kidney injury in endotoxaemic rats. J Int Med Res. 2011;39(5):1783-97.

Halberg F, Johnson EA, Brown BW, Bittner JJ. Susceptibility rhythm to E. coli endotoxin and bioassay. Proc Soc Exp Biol Med. 1960 Jan;103:142-4.

Hardeland R, Cardinali DP, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Pandi-Perumal SR. Melatonin--a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. Prog Neurobiol. 2011 Mar;93(3):350-84.

Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. Science. 2002 Feb 8;295(5557):1065-70.

Haslett C, Henson P. Resolution of Inflammation. In: Clark RAF et al., The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair. Boston, Springer, 1988.

Haus E. Chronobiology in the endocrine system. Adv Drug Deliv Rev. 2007 Aug 31;59(9-10):985-1014.

Headland SE, Norling LV. The resolution of inflammation: Principles and challenges. Semin Immunol. 2015 May;27(3):149-60.

Huang CL, Huang CJ, Tsai PS, Yan LP, Xu HZ. Acupuncture stimulation of ST-36 (Zusanli) significantly mitigates acute lung injury in lipopolysaccharide-stimulated rats. Acta Anaesthesiol Scand. 2006 Jul;50(6):722-30.

Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS). Relatório nacional, protocolos gerenciados de sepse. Sepse e choque séptico 2017, Disponível em:

<http://www.ilas.org.br/assets/arquivos/relatorio-nacional/relatorio-nacional-final.pdf>. Acesso em: 20 ago.2018.

Ip WKE, Hoshi N, Shouval DS, Snapper S, Medzhitov R. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. Science. 2017 May 5;356(6337):513-519

Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. Nat Immunol. 2015 Apr;16(4):343-53.

Jin H, Guo J, Liu J, Lyu B, Foreman RD, Yin J, Shi Z, Chen JDZ. Anti-inflammatory effects and mechanisms of vagal nerve stimulation combined with electroacupuncture in a rodent model of TNBS-induced colitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2017 Sep 1;313(3):G192-G202.

Jockers R, Delagrange P, Dubocovich ML, Markus RP, Renault N, Tosini G, Cecon E, Zlotos DP. Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20. Br J Pharmacol. 2016 Sep;173(18):2702-25.

Kabanov DS, Prokhorenko IR. Structural analysis of lipopolysaccharides from Gram-negative bacteria. Biochemistry (Mosc). 2010 Apr;75(4):383-404.

Kadena M, Kumagai Y, Vandenbon A, Matsushima H, Fukamachi H, Maruta N, Kataoka H, Arimoto T, Morisaki H, Funatsu T, Kuwata H. Microarray and gene co-expression analysis reveals that melatonin attenuates immune responses and modulates actin rearrangement in macrophages. Biochem Biophys Res Commun. 2017 Apr 1;485(2):414-420.

Kagan JC, Medzhitov R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. Cell. 2006 Jun 2;125(5):943-55.

Kalsbeek A, Buijs RM. Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. Cell Tissue Res. 2002 Jul;309(1):109-18.

Karasek M, Reiter RJ. Morphofunctional aspects of the mammalian pineal gland. Microsc Res Tech. 1992 Apr 1;21(2):136-57.

Kellum JA, Kong L, Fink MP, Weissfeld LA, Yealy DM, Pinsky MR, Fine J, Krichevsky A, Delude RL, Angus DC Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis: results of the Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Study. Arch Intern Med. 2007 Aug 13-27;167(15):1655-63.

Kim HW, Roh DH, Yoon SY, Kang SY, Kwon YB, Han HJ, Lee HJ, Choi SM, Ryu YH, Beitz AJ, Lee JH. The anti-inflammatory effects of low- and high-frequency electroacupuncture are mediated by peripheral opioids in a mouse air pouch inflammation model. J Altern Complement Med. 2006 Jan-Feb;12(1):39-44.

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 Jan;80(2):599-603.

Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system.Int Rev Immunol. 2011 Feb;30(1):16-34.

Kurt AN, Aygun AD, Godekmerdan A, Kurt A, Dogan Y, Yilmaz E. Serum IL-1beta, IL-6, IL-8, and TNF-alpha levels in early diagnosis and management of neonatal sepsis. Mediators Inflamm. 2007;2007:31397.

Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. J. Am. Chem. Soc., 1958, 80 (10), pp 2587–2587

Levoye A, Dam J, Ayoub MA, Guillaume JL, Couturier C, Delagrange P, Jockers R. The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin

receptor function through heterodimerization. EMBO J. 2006 Jul 12;25(13):3012-23.

