

Débora dos Santos Silva

**Efeitos da corticosterona sobre a produção de
melatonina em macrófagos de linhagem RAW 264.7**

São Paulo

2017

Débora dos Santos Silva

**Efeitos da corticosterona sobre a produção de
melatonina em macrófagos de linhagem RAW**

264.7


**Effects of corticosterone on the production of
Melatonin RAW macrophage lineage**

264.7

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

Orientador: Prof. Dr. Pedro Augusto Carlos Magno Fernandes

São Paulo
2017



dos Santos Silva, Débora

Efeitos da corticosterona sobre a produção de melatonina em macrófagos de linhagem RAW 264.7 / Débora dos Santos Silva; orientador Pedro Augusto Carlos Magno Fernandes. -- São Paulo, 2017.

85 f.

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

1. Melatonina. 2. Corticosterona. 3. Zimosan. 4. Receptores de glicocorticoides. 5. Macrófagos. I. Carlos Magno Fernandes, Pedro Augusto, orient. II. Título.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Orientador(a)

À minha família e amigos,

Uso a palavra para compor meus silêncios.

Não gosto das palavras

fatigadas de informar.

Dou mais respeito

às que vivem de barriga no chão

tipo água pedra sapo.

Entendo bem o sotaque das águas.

Dou respeito às coisas desimportantes

e aos seres desimportantes.

Prezo insetos mais que aviões.

Prezo a velocidade

das tartarugas mais que a dos mísseis.

Tenho em mim esse atraso de nascença.

Eu fui aparelhado

para gostar de passarinhos.

Tenho abundância de ser feliz por isso.

Meu quintal é maior do que o mundo.

Sou um apanhador de desperdícios:

Amo os restos

como as boas moças.

Queria que a minha voz tivesse um formato de canto.

Porque eu não sou da informática:

eu sou da invencionática.

Só uso a palavra para compor meus silêncios.

Manoel de Barros

(Memórias inventadas – As Infâncias de Manoel de Barros, p. 47- Planeta do Brasil, São Paulo, 2010)

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, pelas oportunidades que tem me dado, por me dar forças para seguir meus sonhos, mesmo que às vezes eles tenham parecido impossíveis. Obrigada Deus!

Agradeço aos meus pais por ser a mulher que sou hoje, com erros e acertos, me fizeram uma pessoa melhor, me ensinaram dentre muitas coisas, a ter caráter, honestidade, humildade e o valor do trabalho. Tenho certeza que me amam e que me apoiam mesmo de longe, mesmo sem compreender muito bem o que faço. Ao meu irmão Marcelo, pelo apoio, por ser meu filho e pai quando precisamos, por ter me ajudado nessa caminhada. Espero um dia poder retribuí-lo. Mais grata ainda sou, por ter o sobrinho mais lindo e amor da minha vida, Leozinho. A tia te ama muito! Minha prima Ana Paula que mesmo de longe sempre esteve presente e me ajudou em vários momentos. Minha família é o motivo pelo qual acordo todos os dias para buscar algo melhor não só para mim, mas para eles. Amo vocês!

Agradeço ao meu melhor amigo, noivo, amor, companheiro e grande homem, Ronaldo Luiz, pela paciência, companheirismo, cumplicidade, compreensão, ensinamentos, respeito, amor, carinho por toda ajuda a mim dedicada durante todos os anos juntos. Te amo!

Quando vou falar de amigos, colegas e conhecidos, quem me conhece irá dizer, que lá vem textão porque eu conheço “toda a USP”. Mas vamos lá, quero agradecer meus amigos de Mato Grosso do Sul, aos amigos de São Paulo, minha nova morada, entre os quais Pércia pelas conversas na madrugada, feijoada mineira e parceria na monitoria. Aos meus amigos corredores Camila e Daniel. Camila pela parceria nas corridas, desabafos e cervejinhas pós-treino. Daniel que me acompanhava no desaquecimento, porque correndo, nem em sonho o alcanço, por me aguentar falando de desenhos, quadrinhos e Star Wars, aliás, vamos ouvir falar muito de Daniel, melhor desenhista que conheço. Ao Jeffrey pelas cervejas da

Guatemala e Tamal, pela parceria nas festas juninas e na procura da melhor coxinha de São Paulo. Jeffrey é a única pessoa que conheço que faz um intercâmbio dentro do intercâmbio. Sei que vai acabar ficando no Brasil.

Agradeço aos meus colegas e amigos do departamento de fisiologia, alguns estão em outros caminhos como a Mariana Góes e o Leo Crisóstomo, que guardo sempre no coração. Aos que posso abraçar e com eles rir muito, Daniel Giura, Bruna, Renata, Camila, Jessyca, Faride, Elisa, Chucho e Juan. Com todos vocês eu tenho boas histórias para recordar.

Aos funcionários da secretária da fisiologia e de pós-graduação Roseli, Catherine, Lilian, Érika e Gilmar pelo auxílio prestado e prontidão.

A todos os professores do departamento ou do IB que de alguma forma contribuíram com a minha vida acadêmica, entre os quais Zulma, Fernando, Cida, Zé Gui, Renata, Daniela, Maria Elice, Rosana, Débora e Lucile.

Agradeço muitíssimo a duas pessoas que me ajudaram durante esses anos, aos meus amigos Neuroimunoendócrinoloucos Gabi Kinker e Ray. Vocês foram fundamentais para a realização desse trabalho. Gabi você foi demais! Agradeço pelos bolos maravilhosos de aniversário e caroninhas marotas. Ao Ray, também agradeço pelas sementinhas poderosas e abraços apertados. Aos dois e a Luiza (Luly), agradeço pelos almoços terapêuticos e astrológicos.

Agradeço aos amigos e colegas de laboratório, aos que estão e aos que seguiram outros caminhos, Renato, Lívia, Marina Sena, Priscilla, Leila, Leandro, Sanseray, Vanderley, Aldeidia, Letícia, Michelle, Ewerton, Marco, Eliana, em especial agradeço ao Renatão e ao Marco que me auxiliaram no início dessa jornada.

Agradeço aos técnicos, Eduardo Braga, Débora Moura e Sandra Muxel por todo auxílio prestado.

Agradeço a professora Regina Markus por todo apoio e contribuições no desenvolvimento desse projeto e pelo carinho que ela sempre teve comigo.

Em especial, agradeço ao meu amigo e orientador, professor Pedro Augusto Carlos Magno Fernandes. Talvez apenas nessas linhas eu não consiga expressar toda minha gratidão, mas quero que saiba o quanto você foi e é importante para mim no decorrer desses anos. Agradeço por todo apoio como orientador deste projeto e por ser mais que um orientador, ser amigo, por confiar em mim, em um momento que nem eu mais confiava. Você sabe o quanto isso foi importante. Obrigada por me ouvir quando precisei, por me entender, pelos puxões de orelhas necessários, por ser tão generoso e ter esse coração enorme.

Agradeço pelo apoio financeiro das agências Cnpq, Capes e Fapesp, sem o qual este trabalho não teria sido realizado.

ÍNDICE

1. Introdução.....	16
1.1 Melatonina	16
1.2 Eixo Imune Pineal	20
1.3 Glicocorticoides e produção de melatonina	22
1.4 Macrófagos, glicocorticoides e melatonina.....	25
2. Objetivos.....	28
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos específicos	28
3. Materiais e métodos.....	29
3.1 Cultura celular	29
3.2 Protocolos experimentais.....	29
3.2.1 <i>Protocolos de incubação para determinar a produção de melatonina em células em cultura.....</i>	<i>29</i>
3.2.2 <i>Protocolos para determinação dos efeitos da corticosterona, zimosan e corticosterona mais zimosan sobre a expressão das enzimas da via de biossíntese da melatonina</i>	<i>30</i>
3.2.3 <i>Protocolos para determinação dos efeitos dos antagonistas de GR e MR sobre a expressão das enzimas da via de biossíntese da melatonina.....</i>	<i>30</i>
3.2.4 <i>Protocolos para determinação dos efeitos da corticosterona, zimosan e RU486 sobre a translocação nuclear de NFkB</i>	<i>31</i>
3.2.5 <i>Protocolos para determinação dos efeitos da corticosterona sobre a fagocitose</i>	<i>31</i>
3.3 Métodos de análises experimental.....	32
3.3.1 <i>Dosagem de melatonina.....</i>	<i>32</i>
3.3.2 <i>Imunocitoquímica</i>	<i>32</i>
3.3.3 <i>Translocação de NFkB</i>	<i>33</i>
3.3.4 <i>fagocitose</i>	<i>34</i>
3.4 Análises estatísticas	35
4. Resultados	36
4.1 Dosagens de melatonina em macrófagos RAW 264.7.....	36

4.2 Análises das enzimas envolvidas na via de biossíntese de melatonina e células estimuladas com corticosterona.....	38
4.3 Papel dos receptores de glicocorticoides no efeito da corticosterona sobre as enzimas da via biossintética da melatonina.....	42
4.4 Efeito da corticosterona sobre a expressão das enzimas envolvidas na via de biossíntese de melatonina em células estimuladas com zimosan.....	46
4.5 Efeitos da corticosterona sobre a fagocitose em células RAW 264.7.....	50
4.6 Papel dos receptores de glicocorticoides no efeito da corticosterona sobre a modulação da expressão das enzimas da via biossintética da melatonina induzida por zimosan.....	52
4.7 Bloqueio de receptores de mineralocorticoides (MR) por Spirolactone (Spiro) em células estimuladas com corticosterona e zimosan	56
4.8 Papel dos receptores de glicocorticoides no efeito da corticosterona mais zimosan sobre a expressão de NFκB total e nuclear	60
5. Discussão	63
6. Conclusões.....	71
7. Referências bibliográficas	72

Lista de Abreviaturas e siglas

5-HTP	5-hidroxitriptofano
5-HT	serotonina
AANAT	arilalquilamina N-acetiltransferase
ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
AMP	adenosina monofosfato
AMPc	monofosfato cíclico de adenosina
ASMT	N-acetylserotonina-O-metiltransferase
ATP	adenosina trifosfato
CBP	CREB binding protein
CORT	corticosterona
CRE	elementos responsivos a AMPc
CREB	cyclic AMP response element binding
CRH	hormônio corticotrófico
DAMPs	padrões moleculares associados a perigo
DNA	ácido desoxirribonucleico
EIP	eixo imune pineal
epm	erro padrão da média
GPCRs	receptores acoplados à proteína G
GR	receptores para glicocorticoides
GRE	regiões responsivas a glicocorticoides
Gs	proteína G estimulatória

HHA	eixo hipotálamo – hipófise – adrenal
HIOMT	hidroxi-indol-O-metiltransferase
HPA	eixo hipotálamo – pituitária – adrenal
hsp	heat shock proteins
IgG	imunoglobulina G
IκB	proteína inibitória κB
IFN-α	interferon α
IFN-γ	interferon γ
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
LBD	ligand binding domain
LPS	lipopolissacarídeo de bactérias Gram-negativas
MEL	melatonina
mL	mililitro
MR	receptores de mineralocorticoides
MT1	receptor de melatonina do subtipo 1
MT2	receptor de melatonina do subtipo 2
NAd	noradrenalina
NAS	N-acetilserotonina
NFκB	fator nuclear Kappa B

NK	natural killer
nM	nanomolar
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos
PBS	salina tamponada com fosfato
PKA	proteína quinase dependente de AMP cíclico
PMA	acetato miristato de forbol
PVN	núcleo paraventricular do hipotálamo
RNA	ácido ribonucleico
RU 486	mifepristone
Spiro/Sp	Spirolactone
STAT	signal transducer and activator of transcription
TAD	domínio de ativação de transcrição
TNF	fator de necrose tumoral
TPH1	triptofano hidroxilase 1
TLR	receptor do tipo Toll 2
TLR	receptor do tipo Toll 4
TLR	receptor do tipo Toll 6
zy	zimosan
µg	micrograma
µM	micromolar

Resumo

A melatonina (MEL) é um hormônio que participa do controle de uma série de processos fisiológicos em situações de vigília e durante processos de defesa. Além da produção noturna pela glândula pineal, células do sistema imunológico também produzem MEL. Diversos estudos demonstram que a produção de MEL pela pineal e células imunes é controlada por agentes endógenos (TNF, catecolaminas) e exógenos (LPS, zimosan) que ativam/controlam o desenvolvimento de processos de defesa. Em macrófagos, a produção de MEL induzida por zimosan, por exemplo, aumenta a fagocitose destas células. Na glândula pineal, glicocorticoides podem tanto potencializar quanto reduzir a síntese de MEL dependendo do padrão de estimulação adrenérgica imposto sobre a glândula. Contudo, não existem relatos sobre os efeitos dos glicocorticoides sobre a produção de MEL por células imunocompetentes. Tendo em vista a importância da produção de MEL no funcionamento adequado de macrófagos, o presente estudo investigou os efeitos da corticosterona (CORT) sobre a produção de MEL induzida por diferentes estímulos em macrófagos da linhagem RAW 264.7. Constatamos que os efeitos induzidos pela CORT sobre a produção de MEL dependem do contexto aos quais essas células foram submetidas. Tanto CORT quanto zimosan aumentam a produção de MEL. Todavia, quando as células são pré-incubadas com CORT, a produção de MEL induzida pelo zimosan é inibida. Em ambos os casos, os efeitos da CORT parecem ser dependentes da ativação dos receptores de glicocorticoides (GR). Com relação à produção de MEL induzida por zimosan, o efeito dos GRs está associado com a inibição da via do NF κ B. Este trabalho pode ser relevante para a compreensão dos efeitos da CORT sobre o funcionamento das células imunes em condições de estresse crônico, uso excessivo de corticoides e diante de desafios imunológicos.

