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 fisio, 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!

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 do 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 mielóide 88
CD14	Grupamento de diferenciação 14
CD4	Grupamento de diferenciação 4

CD8	Grupamento de diferenciação 8
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
ILAS	Instituto Latinoamericano de Sepsis
RPMI	Instituto memorial Roswell Park
IL-1	Interleucina 1
IL-1 α	Interleucina 1 alfa
IL-1 β	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 differentiation*) (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- κ B), permitindo a transcrição de diversas citocinas reguladoras do processo inflamatório com o TNF (fator de necrose tumoral), interleucina 1 beta (IL-1 β) e interferons do tipo I (Lu et al. 2008). Em células dendríticas, a ativação do TLR4 faz com estas se madurem 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 INF γ (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 E₂ (PGE₂) 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 dendríticas 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-1 β 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-1 β além de inibir o influxo de íons de cálcio pela inativação de sinalização por TLR4/NF- κ B (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 Glândula 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 *pineae*, pinha em latim, nome esse mantido até os dias atuais (Erllich 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 proteossomas (Ganguly et al., 2001). Em roedores, o estímulo 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 hidroxindol-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, conseqüentemente, 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 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 papéis 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 G α i/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 encontrado nos NSQs, tálamo, cerebelo e outros (Mazzucchelli *et al.*, 1996), na retina, aorta, glândula parótida, rins, adipócitos, células imunocompetentes e muitas outras (Hardeland *et 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-1 β), 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-1 β , 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 constatado 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 iniciais 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, conseqüentemente, 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) demonstraram que a glândula pineal possui o receptor TLR4 e quando incubada com LPS apresenta ativação de subunidades inibitórias da via do NF- κ B, 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 plaquetas e células do endotélio, do inglês *platelet endothelial 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 intrinsecamente 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- κ B 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- γ 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, IL1 β , IL6, IL-8 e IL-10 em leucócitos, além de atenuar a regulação positiva de ciclooxigenase-2 (COX-2) e de óxido 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 hígidez quanto de perigo.

1.2.5 Seps 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 seps 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 seps 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 trabalho 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 da atividade dos receptores de melatonina Mt1 e MT2 será capaz de mortalidade induzida por choque endotóxico letal.

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, Smits 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. Electroacupuncture 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- α 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, Ysraelit 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- κ B/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

Levoe A, Dam J, Ayoub MA, Guillaume JL, Couturier C, Delagrang 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 κ B (NF- κ B) 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. Electroacupuncture 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- κ B drives the synthesis of melatonin in RAW 264.7 macrophages by inducing the transcription of the arylalkylamine-N-acetyltransferase (AA-NAT) gene. *PLoS One.* 2012;7(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, Pacht 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 association 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, Hörtnner 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

OF CEUA/IB/037/2014
Processo nº 2014.1.897.41.3

www.ib.usp.br

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,

Prof. 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