Li CX, Liang DD, Xie GH, Cheng BL, Chen QX, Wu SJ, Wang JL, Cho W, Fang XM. Altered melatonin secretion and circadian gene expression with increased proinflammatory cytokine expression in early-stage sepsis patients. Mol Med Rep. 2013 Apr;7(4):1117-22.

Lim HD, Kim MH, Lee CY, Namgung U. Anti-Inflammatory Effects of Acupuncture Stimulation via the Vagus Nerve. PLoS One. 2016 Mar 18;11(3):e0151882.

Liu J, Clough SJ, Hutchinson AJ, Adamah-Biassi EB, Popovska-Gorevski M, Dubocovich ML. MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2016;56:361-83.

Liu V, Escobar GJ, Greene JD, Soule J, Whippy A, Angus DC, Iwashyna TJ. Hospital deaths in patients with sepsis from 2 independent cohorts. JAMA. 2014 Jul 2;312(1):90-2.

Lopes C, deLyra JL, Markus RP, Mariano M. Circadian rhythm in experimental granulomatous inflammation is modulated by melatonin. J Pineal Res. 1997 Sep;23(2):72-8.

Lorente L, Martín MM, Abreu-González P, Pérez-Cejas A, López RO, Ferreres J, Solé-Violán J, Labarta L, Díaz C, Llanos C, Jiménez A. Serum melatonin levels during the first seven days of severe sepsis diagnosis are associated with sepsis severity and mortality. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2017 Nov 30. pii: S0213-005X(17)30324-5.

Lotufo CM, Lopes C, Dubocovich ML, Farsky SH, Markus RP. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. Eur J Pharmacol. 2001 Nov 2;430(2-3):351-7.

Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine. 2008 May;42(2):145-151.

Lu X, Lv C, Qu Y, Luo Y, Lin B, Zhan L, Song Y, Fan Z. Sepsis-induced impairment of neutrophil chemotaxis on a microfluidic chip. Immunol Lett. 2016 May;173:55-60.

Maestroni GJ. Melatonin as a therapeutic agent in experimental endotoxic shock. J Pineal Res. 1996 Mar;20(2):84-9.

Malek H, Ebadzadeh MM, Safabakhsh R, Razavi A, Zaringhalam J. Dynamics of the HPA axis and inflammatory cytokines: Insights from mathematical modeling. Comput Biol Med. 2015 Dec 1;67:1-12.

Manchester LC, Coto-Montes A, Boga JA, Andersen LP, Zhou Z, Galano A, Vriend J, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. J Pineal Res. 2015 Nov;59(4):403-19.

Marçola M, da Silveira Cruz-Machado S, Fernandes PA, Monteiro AW, Markus RP, Tamura EK. Endothelial cell adhesiveness is a function of environmental lighting and melatonin level. J Pineal Res. 2013 Mar;54(2):162-9.

Markus RP, Cecon E, Pires-Lapa MA. Immune-pineal axis: nuclear factor κB (NF-kB) mediates the shift in the melatonin source from pinealocytes to immune competent cells. Int J Mol Sci. 2013 May 24;14(6):10979-97.

Markus RP, Fernandes PA, Kinker GS, da Silveira Cruz-Machado S, Marçola M. Immune-pineal axis - acute inflammatory responses coordinate melatonin synthesis by pinealocytes and phagocytes. Br J Pharmacol. 2018. doi: 10.1111/bph.14083.

Marpegan L, Leone MJ, Katz ME, Sobrero PM, Bekinstein TA, Golombek DA. Diurnal variation in endotoxin-induced mortality in mice: correlation with proinflammatory factors. Chronobiol Int. 2009 Oct;26(7):1430-42.

Marshall JC. Sepsis Definitions: A Work in Progress. Crit Care Clin. 2018 Jan;34(1):1-14.

Martínez A, Knappskog PM, Haavik J. A structural approach into human tryptophan hydroxylase and its implications for the regulation of serotonin biosynthesis. Curr Med Chem. 2001 Jul;8(9):1077-91.

Mazzucchelli C, Pannacci M, Nonno R, Lucini V, Fraschini F, Stankov BM. The melatonin receptor in the human brain: cloning experiments and distribution studies. Brain Res Mol Brain Res. 1996 Jul;39(1-2):117-26.

Mellman I. Dendritic cells: master regulators of the immune response. Cancer Immunol Res. 2013 Sep;1(3):145-9.

Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. Nature. 2008 Jul 24;454(7203):428-35.