Palavras-chave: Melatonina; Corticosterona; Zimosan; Receptores de glicocorticoides; Macrófagos.

ABSTRACT

Melatonin (MEL) is a hormone that participates in the control of a series of physiological processes in healthiness situations and during defense processes. In addition to the nocturnal production by the pineal gland, cells of the immune system also produce MEL. Several studies have shown that the production of MEL by pineal and immune cells is controlled by endogenous (TNF, catecholamines) and exogenous (LPS, zymosan) agents that activate / control the development of defense processes. In macrophages, the production of MEL induced by zymosan, for example, increases the phagocytosis of these cells. In the pineal gland, glucocorticoids may both potentiate and reduce MEL synthesis depending on the adrenergic stimulation pattern imposed on the gland, however there are no reports on the effect of glucocorticoids on the production of MEL by immunocompetent cells. The present study investigated the effects of corticosterone (CORT) on the production of MEL induced by different stimuli in RAW 264.7 macrophages. We found that the effects induced by CORT on the production of MEL depend on the context to which these cells were submitted. Both CORT and zymosan increase MEL production, however, when cells are preincubated with CORT, the production of MEL induced by zymosan is inhibited. In both cases, the effects of CORT appear to be dependent on the activation of glucocorticoid receptors (GR). With respect to zymosan induced MEL production, the effect of GRs is associated with the inhibition of the NF κ B pathway. This work might support the understanding of the effects of CORT on the functioning of immune cells under conditions of chronic stress, excessive use of corticosteroids and immunological challenges.

Keywords: Melatonin; Corticosterone; Zymosan; Glucocorticoid receptors; Macrophages.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Melatonina

A melatonina (MEL) é um hormônio produzido e secretado pela glândula pineal. É parte do sistema neuroendócrino responsável pela organização temporal de diversos processos fisiológicos e comportamentais. A produção circadiana deste hormônio é fundamental para a adaptação dos indivíduos às variações temporais cíclicas do meio ambiente, estando associada, por exemplo, à regulação do ciclo sono-vigília, ciclos reprodutivos (Soares *et al.*, 2003; Morris *et al.*, 2012; Fisher *et al.*, 2013; Maitra & Hasan, 2016) e ao controle do funcionamento do sistemas cardiovascular e imunológico (Macchi *et al.*, 2004; Markus *et al.*, 2007).

A glândula pineal sempre foi alvo de curiosidades e investigações. Relatos históricos, datados de 300 a.C., mostram as primeiras tentativas de descrevê-la pelos médicos anatomistas, Herófilo e Erasístrato. Eles achavam que a glândula era uma válvula que regularia o fluxo dos *spiritus* ou *pneuma*, por meio de ventrículos encefálicos. Entre 130-200 A.C, o médico e filósofo grego Cláudio Galeno, contrariado com essa descrição, verificou que a glândula não estava no sistema ventricular, sugerindo com seus estudos que poderia ser uma glândula linfática. Galeno também foi responsável pela nomenclatura da glândula, batizando-a de glândula pineal, devido ao seu formato de pinha (para revisão, Crespo & Viegas, 1991).

O matemático e filósofo francês René Descartes no século 17, em um de seus tratados afirmou que “há uma pequena glândula no cérebro, na qual a alma exerce suas funções mais particularmente do que nas outras partes” (Descartes, 1973). Descartes acreditava que a glândula pineal seria capaz de captar o espírito do animal e controlar diversas funções como

movimento, sensações, memória e imaginação. Em 1958, Aaron Lerner conseguiu isolar de pineais de bovinos um fator que agregava melanóforo, no caso, a MEL. Lerner acreditava que era um hormônio produzido exclusivamente pela pineal e era sintetizado a partir da serotonina (Lerner *et al.*, 1959). Em 1961, Axelrod & Weissbach evidenciaram que a pineal era o único órgão a produzir MEL a partir da serotonina, sendo produzida de forma rítmica, dependente da iluminação diurna e noturna. Atualmente, sabemos que novas fontes de melatonina foram descritas no decorrer dos anos, como vamos discorrer posteriormente.

Hoje, sabemos que a síntese de melatonina pela pineal ocorre na fase de escuro e é dependente da ativação do sistema nervoso autônomo simpático e consequente liberação de noradrenalina (NAd) pelos terminais que inervam esta glândula (Fálcón, 1999). Na pineal, a NAd, interagindo com os receptores adrenérgicos pós-sinápticos dos tipos β_1 e α_1 -adrenérgicos presentes nos pinealócitos, desencadeia uma série de eventos bioquímicos intracelulares que levam à síntese de melatonina (Klein, 1985). Neste processo, o triptofano capturado da circulação é convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) sob a ação da enzima triptofano hidroxilase 1 (TPH1) (Lovenberg *et al.*, 1967). O 5-HTP será descarboxilado por meio da enzima 5-HTP descarboxilase, dando origem a serotonina (5-HT) (Snyder & Axelrod, 1964). A serotonina, por sua vez, é acetilada pela ação da enzima araquilamina-N-acetiltransferase (AANAT), originando a N-acetilserotonina (NAS) (Voisin *et al.*, 1984) que será, posteriormente, metilada pela enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT), também chamada de N-acetylserotonina-O-metiltransferase (ASMT), formando a melatonina (Ribelayga & Simonneaux, 2003).

Além da glândula pineal, existem outras fontes extra pineais de síntese de MEL descritas na literatura. A retina, por exemplo, é um importante local de produção de MEL, como descrito em 1971 por Cardinali & Rosner, que identificaram a presença da enzima HIOMT na retina de ratos. Posteriormente em 1974, Bubenik e seus colaboradores relataram

pela primeira vez, a presença do ritmo diário de melatonina por meio de cortes histológicos da retina de ratos com dois dias de idade, onde se observou que o ritmo de MEL aumentou nos tecidos conforme o crescimento desses animais.

A importância neuromoduladora da MEL na retina é bem conhecida, estando associada ao processamento das informações ambientais pelos neurônios retiniais. MEL regula na parte mais externa da retina a atividade de fotorreceptores e internamente potencializa *inputs* de células amácrinas glicinérgicas para células gânglionares em ratos (Huang *et al.*, 2012). Estas ações da MEL sobre os neurônios da retina são mediados por sinalizações intracelulares distintas e por diferentes subtipos de receptores de MEL, sendo importantes para a percepção da iluminação do ambiente (Huang *et al.*, 2012).

Em 1975, após a descoberta de MEL na retina, Raikhlin e colaboradores, observaram que havia síntese de MEL em células enterocromafins da mucosa do intestino de ratos, e puderam estimar que o conteúdo de MEL produzida no trato gastrointestinal era cerca de 400 vezes maior do que na pineal e cerca de 10 a 100 vezes maior do que as concentrações plasmáticas (Raikhlin *et al.*, 1975). Alguns estudos observaram que a MEL produzida não dependia do ritmo diário, ao contrário do que já havia sido visto na retina, essa produção não era rítmica e sim, controlada pela ingestão de alimentos. Além disso, sabendo-se que a maioria dos alimentos possuem MEL, boa parte encontrada no trato gastrointestinal poderia ser proveniente da alimentação (Raikhlin *et al.*, 1976; Bubenik *et al.*, 1978, Bubenik, 1980) tendo função antioxidante, reduzindo a secreção de ácido clorídrico, promovendo a regeneração epitelial e aumento da microcirculação (Bubenik, 2002, 2008). A partir desses estudos as funções da melatonina no trato gastrointestinal vêm sendo muito discutidas, vários grupos vêm abordando as propriedades anti-oxidantes e citoprotetora da melatonina (Konturek *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2011; Bertrand *et al.*, 2014).

Além da retina e do trato gastrointestinal, muitos estudos têm observado a produção de MEL em importantes órgãos e células do sistema imunológico, dentre eles o timo, o baço, linfócitos, mastócitos, leucócitos, plaquetas e células endoteliais (Kvetnoy, 1999). No timo a MEL exerce efeitos protetores sobre os timócitos de ratos, modulando processos de apoptose, proliferação celular e como antioxidante (Gomez-Corvera *et al.*, 2009; Sanchez-Hidalgo *et al.*, 2009; Sokolovic *et al.*, 2013). Em linfócitos humano, a MEL desempenha papel crucial na modulação do sistema de receptores IL-2/IL2R, sendo essa interleucina fundamental na maturação de linfócitos (Carrilo-Vico *et al.*, 2004). Nos mastócitos, a MEL tem efeito protetor contra citotoxicidade (Maldonado *et al.*, 2013) e no tecido endotelial a melatonina atua na redução do rolamento e adesão de neutrófilos, tendo assim, um possível efeito regulatório sobre a montagem de respostas inflamatórias (Tamura *et al.*, 2010).

Em macrófagos peritoneais a produção de serotonina e MEL foi identificada por Martins e colaboradores em 2004, que observaram que na presença de triptofano, macrófagos exibiam alta expressão de AANAT e MEL, sendo esse processo regulado por interferon α e γ (IFN- α / IFN γ), acetato miristato de forbol (PMA) e Lipopolissacarideo (LPS). Além dos macrófagos peritoneais, a produção de MEL por outros tipos de macrófagos já foi demonstrada, como por exemplo, macrófagos de colostro humano (Pontes *et al.*, 2006; Pires-lapa *et al.*, 2013) e em macrófagos de linhagem 264.7 (Muxel *et al.*, 2012).

A modulação e os efeitos da melatonina produzida pela pineal e células imunocompetentes formam o arcabouço experimental que permitiram a descrição de um Eixo Imune-Pineal, como descrito em detalhes a seguir.

1.2 Eixo Imune Pineal

Na década de 70 foram notados os primeiros indícios de que a glândula pineal está relacionada com a modulação do sistema imunológico (Klein *et al.*, 1972). Estes estudos demonstraram que animais pinealectomizados apresentaram aceleração na involução do timo, órgão do sistema imune responsável pela maturação de linfócitos (Klein *et al.*, 1972; Klein, 1979). Estudos demonstraram que a melatonina atua como um importante agente imunomodulador, aumentando a proliferação de linfócitos T, a apresentação de antígenos e a fagocitose de macrófagos (Carrillo-Vico *et al.*, 2005; Pontes *et al.*, 2006; Pires-Lapa *et al.*, 2013; Markus & Cecon, 2013; Carrilo-Vico *et al.*, 2013).

Tendo em vista a interdependência entre os sistemas produtores de melatonina e o sistema imunológico, nosso grupo de trabalho tem avaliado o papel da melatonina (produzida pela pineal ou por células imunocompetentes) como parte integrante da regulação dos processos imunológicos. Como mencionado anteriormente, o conjunto de dados obtidos permitiu a percepção e descrição do eixo imune-pineal (EIP; Markus *et al.*, 2007). Neste contexto, a melatonina produzida pela glândula pineal inibe parcialmente a migração de leucócitos da corrente sanguínea para os tecidos (Lotufo *et al.*, 2001 e 2006; Tamura *et al.*, 2009) e, durante processos inflamatórios, agentes imunológicos exógenos (lipopolissacarídeos de bactérias gram-negativas LPS, da Silveira Cruz Machado *et al.*, 2010) e endógenos (TNF, tumor necrosis factor, Fernandes *et al.*, 2006) reduzem, transitoriamente, a produção de MEL pela pineal, por um mecanismo dependente da ativação do fator nuclear κ B (NF κ B). No contexto do EIP, a diminuição dos níveis de MEL circulante resulta em maior adesão e migração de células imunocompetentes pelo endotélio vascular (Tamura *et al.*, 2009) sendo, portanto, um importante mecanismo regulatório da montagem de processos inflamatórios.

No local da inflamação, células imunocompetentes, como linfócitos (Carrillo-Vico *et al.*, 2005) e macrófagos (Muxel *et al.*, 2012 e Pires-Lapa *et al.*, 2013) passam a produzir altas concentrações de melatonina em resposta a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) como o LPS (Muxel *et al.*, 2012) e o zimosan, que é um β -glucano constituinte estrutural da parede celular de fungos. (Pires-Lapa *et al.*, 2013). Como exemplo, podemos citar estudos realizados em células imunocompetentes do colostro humano que demonstram a produção de melatonina induzida por bactérias *Escherichia coli* enteropatogênica (Pontes *et al.*, 2006) e zimosan (Pontes *et al.*, 2006, Pires-Lapa *et al.*, 2013). Tanto LPS quanto zimosan ativam a translocação de NF κ B em macrófagos de colostro e de linhagem (RAW 264.7) e a utilização de um inibidor desta via inibe a produção de melatonina induzida por estes PAMPs (Muxel *et al.*, 2012 e Pires-Lapa *et al.*, 2013). Mais ainda, ensaios por eletromobilidade em gel na presença de anticorpos específicos demonstraram que o zimosan induz em macrófagos RAW um aumento das subunidades de NF κ B Rel-c, Rel-A e p50 na forma dos dímeros p50/Rel-A e p50/Rel-c. (Muxel *et al.*, 2012).

A produção de melatonina por células imunocompetentes regula diversas funções. Em células mononucleares fagocíticas do colostro, por exemplo, foi demonstrada que a melatonina exógena e endógena controla positivamente a capacidade fagocítica destas células por um mecanismo dependente de receptores de melatonina (Pires-Lapa *et al.*, 2013). Tomados em conjunto, os dados descritos mostram que a produção de melatonina produzida por fagócitos é dependente da ativação da via do NF κ B e esta produção modula a atividade destas células. Deste modo, é interessante notar que esse fator de transcrição é fundamental no processo inflamatório, pois inibe a produção de melatonina pela pineal (permitindo uma maior migração de células para o foco da lesão) e estimula a local por células imunocompetentes (Markus *et al.*, 2013).

1.3 Glicocorticoides e produção de melatonina

Durante quadros de infecções não controladas adequadamente a produção excessiva de citocinas circulantes pode causar à morte do hospedeiro (Hack *et al.*, 1997), ficando claro que o controle temporal e a quantidade das suas produções devam ser bem regulados. O contraponto da resposta pró-inflamatória é dado pela ação de moduladores regulatórios como, por exemplo, os glicocorticoides (Turnbull & Rivier, 1999). Deste modo, a dinâmica de um processo de defesa tem, em sua base funcional, a ativação do eixo HPA (hipotálamo – hipófise – adrenal) e consequente liberação de glicocorticoides.

Os efeitos dos glicocorticoides foram observados, pela primeira vez em 1855, pelo médico britânico Thomas Addison, que observou que lesões nas glândulas adrenais levavam a morte dos pacientes, descrevendo assim uma síndrome decorrente da destruição das adrenais, que posteriormente levou seu nome, síndrome de Addison (Smans & Zelissen, 2012). No ano seguinte, o fisiologista Charles Édouard Brown-Séquard, ao remover as glândulas adrenais de diferentes animais sadios, notou uma drástica redução na sobrevivência destes animais, concluindo que a morte resultava da falta de substâncias vitais produzidas pelas glândulas adrenais que eram liberadas na corrente sanguínea (Aminoff, 1996). Atualmente, entende-se que Brown-Séquard se referia às catecolaminas (noradrenalina e adrenalina) e aos corticoides (glicocorticoides e mineralocorticoides) produzidos por estas glândulas.

Enquanto as catecolaminas são sintetizadas na medula da glândula adrenal por meio da estimulação do sistema nervoso autônomo simpático, os corticoides são liberados pelo córtex da glândula adrenal, sob estímulos diversos, como por exemplo, estresse físico, emocional ou bioquímico, que provocam a ativação do eixo Hipotálamo -hipófise/pituitária – adrenal (HPA/HHA) – (Turnbull & Rivier, 1999). A estimulação do hipotálamo leva à liberação do hormônio corticotrófico (CRH) que são produzidos pelas células no núcleo

paraventricular (PVN) (Turnbull & Rivier, 1999). Por exemplo, neurotransmissores produzidos por neurônios catecolaminérgicos ou glutamatérgicos e mediadores inflamatórios como citocinas e mediadores lipídicos induzem um aumento dos níveis intracelulares de cálcio no PVN, promovendo a fusão das vesículas contendo CRH à membrana plasmática que será então transportado até a hipófise através do sistema porta-hipofisário (Checkley, 1996). Na hipófise o CRH induzirá o aumento de Adenosina- 3,5-Monofosfato cíclico (AMPC), que ativará a enzima PKA - proteína quinase A que, por sua vez, fosforila canais de cálcio, aumentando os níveis de cálcio intracelular e promovendo a liberação na corrente sanguínea do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que induzirá a síntese de glicocorticoides pelas adrenais (Nemeroff, 1996; Guyton & Hall, 2002).

Os glicocorticoides são hormônios esteroides que induzem diversas respostas fisiológicas afetando, por exemplo, o metabolismo dos carboidratos e modulando respostas de defesa. (Bavaresco *et al.*, 2005, Caratti *et al.*, 2015). Apesar da síntese e liberação ocorrerem naturalmente pelo organismo de forma circadiana, segundo o hábito de vida de cada espécie, fatores associados a perigo (infecções, por exemplo) aumentam a liberação de glicocorticoides que, por sua vez, modulam a atividade de células imunocompetentes (Goodman & Gilman, 2003). Os glicocorticoides podem interagir diretamente nas células por meio de dois tipos de receptores intracelulares, os receptores de MR (MR, do inglês, *mineralocorticoids receptors*) e os GR (GR, do inglês *glucocorticoides receptors*) - (Krozowski & Funder, 1983). Estes receptores atuam como fatores de transcrição gênica regulando a programação da fisiologia celular (Bledsoe *et al.*, 2002; Kumar & Thompson, 2005; Ramamoorthy & Cidlowski, 2013; 2016).

Os glicocorticoides como, por exemplo, a corticosterona (CORT) tem maior afinidade por MR do que por GR (Reul & De Kloet, 1985). A ativação de GR é obtida quando há altas

concentrações de glicocorticoides que podem ser atingidas a partir da estimulação do eixo HPA. A interação do hormônio adrenal com GR localizados no hipotálamo, por exemplo, é um dos passos da autorregulação do eixo HPA, levando a uma diminuição da síntese de ACTH e reduzindo o estímulo sobre a adrenal (Kloet *et al.*, 1998).

Estudos do nosso grupo mostram que glicocorticoides apresentam uma ação dual sobre a síntese de melatonina na glândula pineal (Lopes *et al.* 1997, 2001; Ferreira *et al.*, 2005, Fernandes *et al.*, 2006, 2009, 2016). Dependendo do modelo experimental, este hormônio pode tanto potencializar quanto inibir a síntese de melatonina. (Fernandes *et al.*, 2009). A corticosterona potencializa a produção da melatonina em glândulas pineais estimuladas com baixas concentrações de NAd (Ferreira *et al.*, 2005 Fernandes *et al.*, 2006). Por outro lado, em estudo feito com incubação de glândulas pineais com alta dose de corticosterona (100 μ M) e com estimulação máxima de adrenoreceptores, foi observada uma inibição na produção de melatonina (Yuwiler, 1989).

Estudos recentes de nosso grupo esclareceram parte deste efeito dual da CORT sobre a produção de melatonina pela glândula pineal. Demonstramos que a CORT potencializa a produção de melatonina quando a glândula pineal está sob estimulação β -adrenérgica, mas inibe esta produção hormonal quando a pineal é estimulada concomitantemente com agonistas β e α_1 -adrenérgicos sendo que, em ambos os casos, os efeitos são mediados pela ativação de GR (Ferreira *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2017). Deste modo, o contexto de ativação diferencial de receptores adrenérgicos é um fator determinante no padrão de resposta desencadeada pelos glicocorticoides sobre a produção de melatonina pela glândula pineal.

1.4 Macrófagos, glicocorticoides e melatonina

O ano de 2016 marcou os cem anos de aniversário de morte de Élie Metchnikoff (1845-1916), cientista que descreveu os macrófagos pela primeira vez no final do século 19, a ele creditado o descobrimento da fagocitose pelo qual foi premiado em 1908 com o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina. O trabalho de Metchnikoff influenciou e influenciou as pesquisas em imunologia (Underhill *et al.*, 2016)

Os macrófagos são células especializadas, que desempenham diferentes funções dependendo do ambiente onde se encontram, dentre elas a fagocitose de micro-organismos e restos celulares, apresentação de antígenos e produção de citocinas, que são moléculas moduladoras da resposta imunológica que auxiliam no andamento do processo de defesa (Mosser *et al.*, 2008).

Para que ocorra o processo de fagocitose, os macrófagos possuem receptores de membrana para o reconhecimento de patógenos, sendo estes denominados de PAMPs e Padrões Moleculares Associados a Perigo (DAMPs), sendo considerados como a primeira linha de defesa contra infecções (Aderem & Underhill, 1999). Dentre esses receptores podemos citar os receptores do tipo Toll (TLRs) - (Akira & Takeda, 2004), receptores para fagocitose como a dectina-1 (Brown *et al.*, 2002), receptores Scavenger (Park, 2014) e receptores para imunoglobulinas IgG Fc (Karsten *et al.*, 2012).

Os macrófagos são descritos conforme seu estágio de ativação, podendo adquirir propriedades funcionais distintas dependendo dos tipos de estímulos aos quais são submetidos. São denominados classicamente ativados quando os macrófagos residentes, ou seja, os teciduais, são estimulados por interferon- γ (IFN- γ), interleucina-1 (IL-1) ou TNF (Fator de necrose tumoral), atuando, neste caso como células com grande poder microbicida (Mackaness, 1977; O'Shea & Murray, 2008). Na presença de IL-4 eles se tornam

regeneradores teciduais, responsáveis pela recuperação de tecidos lesionados (Loke *et al.*, 2007). Quando ativados por prostaglandinas (Strassmann *et al.*, 1994), IL-10 (Martinez *et al.*, 2008), complexos imunes (Gerber & Mosser, 2001), ligantes de receptores acoplados à proteína G - GPCRs (Hasko *et al.*, 2007), células apoptóticas (Erwig & Henson, 2007) e glicocorticoides (Sternberg, 2006), esses macrófagos assumem a função anti-inflamatória tornando-se assim macrófagos regulatórios.

Os efeitos dos glicocorticoides sobre as células imunes vêm sendo amplamente estudados, devido à interferência direta sobre o funcionamento dessas células. Em macrófagos os glicocorticoides podem suprimir a maturação, proliferação e induzir apoptose (Sternberg, 2006), além de regular a expressão gênica por meio da interação entre outros fatores de transcrição como o NFκB (Ogawa *et al.*, 2005). O NFκB está, em sua forma inativa, ligado ao inibidor de NFκB (IκB - proteína inibitória κB). Após ativação das células, NFκB é liberado do IκB, translocando-se para o núcleo, onde pode ser ligar a regiões promotoras específicas e regular a expressão de citocinas pró-inflamatórias (Ghosh *et al.*, 1998). Os glicocorticoides inibem NFκB interagindo com a subunidade p65 (REL A), e pela indução da expressão de IκB (Ghosh *et al.*, 1998). Coerente com a inibição de NFκB, glicocorticoides em doses fisiológicas ou exógenos, a partir do tratamento com a cortisol/corticosterona ou a hidrocortisona, levam a diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF (Scheinman, 1995). Em macrófagos peritoneais de ratos, foi observado que na ausência de desafios imunológicos, as atividades quimiotáticas e fagocíticas dessas células aumentam, quando essas células foram estimuladas com baixas concentrações de CORT (30, 150 nM), enquanto que em alta concentração (3μM) não foi observado esse efeito (Zhong *et al.*, 2013).

Como mencionado anteriormente, macrófagos produzem melatonina em resposta a padrões associados a patógenos como LPS (Muxel *et al.*, 2012) e zimosan (Pires-Lapa *et al.*,

2013) e também a moduladores adrenérgicos (Pires-Lapa *et al.*, em fase de preparação). Vale lembrar que, a ação desses PAMPs ocorre via receptores de membrana do tipo Toll (TLR), no caso do LPS, receptores TLR 4 e no caso do zimosan receptores TLR 2/6 (Akira & Takeda, 2004). A produção de melatonina em macrófagos induzida por PAMPs regula diversas funções destas células, dentre elas atua potencializando a fagocitose por meio da regulação de dectina 1 (Pires-Lapa *et al.*, 2013).

Deste modo, a produção de melatonina por macrófagos parece ser um fenômeno controlado por diferentes sinais de perigo presentes durante respostas de defesa. Haja vista que os efeitos duais dos glicocorticoides sobre a produção de MEL na glândula pineal são dependentes do contexto, a presente dissertação buscou avaliar os efeitos dos glicocorticoides sobre a produção de melatonina por macrófagos *per se* ou induzida por zimosan, LPS e adrenalina. Temos como hipótese do presente trabalho, que a corticosterona modula de forma específica a produção de melatonina em macrófagos de linhagem RAW 264.7 em diferentes contextos.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste projeto foi avaliar o efeito da corticosterona sobre a produção de melatonina em macrófagos RAW 264.7 *per se* e induzida por LPS, zimosan e adrenalina.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar os efeitos da corticosterona sobre a produção de melatonina em macrófagos RAW 264.7 em cultura.
2. Avaliar os efeitos da pré-incubação com corticosterona sobre a produção de melatonina induzida por zimosan, LPS e adrenalina em macrófagos RAW 264.7 em cultura.
3. Avaliar o efeito da corticosterona sobre a expressão das enzimas AANAT (total e fosforilada) e HIOMT/ASMT.
4. Nos modelos em que constatamos efeitos da corticosterona, avaliamos se esses efeitos sobre a produção de melatonina são dependentes da ativação dos receptores para glicocorticoides (GR) ou receptores de Mineralocorticoides (MR).
5. Avaliar a intensidade de NFκB nuclear e total, através da subunidade p65 em células incubadas com corticosterona, RU486 na presença/ausência de estimulação com zimosan.

3. Materiais e métodos

3.1 Cultura celular

Foram utilizados macrófagos de camundongo da linhagem RAW 264.7, mantidos em garrafas de cultura (75 cm²) em condições constantes de 37°C, 5% de CO₂, cultura a base de RPMI com 5% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibióticos (penicilina e estreptomicina). No momento dos experimentos as células em cultura foram contadas em câmara de Neubauer, onde foram colocados 5 µL das células que foram mantidas em cultura mais 45 µL de substância de Turk (diluída 10 vezes). As células foram plaqueadas 2x10⁶ células por poço nos ensaios para dosagem de MEL e 10⁶ para os ensaios de imunocitoquímica.