Medrano-Campillo P, Sarmiento-Soto H, Álvarez-Sánchez N, Álvarez-Ríos AI, Guerrero JM, Rodríguez-Prieto I, Castillo-Palma MJ, Lardone PJ, Carrillo-Vico A. Evaluation of the immunomodulatory effect of melatonin on the T-cell response in peripheral blood from systemic lupus erythematosus patients. J Pineal Res. 2015 Mar;58(2):219-26.

Meng JB, Jiao YN, Xu XJ, Lai ZZ, Zhang G, Ji CL, Hu MH. Electro-acupuncture attenuates inflammatory responses and intraabdominal pressure in septic patients: A randomized controlled trial. Medicine (Baltimore). 2018 Apr;97(17):e0555.

Messner M, Huether G, Lorf T, Ramadori G, Schwörer H. Presence of melatonin in the human hepatobiliary-gastrointestinal tract. Life Sci. 2001 Jun 22;69(5):543-51.

Mestriner FL, Spiller F, Laure HJ, Souto FO, Tavares-Murta BM, Rosa JC, Basile-Filho A, Ferreira SH, Greene LJ, Cunha FQ. Acute-phase protein alpha-1-acid glycoprotein mediates neutrophil migration failure in sepsis by a nitric oxide-dependent mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Dec 4;104(49):19595-600.

Miller SC, Pandi-Perumal SR, Esquifino AI, Cardinali DP, Maestroni GJ. The role of melatonin in immuno-enhancement: potential application in cancer. Int J Exp Pathol. 2006 Apr;87(2):81-7.

Møller M, Baeres FM. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. Cell Tissue Res. 2002 Jul;309(1):139-50.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu Rev Immunol. 2001;19:683-765.

Mundigler G, Delle-Karth G, Koreny M, Zehetgruber M, Steindl-Munda P, Marktl W, Ferti L, Siostrzonek P. Impaired circadian rhythm of melatonin secretion in sedated critically ill patients with severe sepsis. Crit Care Med. 2002 Mar;30(3):536-40.

Munford RS, Pugin J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. Am J Respir Crit Care Med. 2001 Feb;163(2):316-21.

Muxel SM, Pires-Lapa MA, Monteiro AW, Cecon E, Tamura EK, Floeter-Winter LM, Markus RP. NF-κB 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(12):e52010.

Nardi GM, Scheschowitsch K, Ammar D, de Oliveira SK, Arruda TB, Assreuy J. Neuronal nitric oxide synthase and its interaction with soluble guanylate cyclase is a key factor for the vascular dysfunction of experimental sepsis. Crit Care Med. 2014 Jun;42(6):e391-400.

De Nardo D. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. Cytokine. 2015 Aug;74(2):181-9.

Nascimento DC, Melo PH, Piñeros AR, Ferreira RG, Colón DF, Donate PB, Castanheira FV, Gozzi A, Czaikoski PG, Niedbala W, Borges MC, Zamboni DS, Liew FY, Cunha FQ, Alves-Filho JC. IL-33 contributes to sepsis-induced long-term immunosuppression by expanding the regulatory T cell population. Nat Commun. 2017 Apr 4;8:14919.

Nathan C. Points of control in inflammation. Nature. 2002; 420(6917):846-52.

Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. Nat Rev Immunol. 2006 Mar;6(3):173-82.

Nogueira LM, Sampson JN, Chu LW, Yu K, Andriole G, Church T, Stanczyk FZ, Koshiol J, Hsing AW. Individual variations in serum melatonin levels through time: implications for epidemiologic studies. PLoS One. 2013 Dec 23;8(12):e83208.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Acupuncture: review and analysis of controlled clinical trials. Geneva, Switzerland: Organização Mundial da Saúde; 2003.

Opal SM, Fisher CJ Jr, Dhainaut JF, Vincent JL, Brase R, Lowry SF, Sadoff JC, Slotman GJ, Levy H, Balk RA, Shelly MP, Pribble JP, LaBrecque JF, Lookabaugh J, Donovan H, Dubin H, Baughman R, Norman J, DeMaria E, Matzel K, Abraham E, Seneff M. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind,

placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. Crit Care Med. 1997 Jul;25(7):1115-24.