3.2 Protocolos experimentais

3.2.1 Protocolos de incubação para determinar a produção de melatonina em células em cultura

As células de linhagem RAW 264.7, foram plaqueadas e cultivadas *overnight* até o período de pré-incubação com CORT 1, 10 300, 1000 µM. As células foram pré- incubadas com CORT por 30 minutos, após esse período foram estimuladas por zimosan (1 µg/mL por 6 h), LPS (1 µg/mL, 3 h) ou adrenalina (1µM, 3h) ainda na presença da CORT. Após a estimulação as células foram mantidas a -80°C até o momento de análise.

3.2.2 Protocolos para determinação dos efeitos da corticosterona, zimosan e corticosterona mais zimosan sobre a expressão das enzimas da via de biossíntese da melatonina

Para avaliar a atividade das enzimas AANAT, PAANAT e ASMT/HIOMT em condições basais e na presença de estímulo imunológico, as células foram plaqueadas em placas de 8 poços (LabTek *chamber slide*, Nalge, NY, EUA) e estimuladas CORT (1, 10 e 100 μ M por 1h), com zimosan (1 μ g/mL por 3 h) ou a combinação dos dois (pré-incubação com CORT 1, 10 e 100 μ M por 30 min + Zimosan 1 μ g/mL por 3h).

3.2.3 Protocolos para determinação dos efeitos dos antagonistas de GR e MR sobre a expressão das enzimas da via de biossíntese da melatonina

As células foram plaqueadas em placas de 8 poços (LabTek *chamber slide*, Nalge, NY, EUA). Para o bloqueio de receptores de GR utilizamos o antagonista Mifepristone (RU 486 - 1,0 μ M) ou Spirolactone (Spiro 30 μ M) adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo., USA). Ambos os antagonistas tiveram um período de pré-incubação de 30 minutos antes da CORT ou respectivo veículo em células incubadas CORT. Nos experimentos com CORT mais zimosan, houve a pré-incubação de 30 minutos com os antagonistas antes do estímulo com a CORT 100 μ M por 1h e zimosan 1 μ g/mL, por 3h.

3.2.4 Protocolos para determinação dos efeitos da corticosterona, zimosan e RU486 sobre a translocação nuclear de NFκB.

Foram utilizadas 10^6 células de macrófagos RAW 264.7 que foram plaqueadas em placas de 24 poços (LabTek *chamber slide*, Nalge, NY, EUA). As células foram pré-tratadas com $1\mu\text{M}$ de RU486 (ou veículo), 30 minutos antes da CORT $100\mu\text{M}$ (ou veículo) por 1h. Após os pré-tratamentos as células foram incubadas com zimosan $1\mu\text{g/mL}$ por 3 h (ainda na presença de RU486, CORT ou RU486 + CORT).

3.2.5 Protocolos para determinação dos efeitos da corticosterona sobre a fagocitose

Foram utilizadas células de linhagem, macrófagos RAW 264.7, mantidas em cultura até o momento do ensaio, onde foram contadas em câmara de Neubauer, sendo colocados $5\mu\text{L}$ das células que foram mantidas em cultura mais $45\mu\text{L}$ de substância de Turk (diluída 10 vezes), Após a contagem, as células foram resuspendidas em 2 mL de meio RPMI e então foram pipetadas um volume de 10^5 células, por tubo de ensaio próprios para citometria de fluxo, sendo completado para um volume final de $500\mu\text{L}$. As células foram estimuladas com zimosan fluorescente (5×10^5 partículas por tubo) e corticosterona (1, 10 e $100\mu\text{M}$). Houve pré-incubação com corticosterona por 30 minutos, após esse período as células foram incubadas com zimosan fluorescente em agitação leve e constante por 1 hora em temperatura ambiente.

3.3 Métodos de análise experimental

3.3.1 Dosagem de melatonina

A melatonina presente nos meios de cultura foi determinada por kit ELISA para MEL com limite inferior de detecção de 3,0 pg/ml (IBL, Amburgo, Alemanha), conforme determinações do fabricante. As placas foram lidas em espectrofotômetro a 405 nm (SpectraMAX 250; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

3.3.2 Imunocitoquímica

Para análises da expressão das enzimas AANAT, PAANAT e ASMT em tratamentos com CORT, zimosan, CORT mais zimosan e utilizando os bloqueadores de GR e MR, a fluorescência foi analisada por microscopia confocal (Zeiss LSM 510). Após o tratamento, as células foram fixadas com acetona/metanol (1:1, 15 minutos, -20°C), permeabilizadas com saponina (0,5% PBS, 10 min, temperatura ambiente) e incubadas com anticorpos primários anti-AANAT, anti-PAANAT ou anti-ASMT (anti-coelho, 1:200, 24 h, 4°C; Imuny Biotechnology, São Paulo, SP, Brasil). As células foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a isocianato de fluoresceína, FITC (1:200, 1 h, 4°C; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). O DNA nuclear foi marcado com DAPI 4',6-diamidino-2-fenilindole, dilactato (5 min, temperatura ambiente, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Após o ensaio, as placas foram mantidas a 4°C até o momento da análise. O laser HeNe1 (543 nm) foi utilizado para excitação do DAPI, com filtro de emissão entre 560-633 nm, e com laser Argon para a excitação de FITC, com filtro de emissão entre 515-530 nm. Para cada grupo amostral foram capturadas quatro imagens, correspondentes a diferentes campos, mantendo-se as mesmas configurações (intensidade do laser, *pinhole* e

tempo de aquisição). A quantificação da fluorescência foi de pelos menos 10 células por campo, com o auxílio do software Image J. Na análise comparativa das linhagens, os valores obtidos foram normalizados pela fluorescência média detectado no controle sem o anticorpo primário; na análise temporal do efeito do tratamento com zimosan, os valores obtidos foram normalizados pela fluorescência média detectadas nos respectivos grupos controles.

3.3.3 Translocação de NFκB

A translocação de NFκB em células RAW 264.7 estimuladas com CORT mais zimosan foram analisadas por citometria de fluxo acoplada com imagem (FlowSight, Merck, Alemanha). Após os tratamentos as células foram fixadas com 150 μL de PBS 1 X a 4°C mais PAF 4% (Paraformaldeído), por 15 min a 4°C. Após o período de fixação, as células foram permeabilizadas com triton 0,1% em PBS por 10 minutos em temperatura ambiente, sendo a amostra centrifugada posteriormente a 400 x g por 10 minutos e descartado o sobrenadante e lavada as amostras com PBS 1X. Posteriormente as células foram incubadas com 30 μL com solução de bloqueio composto de PBS 1X+BSA 2% por 60 minutos, após esse período, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas com 30 μL do anticorpo primário anti-p65 (1:200, overnight, 4°C; ABCAM 7970-1, Cambridge, Reino Unido). No dia seguinte as amostras foram centrifugadas, descartados os sobrenadantes, lavadas com PBS e incubadas com 30 μL de anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a isocianato de fluoresceína, FITC (1:200, 1 h, 4°C; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Após a incubação lavamos com PBS, centrifugamos e incubamos com o marcador de núcleo, 30 μL anticorpo7-AAD aminoactinomicina-D (1:200, 30 min, 4°C, Life Technologies A1310, Eugene, Oregon-USA). Após esse período, as amostras foram transferidas para microtubos (1,5 mL) e mantidas a 4°C até o momento da

análise. Com o auxílio do software INSPIRE Merck, Alemanha, adquiram-se 10.000 eventos por amostra, utilizando o laser 488 nm para estimulação em uma amplificação de 20 vezes das imagens. Controles *single color* foram empregados na construção de matriz de compensação, utilizada na correção do *crosstalk* espectral. As imagens adquiridas foram analisadas utilizando-se o wizard “nuclear localization” do software IDEAS, Merck, Alemanha.

3.3.4 Fagocitose

O processo fagocítico em células RAW 264.7 foi analisado por citometria de fluxo acoplada com imagem (FlowSight, Merck, Alemanha). Após as incubações descritas anteriormente (zimosan fluorescente com ou sem pré-incubação com corticosterona; item 3.2.5), foi adicionado 1 mL de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético - 6mM) em todos os tubos e levado a centrifugação a 1200 RPM por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação o conteúdo foi vertido e acrescentamos 150 µL de PBS e agitado levemente para desfazer eventuais grumos de células. Adicionamos 50 µL de PAF 4% (Paraformaldeído) para fixação das células, deixando em incubação por 30 minutos a 4°C, após esse período foram adicionados 500 µL de PBS e centrifugado a 1200 RPM a 4°C por 10 minutos. Terminada a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e acrescentamos 100 µL de PBS agitando cuidadosamente, esse volume foi então armazenado em microtubos (Eppendorf Axygen âmbar 1500 µL) e levado à geladeira até o momento da análise. Com auxílio do software INSPIRE Merck, Alemanha, adquiram-se 10.000 eventos por amostra, utilizando o laser 488 nm e com amplificação de 20 vezes. Controles *single color* foram empregados na construção da matriz de compensação, utilizada na correção do *crosstalk* espectral. As imagens adquiridas foram analisadas utilizando-se o wizard “internalization” do software IDEAS,

Merck, Alemanha. Foi determinada a porcentagem de células fagocitando e a porcentagem de células fagocitando 2 ou mais partículas de zimosan.

3.4 Análises Estatísticas

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (epm). Em ensaios de imunocitoquímica para análise da expressão das enzimas AANAT, PAANAT e ASMT em ensaios com estímulo da CORT, CORT mais zimosan, e antagonistas de GR e MR, ensaios de fagocitose e NF κ B as comparações entre dois grupos foram feitas por teste *t* de Student, dois ou mais grupos foram feitas por análise de variância de uma via, seguida de pós-teste de Tukey (one-way ANOVA). Diferenças de ocorrência probabilística menor que 5% ($p < 0,05$) foram considerados estaticamente diferentes. Todas as análises estatísticas foram feitas por meio do software Graph Pad Prism versão 5.0 (GraphPad Software).

4. Resultados

4.1 Dosagens de Melatonina em macrófagos RAW 264.7

Com bases nos estudos anteriores do nosso grupo que demonstraram os efeitos dos glicocorticoides sobre a produção de melatonina pela glândula pineal (Fernandes *et al.*, 2006, 2009, 2016) e, considerando-se que macrófagos produzem melatonina em resposta a diferentes estímulos (Muxel *et al.*, 2012; Pires-Lapa *et al.*, 2013), foram testados os efeitos de diferentes concentrações de corticosterona (CORT; 1 – 1000 μM) sobre a produção de melatonina por células RAW 264.7 induzida por zimosan, LPS ou adrenalina.

Primeiramente, observarmos o efeito *per se* da CORT sobre a produção de MEL. Para tanto, incubamos as células RAW com as diferentes concentrações de CORT (1, 10, 100 e 1000 μM) e constatamos um aumento significativo da produção de MEL quando as células foram expostas à concentração de 100 μM em comparação às células expostas ao veículo (Fig.1A). Quando dosamos MEL nas células estimuladas com zimosan, na ausência ou presença de CORT, constatamos que o zimosan (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) aumenta a produção de MEL quando comparamos com células tratadas apenas com seu veículo, porém, quando as células foram incubadas com zimosan e CORT (1-1000 μM), a CORT induziu uma diminuição concentração-dependente na produção de MEL (Fig.1B). Testamos também o efeito da CORT sobre a estimulação da produção de MEL em macrófagos RAW induzida por LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3 h; Fig.1C) ou adrenalina (1 μM , 3h; Fig. 1D). Ambos os tratamentos induziram a produção de melatonina pelas células RAW e, apesar de uma tendência de aumento na produção de melatonina induzida pelo LPS, os tratamentos CORT não apresentaram efeitos significativos.

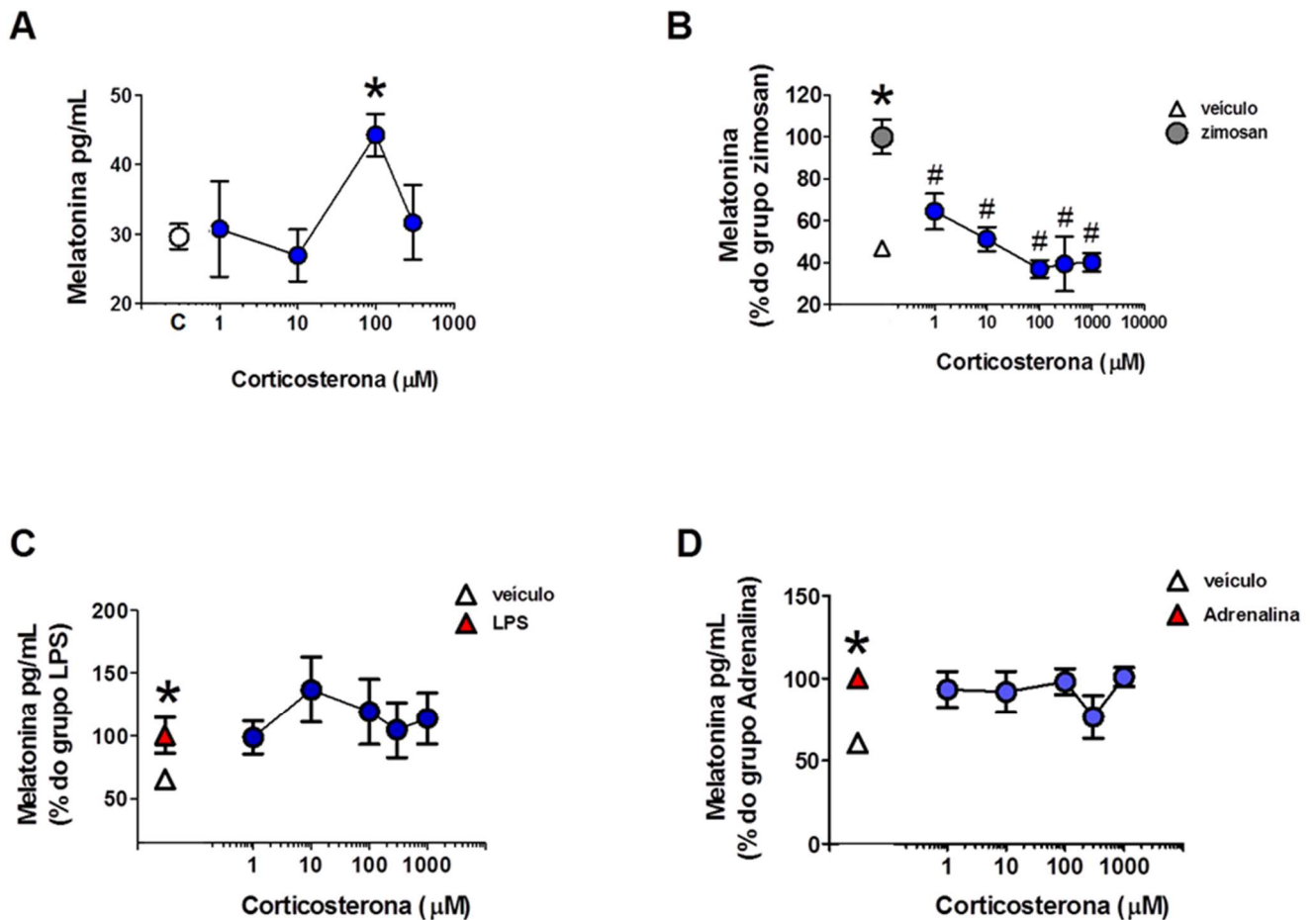


Figura 1. Efeito da corticosterona sobre a produção de melatonina em Macrófagos RAW 264.7. (A) Produção de melatonina em células RAW 264.7 em culturas incubadas com veículo (círculo branco) ou corticosterona (1-1000 μM, círculos azuis) por 3 h. (B) Produção de melatonina em células RAW 264.7 em cultura incubadas com veículo de zimosan (triângulo branco), zimosan (1 μg/mL, círculo cinza) e zimosan + corticosterona (1 – 100 μM círculos azuis) por 6 h. (C) Produção de melatonina por células RAW 264.7 incubadas com veículo (triângulo branco) ou LPS (1 μg/mL) por 3 h na ausência (triângulo vermelho) ou presença de corticosterona (1-1000 μM ; círculos azuis). (D) Produção de melatonina por células RAW incubadas com veículo (triângulo branco) ou adrenalina na ausência (1 μM e 3 horas, triângulo vermelho) ou presença de corticosterona (1-1000 μM, círculos azuis). Comparação entre dois grupos foram feitas por teste t de Student. Análises entre 3 ou mais grupos foram feitas por One-Way ANOVA, seguida de pós teste de Tukey, * P<0,05 vs respectivo grupo controle. # P<0,05 vs grupo tratado com zimosan. Dados são apresentados como média ± epm; n= 3-4 culturas independentes por ponto.

4.2 Análises das enzimas envolvidas na via de biossíntese de melatonina em células estimuladas com corticosterona

O efeito potencializador da CORT sobre a produção de melatonina pela pineal está associado a um aumento na transcrição do gene *Aanat* (Fernandes *et al.*, 2006) mas também, ao aumento nas atividades das enzimas AANAT e ASMT (Fernandes *et al.*, 2009). Deste modo, após a quantificação da melatonina descrita anteriormente, analisamos os efeitos da corticosterona (1, 10 e 100 μM) sobre a expressão das enzimas AANAT, sua forma ativa fosforilada (PAANAT) e da ASMT pela técnica de imunocitoquímica. Observamos que o tratamento com CORT (1 – 100 μM , 1h) aumentou de forma concentração-dependente as expressões de AANAT (Fig. 2) e de PAANAT (Fig.3). Além disso, o tratamento com CORT induziu um aumento na expressão de ASMT (Fig. 4) sendo que, neste caso, já observamos a resposta máxima nas células tratadas com a menor concentração de CORT (1 μM).

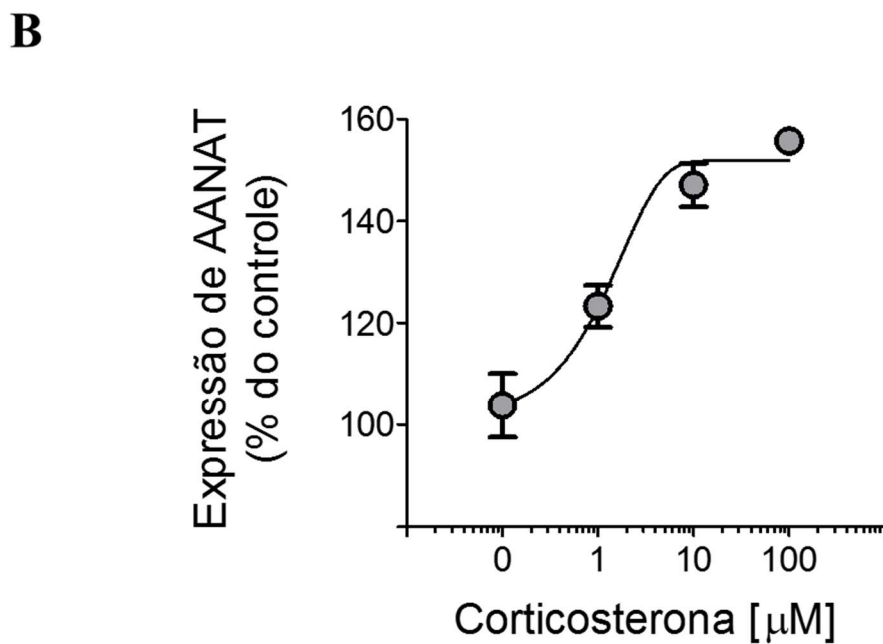
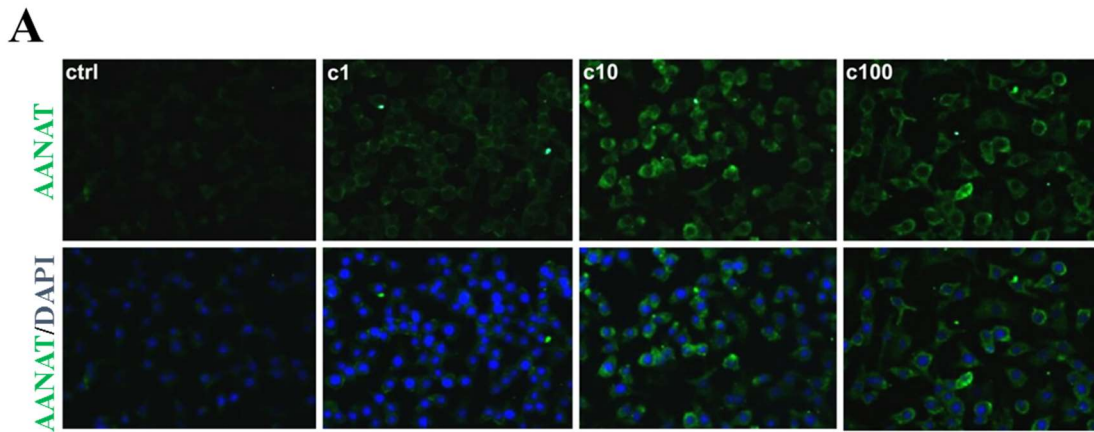
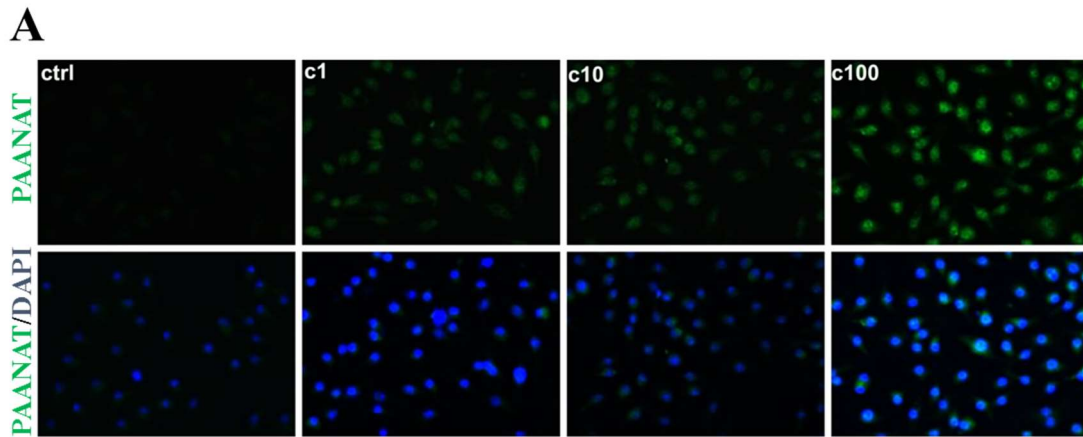


Figura 2. Efeito da corticosterona sobre a expressão da enzima AANAT em macrófagos RAW 264.7. (A) Análise por imunofluorescência da expressão de AANAT (marcada com FITC; verde) e do núcleo marcado com DAPI (azul). Grupo controle (ctrl), CORT 1 μM (c1), CORT 10 μM (c10) e CORT 100 μM (c100). (B) Quantificação da expressão de AANAT em células tratadas com veículo ou concentrações crescentes de CORT (1, 10 e 100 μM , 1h). Dados foram normalizados pela média do grupo veículo e são apresentados como média \pm epm; $n = 8$ por ponto experimental. Os dados foram analisados por One-Way ANOVA, seguida de pós teste de Tukey.



B

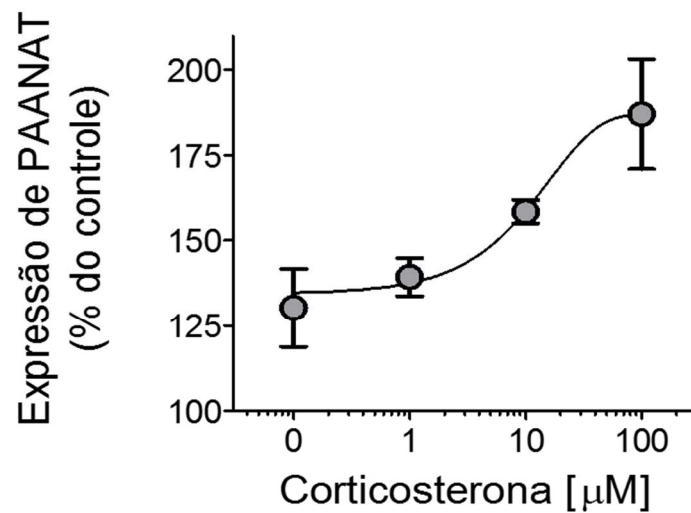


Figura 3. Efeito da corticosterona sobre a expressão da enzima PAANAT em macrófagos RAW 264.7. (A) Análise por imunofluorescência da expressão de PAANAT (marcada com FITC, verde) e do núcleo marcado com DAPI (azul). Grupo controle (ctrl), CORT 1 μM (c1), CORT 10 μM (c10) e CORT 100 μM (c100). **(B)** Quantificação da expressão de PAANAT em células tratadas com veículo ou concentrações crescentes de CORT (1, 10 e 100 μM ; 1h). Dados foram normalizados pela média do grupo veículo e são apresentados como média \pm epm; $n = 8$ por ponto experimental. Os dados foram analisados por One-Way ANOVA, seguida de pós teste de Tukey.