Opal SM, Laterre PF, Francois B, LaRosa SP, Angus DC, Mira JP, Wittebole X, Dugernier T, Perrotin D, Tidswell M, Jauregui L, Krell K, Pachl J, Takahashi T, Peckelsen C, Cordasco E, Chang CS, Oeyen S, Aikawa N, Maruyama T, Schein R, Kalil AC, Van Nuffelen M, Lynn M, Rossignol DP, Gogate J, Roberts MB, Wheeler JL, Vincent JL; Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. JAMA. 2013 Mar 20;309(11):1154-62.

Ouyang H, Yin J, Wang Z, Pasricha PJ, Chen JD. Electroacupuncture accelerates gastric emptying in associateion with changes in vagal activity. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2002 Feb;282(2):G390-6.

Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. Annu Rev Immunol. 2011;29:71-109.

Perner A, Gordon AC, De Backer D, Dimopoulos G, Russell JA, Lipman J, Jensen JU, Myburgh J, Singer M, Bellomo R, Walsh T. Sepsis: frontiers in diagnosis, resuscitation and antibiotic therapy. Intensive Care Med. 2016 Dec;42(12):1958-1969.

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 Oct;55(3):240-6

Pongratz G, Straub RH. The sympathetic nervous response in inflammation. Arthritis Res Ther. 2014;16(6):504.

Pontes GN, 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. J Pineal Res. 2006 Sep;41(2):136-41.

Pontes GN, Cardoso EC, Carneiro-Sampaio MM, Markus RP. Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF-alpha increase after cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. J Pineal Res. 2007 Nov;43(4):365-71.

Prockop DJ, Oh JY. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. Mol Ther. 2012 Jan;20(1):14-20.

Puig Á, Rancan L, Paredes SD, Carrasco A, Escames G, Vara E, Tresguerres JA. Melatonin decreases the expression of inflammation and apoptosis markers in the lung of a senescence-accelerated mice model. Exp Gerontol. 2016 Mar;75:1-7.

Rahim I, Djerdjouri B, Sayed RK, Fernández-Ortiz M, Fernández-Gil B, Hidalgo-Gutiérrez A, López LC, Escames G, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. Melatonin administration to wild-type mice and nontreated NLRP3 mutant mice share similar inhibition of the inflammatory response during sepsis. J Pineal Res. 2017 Aug;63(1). doi: 10.1111/jpi.12410.

Reiter RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. Mol Cell Endocrinol. 1991 Aug;79(1-3):C153-8.

Remick DG, Ward PA. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. Shock. 2005 Dec;24 Suppl 1:7-11.

Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T, Mahle CD, Kolakowski LF Jr. Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary. FEBS Lett. 1996 May 20;386(2-3):219-24.

Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. Nat Rev Immunol. 2008 Oct;8(10):776-87.

Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. Nat Protoc. 2009;4(1):31-6.

Rietschel ET, Cavaillon JM. Richard Pfeiffer and Alexandre Besredka: creators of the concept of endotoxin and anti-endotoxin. Microbes Infect. 2003 Dec;5(15):1407-14.

Rosas-Ballina M, Tracey KJ. Cholinergic control of inflammation. J Intern Med. 2009 Jun;265(6):663-79.

Rubartelli A, Lotze MT. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. Trends Immunol. 2007 Oct;28(10):429-36.

La Sala A, Ferrari D, Di Virgilio F, Idzko M, Norgauer J, Girolomoni G. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. J Leukoc Biol. 2003 Mar;73(3):339-43.

Sallusto F. Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes. Annu Rev Immunol. 2016 May 20;34:317-34.

Sato M, Sano H, Iwaki D, Kudo K, Konishi M, Takahashi H, Takahashi T, Imaizumi H, Asai Y, Kuroki Y. Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. J Immunol. 2003 Jul 1;171(1):417-25.

Scheiermann C, Kunisaki Y, Frenette PS. Circadian control of the immune system. Nat Rev Immunol. 2013 Mar;13(3):190-8.

Scheschowitsch K, de Moraes JA, Sordi R, Barja-Fidalgo C, Assreuy J. Rapid NOS-1-derived nitric oxide and peroxynitrite formation act as signaling agents

for inducible NOS-2 expression in vascular smooth muscle cells. Pharmacol Res. 2015 Oct;100:73-84.

Schomerus C, Korf HW, Laedtke E, Weller JL, Klein DC. Selective adrenergic/cyclic AMP-dependent switch-off of proteasomal proteolysis alone switches on neural signal transduction: an example from the pineal gland. J Neurochem. 2000 Nov;75(5):2123-32.

Scognamillo-Szabó MV, Bechara GH, Ferreira SH, Cunha FQ. Effect of various acupuncture treatment protocols upon sepsis in Wistar rats. Ann N Y Acad Sci. 2004 Oct;1026:251-6.