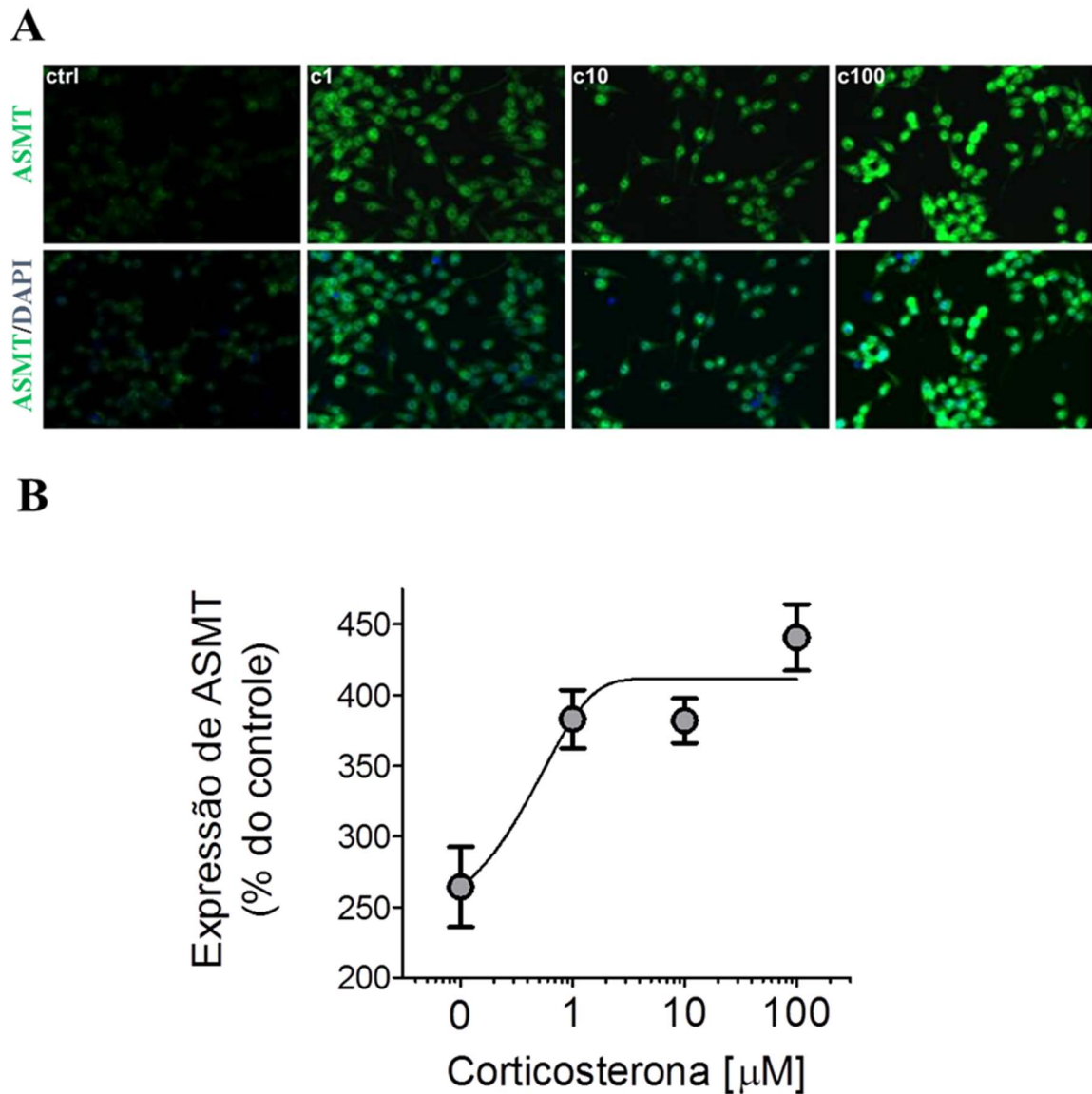


Figura 4. Efeito da corticosterona sobre a expressão da enzima ASMT em macrófagos RAW 264.7. (A) - Análise por imunofluorescência da expressão de ASMT (marcada com FITC; verde) e do núcleo marcado com DAPI (azul). Grupo controle (ctrl), CORT 1 μM (c1), CORT 10 μM (c10) e CORT 100 μM (c100). **(B)** - Quantificação da expressão de ASMT de células tratadas com veículo ou concentrações crescentes de CORT (1, 10 e 100 μM ; 1h). Dados foram normalizados pela média do grupo veículo e são apresentados como média \pm epm; n = 8 por ponto experimental. Os dados foram analisados por One-Way ANOVA, seguida de pós teste de Tukey.

4.3 Papel dos receptores de glicocorticoides no efeito da corticosterona sobre as enzimas da via biossintética da melatonina

Dando continuidade ao estudo, avaliamos se os receptores de glicocorticoides (GR) estão diretamente envolvidos nos resultados obtidos com o tratamento com CORT sobre a expressão das enzimas da via de síntese da melatonina. Neste sentido, tratamos as células com veículo ou Mifepristone (RU486, 1,0 μM), um antagonista de GR, 30 minutos antes do estímulo com CORT nas doses de 1 ou 100 μM (por 1h, ainda na presença de RU486).

Ao analisarmos a expressão da enzima AANAT, constatamos que o tratamento com RU486 diminuiu significativamente a expressão desta enzima quando as células foram estimuladas com CORT 100 μM (Fig. 5). Efeito similar foi obtido para a PAANAT (Fig. 6), contudo observamos apenas uma tendência de diminuição com o tratamento com RU486 na expressão induzida por CORT 100 μM ($p=0,07$). Por fim, ao analisarmos o efeito sobre a expressão da ASMT, o tratamento com RU486 resultou em uma tendência de redução na expressão desta enzima após tratamento com CORT 1 μM ($p=0.1636$) e inibiu significativamente a expressão de ASMT induzida por CORT 100 μM (Fig.7).

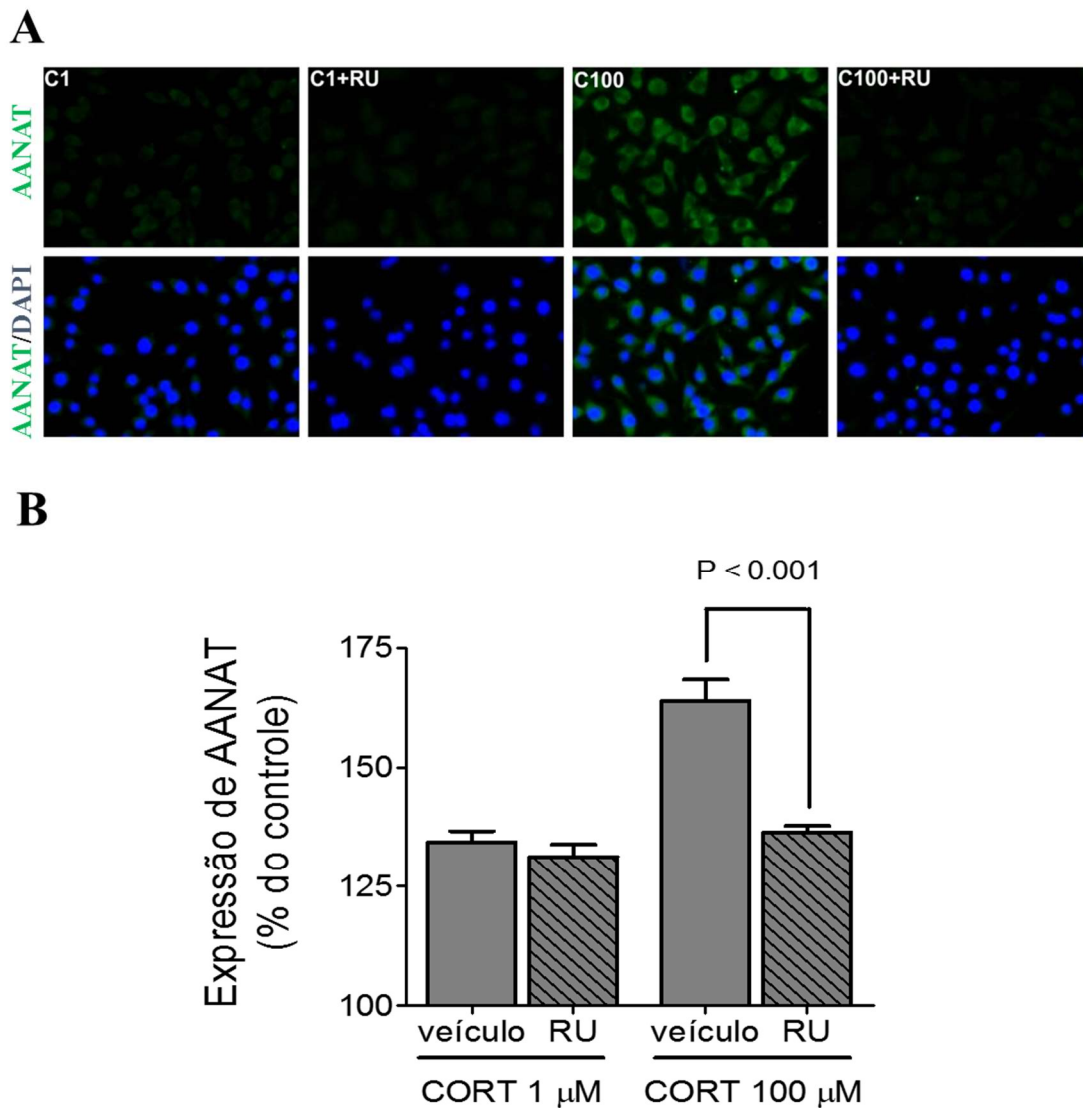


Figura 5. Efeito do antagonista de glicocorticoide mifepristone (RU486) sobre a expressão da enzima AANAT em macrófagos RAW 264.7 estimulados com corticosterona. (A) - Análise por imunofluorescência da expressão de AANAT (marcada com FITC; verde) e do núcleo marcado com DAPI (azul). As células foram pré-incubadas com RU486 (1,0 μM) por 30 min antes da incubação com CORT nas concentrações de 1 e 100 μM por 1 h (ainda na presença de RU486). Grupo CORT 1 μM (c1), CORT 1 μM + RU 486 (c1+RU), CORT 100 μM (c100), CORT 100 μM + RU 486 (c100+RU). **(B)** Quantificação da expressão de AANAT, células RAW 264.7 tratadas com as doses de CORT 1 e 100 μM + veículo do RU486 (cinza), CORT 1 e 100 μM + RU 486 (cinza hachurado). Os grupos foram comparados por teste t de Student. Dados foram normalizados pela média do grupo controle (células não tratadas com CORT e/ou RU) e são apresentados como média ± epm; n = 3-4 por grupo.

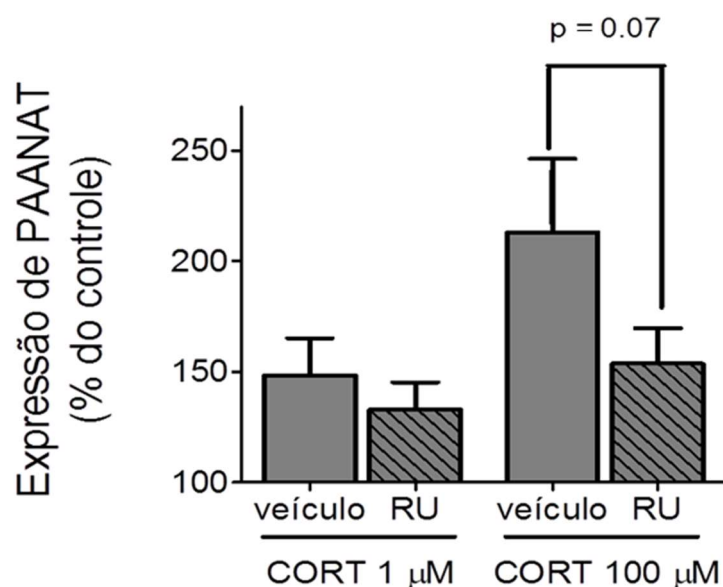
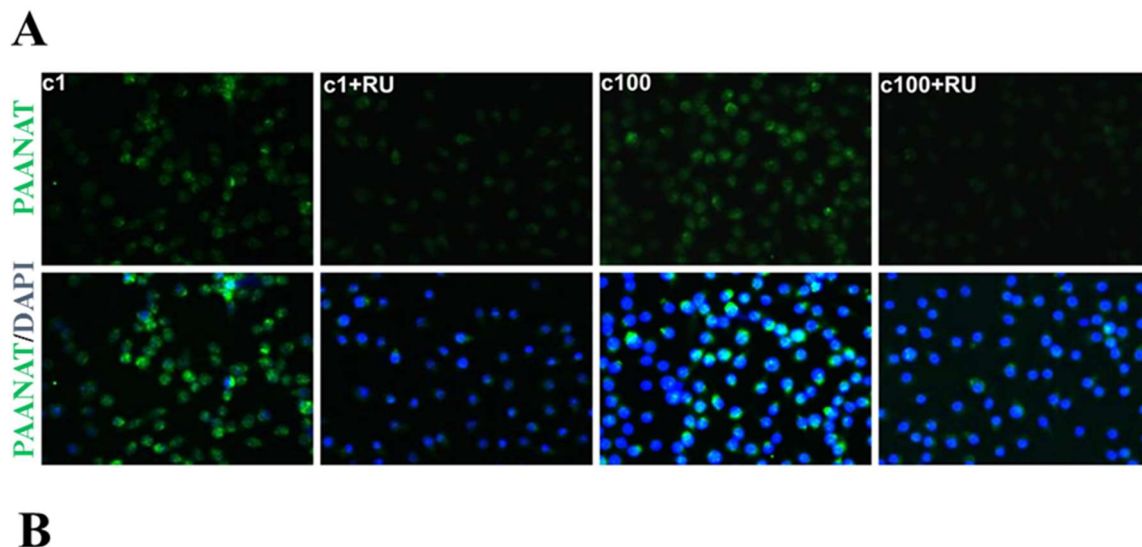


Figura 6. Efeito do antagonista de glicocorticoide mifepristone (RU486) sobre a expressão da enzima PAANAT em macrófagos RAW 264.7 estimulados com corticosterona. (A) - Análise por imunofluorescência da expressão de PAANAT (marcada com FITC; verde) e do núcleo marcado com DAPI (azul). As células foram pré-incubadas com RU486 (1,0 μM) por 30 min antes da incubação com CORT nas concentrações de 1 e 100 μM por 1 h (ainda na presença de RU486). Grupo CORT 1 μM (c1), CORT 1 μM + RU 486 (c1+RU), CORT 100 μM (c100), CORT 100 μM + RU 486 (c100+RU). **(B)** - Quantificação da expressão de PAANAT, células RAW 264.7 tratadas com as doses de CORT 1 e 100 μM + veículo do RU 486 (cinza), CORT 1 e 100 μM + RU 486 (cinza hachurado). Os grupos foram comparados por teste t de Student. Dados foram normalizados pela média do grupo controle e são apresentados como média ± epm; n = 3-4 por grupo.

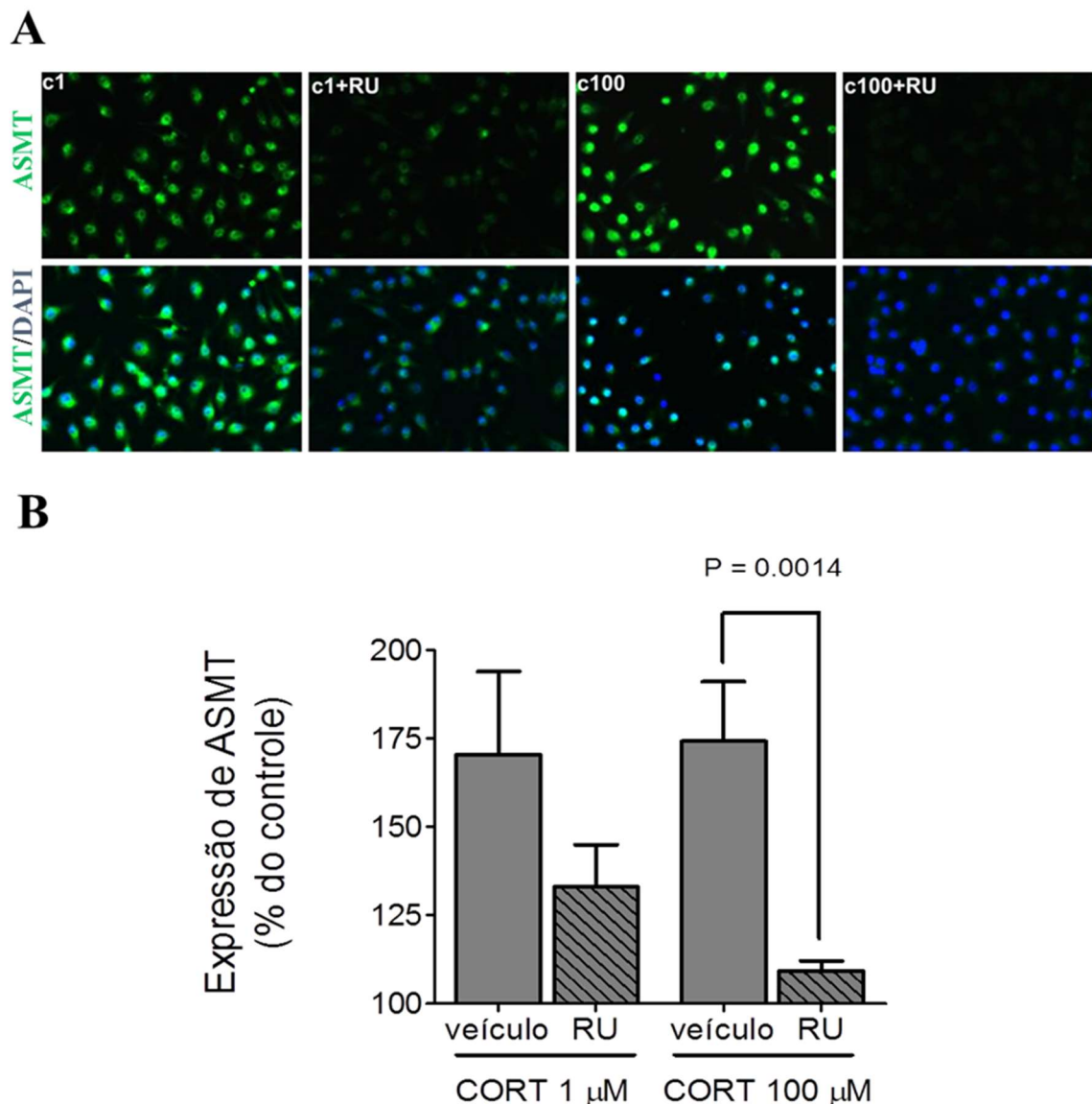


Figura 7. Efeito do antagonista de glicocorticoide mifepristone (RU486) sobre a expressão da enzima ASMT em macrófagos RAW 264.7 estimulados com corticosterona. (A) - Análise por imunofluorescência da expressão de ASMT (marcada com FITC; verde) e do núcleo marcado com DAPI (azul). As células foram pré-incubadas com RU486 (1,0 μM) por 30 min antes da incubação com CORT nas concentrações de 1 e 100 μM por 1 h (ainda na presença de RU486). Grupo CORT 1 μM (c1), CORT 1 μM + RU486 (c1+RU), CORT 100 μM (c100), CORT 100 μM +RU486 (c100+RU). **(B)** Quantificação da expressão de ASMT, células RAW 264.7 tratadas com as doses de CORT 1 e 100 μM + veículo do RU 486 (cinza), CORT 1 e 100 μM + RU 486 (cinza hachurado). Os grupos foram comparados por teste t de Student. Dados foram normalizados pela média do grupo controle e são apresentados como média \pm epm; n = 3-4 por grupo.

4.4 Efeito da corticosterona sobre a expressão das enzimas envolvidas na via de biossíntese de melatonina em células estimuladas com zimosan

Com base nos dados da produção de melatonina mostrando que a CORT inibe a produção desta indolamina induzida por zimosan, resolvemos avaliar a expressão das enzimas AANAT, PAANAT e ASMT em células estimuladas apenas com zimosan ou com zimosan mais CORT (1 e 100 μ M).

Percebemos que o tratamento com zimosan aumentou significativamente a expressão de AANAT (Fig. 8), PAANAT (Fig.9) e ASMT (Fig.10) em relação ao grupo controle. O tratamento com CORT 1 μ M inibiu o efeito do zimosan sobre a expressão da enzima AANAT, contudo, este efeito não foi observado com a concentração de 100 μ M de CORT (Fig. 8). Por outro lado, apesar da concentração de CORT 1 μ M não apresentar efeito, a concentração de corticosterona 100 μ M reduziu significativamente os aumentos das expressões de PAANAT (Fig.9) e ASMT (Fig.10) induzidas pelo zimosan.

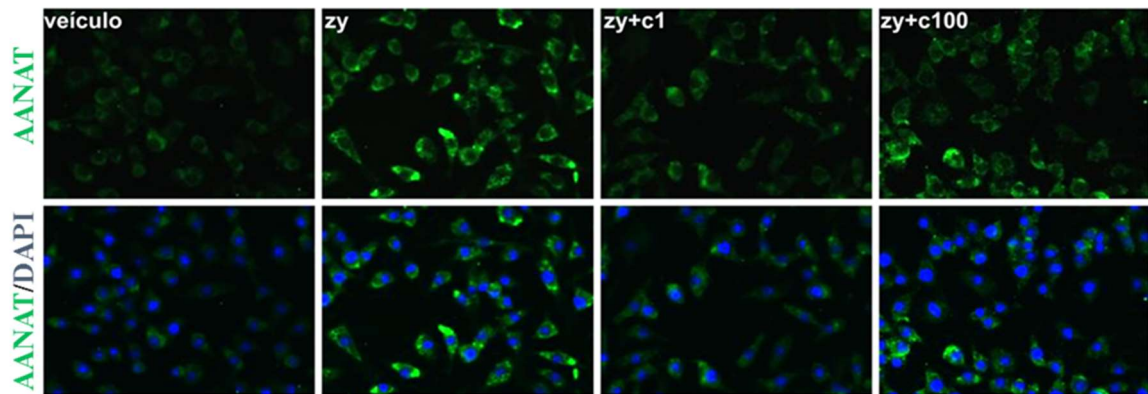
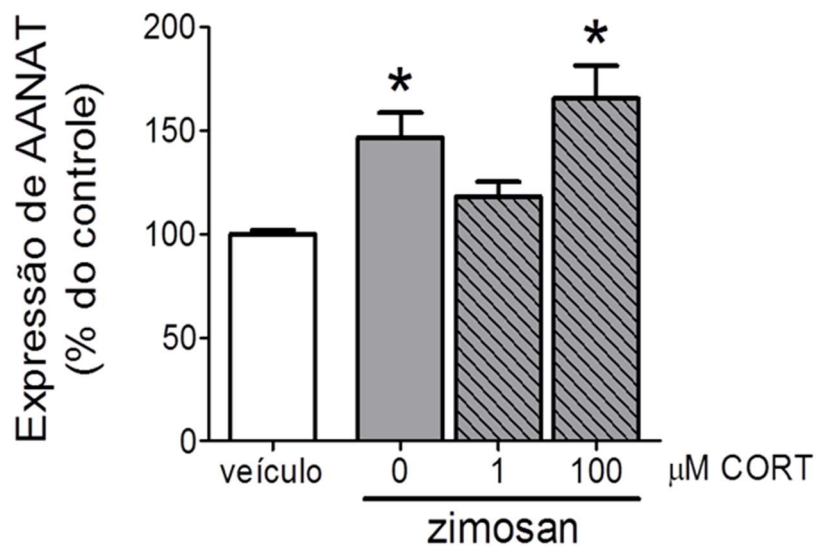
A**B**

Figura 8. Efeito do zimosan e corticosterona sobre a expressão da enzima AANAT em macrófagos RAW 264.7. (A)- Análise por imunofluorescência da expressão de AANAT (marcada com FITC; verde) e do núcleo marcado com DAPI (azul). As células foram pré-incubadas de CORT 1 e 100 μM por 30 min e, posteriormente, tratadas com zimosan 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por 3h (ainda na presença de CORT). Grupo veículo (veículo), zimosan (zy), zimosan mais CORT 1 μM (zy+c1) e zimosan mais CORT 100 μM (zy+c100). **(B)** Quantificação da expressão de AANAT, células RAW 264.7 tratadas com o veículo (branco), zimosan (cinza), zimosan e CORT 1 e 100 μM (cinza hachurado). Os grupos foram comparados por One-Way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey. Dados foram normalizados pela média do grupo controle e são apresentados como média \pm epm; n = 3-4 por grupo, * significativamente diferente do grupo veículo, (p<0,05).

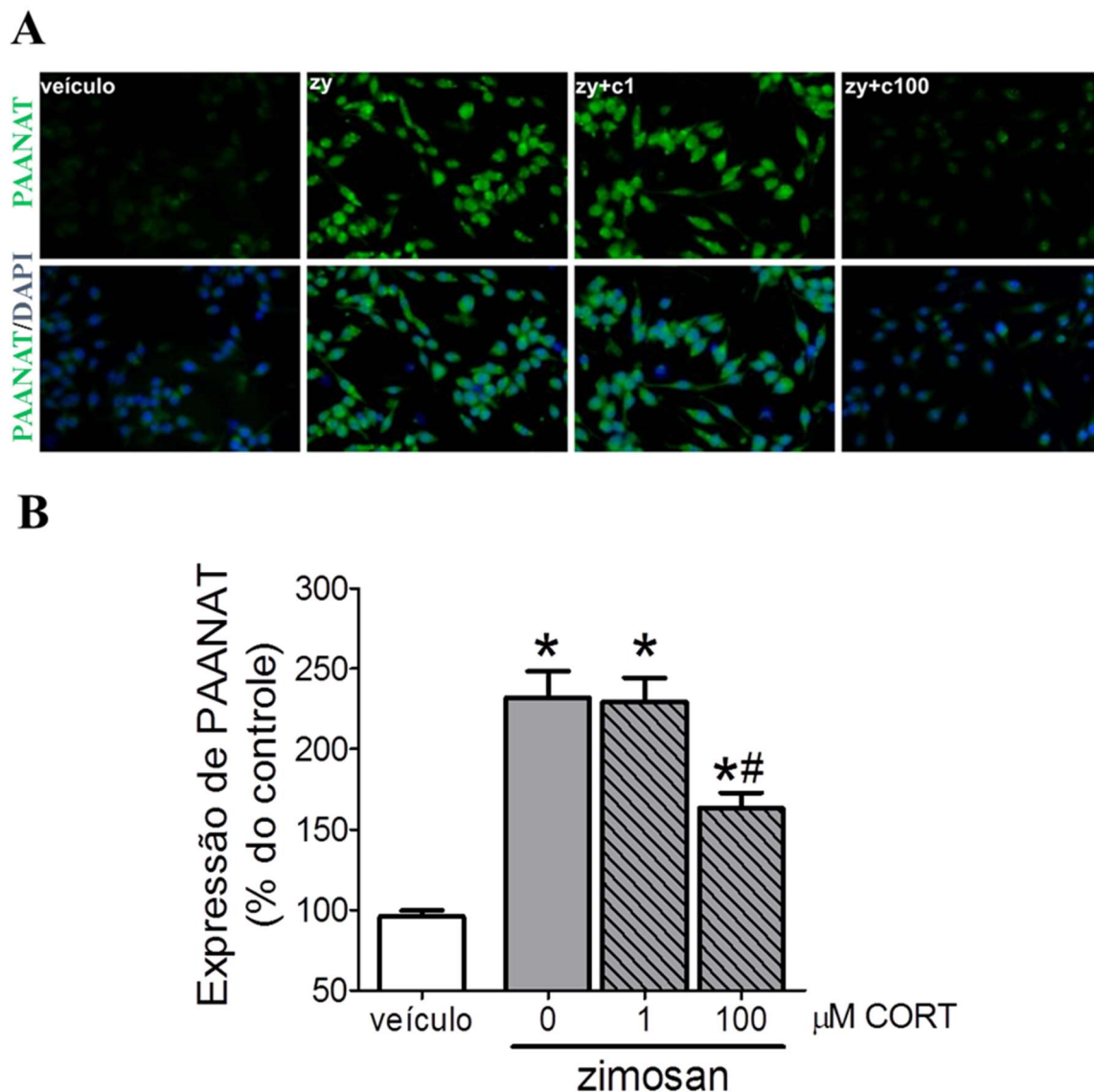
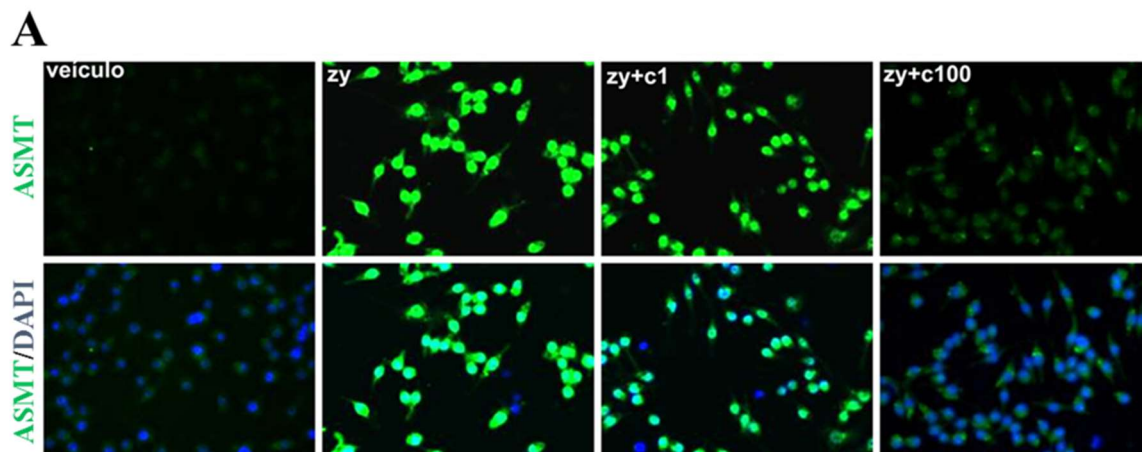