Secher T, Vasseur V, Poisson DM, Mitchell JA, Cunha FQ, Alves-Filho JC, Ryffel B. Crucial role of TNF receptors 1 and 2 in the control of polymicrobial sepsis. J Immunol. 2009 Jun 15;182(12):7855-64.

Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, Perretti M, Rossi AG, Wallace JL. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. FASEB J. 2007 Feb;21(2):325-32.

Serhan CN, Chiang N, Dalli J. The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. Semin Immunol. 2015 May;27(3):200-15.

Sewerynek E, Melchiorri D, Reiter RJ, Ortiz GG, Lewinski A. Lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity is inhibited by the antioxidant melatonin. Eur J Pharmacol. 1995 Dec 7;293(4):327-34.

Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS, Angus DC, Rubenfeld GD, Singer M. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. 2016 Feb 23;315(8):775-87.

Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. J Exp Med. 1999 Jun 7;189(11):1777-82.

Shoja MM, Hoepfner LD, Agutter PS, Singh R, Tubbs RS History of the pineal gland Childs Nerv Syst (2016) 32:583–586

Silva CL, Tamura EK, Macedo SM, Cecon E, Bueno-Alves L, Farsky SH, Ferreira ZS, Markus RP. Melatonin inhibits nitric oxide production by microvascular endothelial cells in vivo and in vitro. Br J Pharmacol. 2007 May;151(2):195-205.
Da Silveira Cruz-Machado S, Carvalho-Sousa CE, Tamura EK, Pinato L, Cecon E, Fernandes PA, de Avellar MC, Ferreira ZS, Markus RP. TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFKB pathway. J Pineal Res. 2010 Sep;49(2):183-92.

da Silveira Cruz-Machado S, Carvalho-Sousa CE, Tamura EK, Pinato L, Cecon E, Fernandes PA, de Avellar MC, Ferreira ZS, Markus RP. TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFKB pathway. J Pineal Res. 2010 Sep;49(2):183-92.

Silver AC, Arjona A, Walker WE, Fikrig E. The circadian clock controls toll-like receptor 9-mediated innate and adaptive immunity. Immunity. 2012 Feb 24;36(2):251-61.

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. Pharmacol Rev. 2003 Jun;55(2):325-95.

Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent

JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. 2016 Feb 23;315(8):801-10.

Sônego F, Alves-Filho JC, Cunha FQ. Targeting neutrophils in sepsis. Expert Rev Clin Immunol. 2014 Aug;10(8):1019-28.

Song JG, Li HH, Cao YF, Lv X, Zhang P, Li YS, Zheng YJ, Li Q, Yin PH, Song SL, Wang HY, Wang XR. Electroacupuncture improves survival in rats with lethal endotoxemia via the autonomic nervous system. Anesthesiology. 2012 Feb;116(2):406-14.

Stefulj J, Hörtner M, Ghosh M, Schauenstein K, Rinner I, Wölfler A, Semmler J, Liebmann PM. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. J Pineal Res. 2001 May;30(4):243-7.

Strnad P, Tacke F, Koch A, Trautwein C. Liver - guardian, modifier and target of sepsis. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2017 Jan;14(1):55-66.

Surbatovic M, Popovic N, Vojvodic D, Milosevic I, Acimovic G, Stojicic M, Veljovic M, Jevdjic J, Djordjevic D, Radakovic S. Cytokine profile in severe Gram-positive and Gram-negative abdominal sepsis. Sci Rep. 2015 Jun 16;5:11355.

Tamura EK, Cecon E, Monteiro AW, Silva CL, Markus RP. Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells. J Pineal Res. 2009 Apr;46(3):268-74.

Tamura EK, Fernandes PA, Marçola M, da Silveira Cruz-Machado S, Markus RP. Long-lasting priming of endothelial cells by plasma melatonin levels. PLoS One. 2010 Nov 12;5(11):e13958.

Tilden AR, Becker MA, Amma LL, Arciniega J, McGaw AK. Melatonin production in an aerobic photosynthetic bacterium: an evolutionarily early association with darkness. J Pineal Res. 1997 Mar;22(2):102-6.

Torres-Rosas R, Yehia G, Peña G, Mishra P, del Rocio Thompson-Bonilla M, Moreno-Eutimio MA, Arriaga-Pizano LA, Isibasi A, Ulloa L.Dopamine mediates vagal modulation of the immune system by electroacupuncture. Nat Med. 2014 Mar;20(3):291-5.

Tracey KJ. The inflammatory reflex. Nature. 2002 Dec 19-26;420(6917):853-9.

Tracey KJ. Reflex control of immunity. Nat Rev Immunol. 2009 Jun;9(6):418-28.

Vedder H, Schreiber W, Yassouridis A, Gudewill S, Galanos C, Pollmächer T. Dose-dependence of bacterial lipopolysaccharide (LPS) effects on peak response and time course of the immune-endocrine host response in humans. Inflamm Res. 1999 Feb;48(2):67-74.

Venet F, Monneret G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. Nat Rev Nephrol. 2018 Feb;14(2):121-137.

Xia MZ, Liang YL, Wang H, Chen X, Huang YY, Zhang ZH, Chen YH, Zhang C, Zhao M, Xu DX, Song LH. Melatonin modulates TLR4-mediated inflammatory genes through MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. J Pineal Res. 2012 Nov;53(4):325-34.

Wang DW, Yin YM, Yao YM. Vagal Modulation of the Inflammatory Response in Sepsis. Int Rev Immunol. 2016 Sep 2;35(5):415-433.

Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, Tracey KJ. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. Nature. 2003 Jan 23;421(6921):384-8.

Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. Science. 1990 Sep 21;249(4975):1431-3.

Wu CC, Chiao CW, Hsiao G, Chen A, Yen MH. Melatonin prevents endotoxin-induced circulatory failure in rats. J Pineal Res. 2001 Apr;30(3):147-56.

Wu JY, Tsou MY, Chen TH, Chen SJ, Tsao CM, Wu CC. Therapeutic effects of melatonin on peritonitis-induced septic shock with multiple organ dysfunction syndrome in rats. J Pineal Res. 2008 Aug;45(1):106-16.

Yang G, Hu RY, Deng AJ, Huang Y, Li J. Effects of Electro-Acupuncture at Zusanli, Guanyuan for Sepsis Patients and Its Mechanism through Immune Regulation. Chin J Integr Med. 2016 Mar;22(3):219-24.

Xia MZ, Liang YL, Wang H, Chen X, Huang YY, Zhang ZH, Chen YH, Zhang C, Zhao M, Xu DX, Song LH. Melatonin modulates TLR4-mediated inflammatory genes through MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. J Pineal Res. 2012 Nov;53(4):325-34.

Zhang G, Meredith TC, Kahne D. On the essentiality of lipopolysaccharide to Gram-negative bacteria. Curr Opin Microbiol. 2013 Dec;16(6):779-85.

Zhang Q, Dong G, Zhao X, Wang M, Li CS. Prognostic significance of hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormones in early sepsis: a study performed in the emergency department. Intensive Care Med. 2014 Oct;40(10):1499-508.

Zhang T, Yan L, Ma S, He J. Human biological rhythm in traditional Chinese medicine. J. Tradit. Chin. Med. Sci. 2016 Feb; 3(4):206-211

Zielen S, Trischler J, Schubert R. Lipopolysaccharide challenge: immunological effects and safety in humans. Expert Rev Clin Immunol. 2015 Mar;11(3):409-18.

Zlotos DP, Jockers R, Cecon E, Rivara S, Witt-Enderby PA. MT1 and MT2 melatonin receptors: ligands, models, oligomers, and therapeutic potential. J Med Chem. 2014 Apr 24;57(8):3161-85.

8. ANEXOS

USP Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

www.ib.usp.br

Of. CEUA/IB/037/2014
Processo nº 2014.1.897.41.3

São Paulo, 17 de dezembro 2014

Prezado Senhor,

Dirijo-me a V.Sa. para informar que a Comissão de Ética no Uso de Animais do IB (CEUA), em reunião realizada no dia 16 de dezembro de 2014, **APROVOU** o Projeto "Estudo comparativo entre o padrão de ativação do eixo imune-pineal durante processos inflamatórios sistêmicos agudos letais e não letais" - **Protocolo 207/2014**, de sua responsabilidade (Colaboradores: Vanderlei Amadeu da Rocha, Raymond Sehiji Takiguchi, Renato Kayk G. de Almeida).

O pesquisador responsável deverá comunicar a esta Comissão qualquer alteração e/ou intercorrência que houver durante a realização da pesquisa.

Lembramos que deverão ser apresentados os relatórios anuais ou final, conforme modelo disponível no link desta Comissão.

Atenciosamente,

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

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. PEDRO AUGUSTO CARLOS MAGNO FERNANDES

Departamento de Fisiologia - IB