Figura 9. Efeito do zimosan e corticosterona sobre a expressão da enzima PAANAT em macrófagos RAW 264.7. (A)- Análise por imunofluorescência da expressão de PAANAT (marcada com FITC; verde) e do núcleo marcado com DAPI (azul). As células foram pré-incubadas de CORT 1 e 100 μM por 30 min e, posteriormente, com zimosan 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por 3h (ainda na presença da CORT). Grupo veículo (veículo), zimosan (zy), zimosan mais CORT 1 μM (zy+c1) e zimosan mais CORT 100 μM (zy+c100). (B) Quantificação da expressão de PAANAT, células RAW 264.7 tratadas com o veículo (branco), zimosan (cinza), zimosan e CORT 1 e 100 μM (cinza hachurado). Os grupos foram comparados por One-Way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey. Dados foram normalizados pela média do grupo controle e são apresentados como média \pm epm; n = 3-4 por grupo, * significativamente diferente do grupo veículo, # significativamente diferente do grupo zimosan, (p<0,05).



B

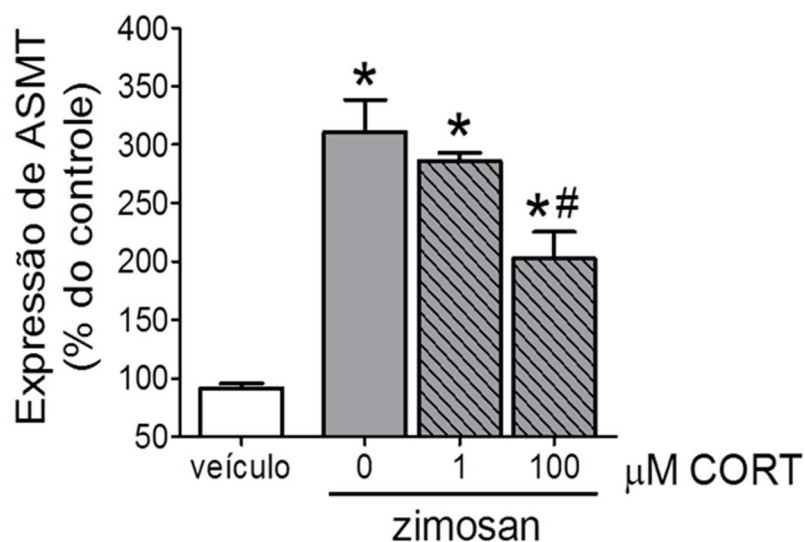


Figura 10. Efeito do zimosan e corticosterona sobre a expressão da enzima ASMT em macrófagos RAW 264.7. (A)- Análise por imunofluorescência da expressão de ASMT (marcada com FITC; verde) e do núcleo marcado com DAPI (azul). As células foram pré-incubadas com CORT 1 e 100 μ M por 30 min e, posteriormente, com zimosan 1 μ g/ml por 3h (ainda na presença da CORT). Grupo veículo (veículo), zimosan (zy), zimosan mais CORT 1 μ M (zy+c1) e, zimosan mais CORT 100 μ M (zy+c100). **(B) -** Quantificação da expressão de PAANAT, células RAW 264.7 tratadas com o veículo (branco), zimosan (cinza), zimosan e CORT 1 e 100 μ M (cinza hachurado). Os grupos foram comparados por One-Way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey. Dados foram normalizados pela média do grupo controle e são apresentados como média \pm epm; n = 3-4 por grupo, * significativamente diferente do grupo veículo, # significativamente diferente do grupo zimosan, (p<0,05).

4.5 Efeitos da corticosterona sobre a Fagocitose em células RAW 264.7

Tendo em vista os resultados obtidos e o fato de que a MEL exógena ou produzida pelos próprios macrófagos aumenta a capacidade fagocítica destas células (Pawlak *et al.*, 2005; Muxel *et al.*, 2012, Pires-Lapa *et al.*, 2013), o tratamento com CORT deveria diminuir a fagocitose de zimosan. Sendo assim, analisamos os efeitos da CORT 1, 10 e 100 μM sobre a fagocitose em macrófagos RAW 264.7.

Ao analisarmos a porcentagem de células que fagocitaram notamos uma tendência de diminuição na porcentagem de células fagocíticas com o tratamento com CORT 10 μM ($p=0.1779$) - (Fig.11 A). Por outro lado, ao analisarmos a quantidade de partículas fagocitadas por estas células, percebemos que o tratamento com CORT nas concentrações de 10 e 100 μM reduziu significativamente a quantidade de células RAW fagocitando 2 ou mais partículas de zimosan em relação ao grupo tratado apenas o veículo da CORT (Fig.11 B). Para observação, mostramos as imagens das células representativas com partículas de zimosan marcadas internalizadas para facilitar a compreensão da análise. Na figura 11 C, onde pode ser visto as células em campo claro, as partículas de zimosan fluorescente e a imagem das células com números diferentes de partículas internalizadas.

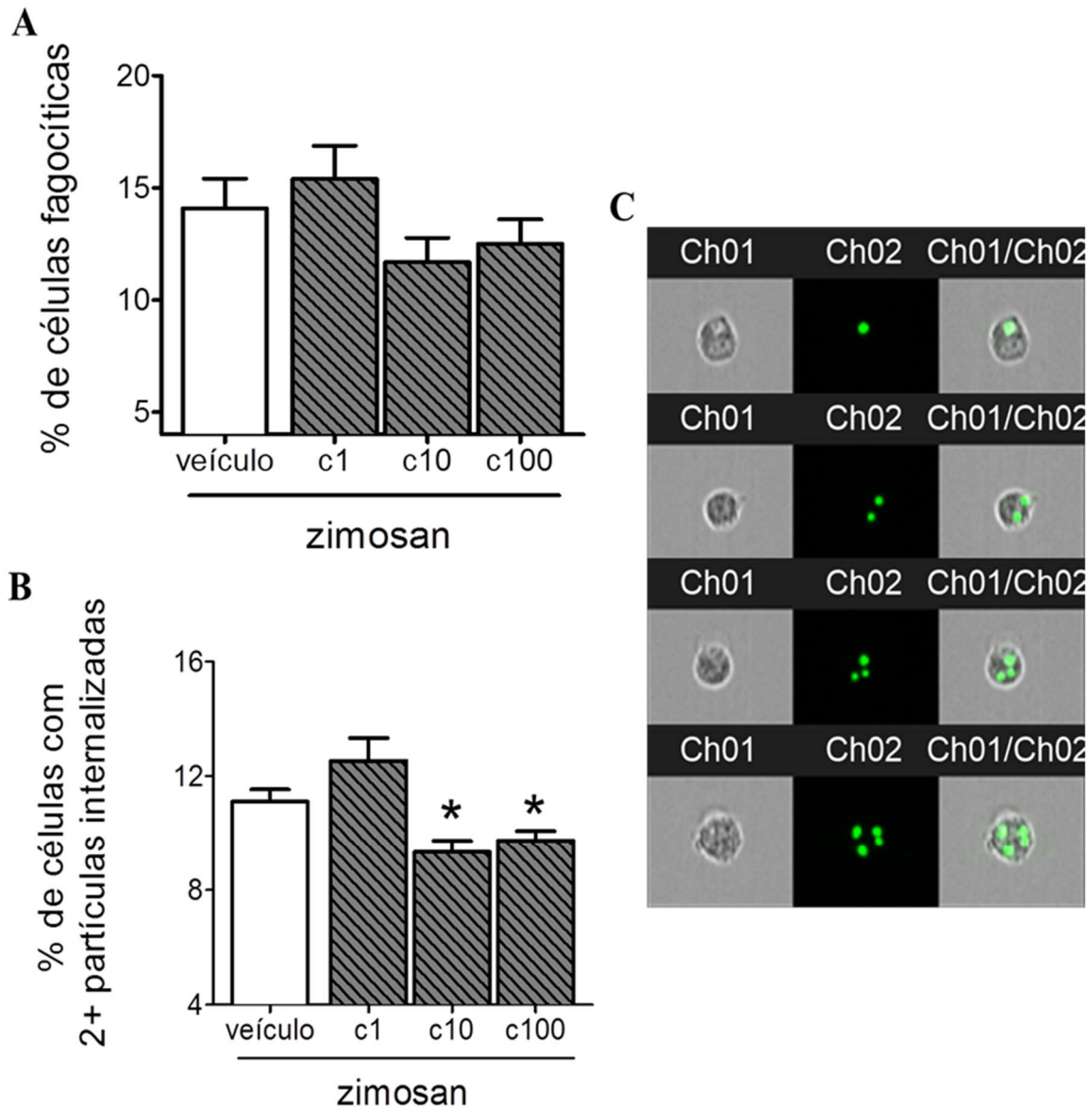


Figura 11. Efeito da corticosterona sobre a atividade fagocítica de macrófagos RAW 264.7. (A) – Porcentagem de células fagocíticas. Células tratadas com zy mais veículo da CORT (veículo-branco), zy mais CORT 1, 10 3 100 μ M (c1, c10 e c100 - cinza hachurado). **(B)** - Análise de 2 ou mais células fagocitadas. Células tratadas com zy mais veículo da CORT (veículo-branco), zy mais CORT 1, 10 e 100 μ M (c1, c10 e c100 - cinza hachurado). **(C)** – Imagem de internalização de partículas, células em campo claro (canal 1/Ch01), partículas internalizadas (canal 2 / Ch02 - verde), células e partículas internalizadas (canais 1 e 2 - Ch01/Ch 02 célula em campo claro e partículas em verde). Para comparação dos grupos foi utilizado One-Way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey. Dados foram normalizados pela média do grupo controle e são apresentados como média \pm epm; n = 3 por grupo, * significativamente diferente do grupo tratado com zimosan e veículo da CORT.

4.6 Papel dos receptores de glicocorticoides no efeito da corticosterona sobre a modulação da expressão das enzimas da via biossintética da melatonina induzida por zimosan

Dando continuidade aos estudos, avaliamos o papel dos receptores de glicocorticoides sobre a inibição significativa induzida pela concentração de 100 μ M de CORT na expressão das enzimas de síntese de melatonina em células incubadas com zimosan. Para tanto utilizamos o antagonista de GR, RU486, utilizado anteriormente.

Curiosamente, o tratamento com RU486 inibiu a expressão da enzima AANAT induzida por zimosan tanto em células RAW tratadas quanto em células não tratadas com CORT 100 μ M (Fig. 12). No caso da PAANAT, o tratamento com RU486 não alterou a redução induzida pela CORT, mas, teve um efeito inibitório *per se* sobre a expressão desta enzima no grupo não tratado com CORT (Fig. 13). Por fim, o tratamento com RU486 resultou em uma diminuição mais pronunciada na expressão da enzima ASMT induzida por zimosan na presença da corticosterona 100 μ M (Fig. 14).

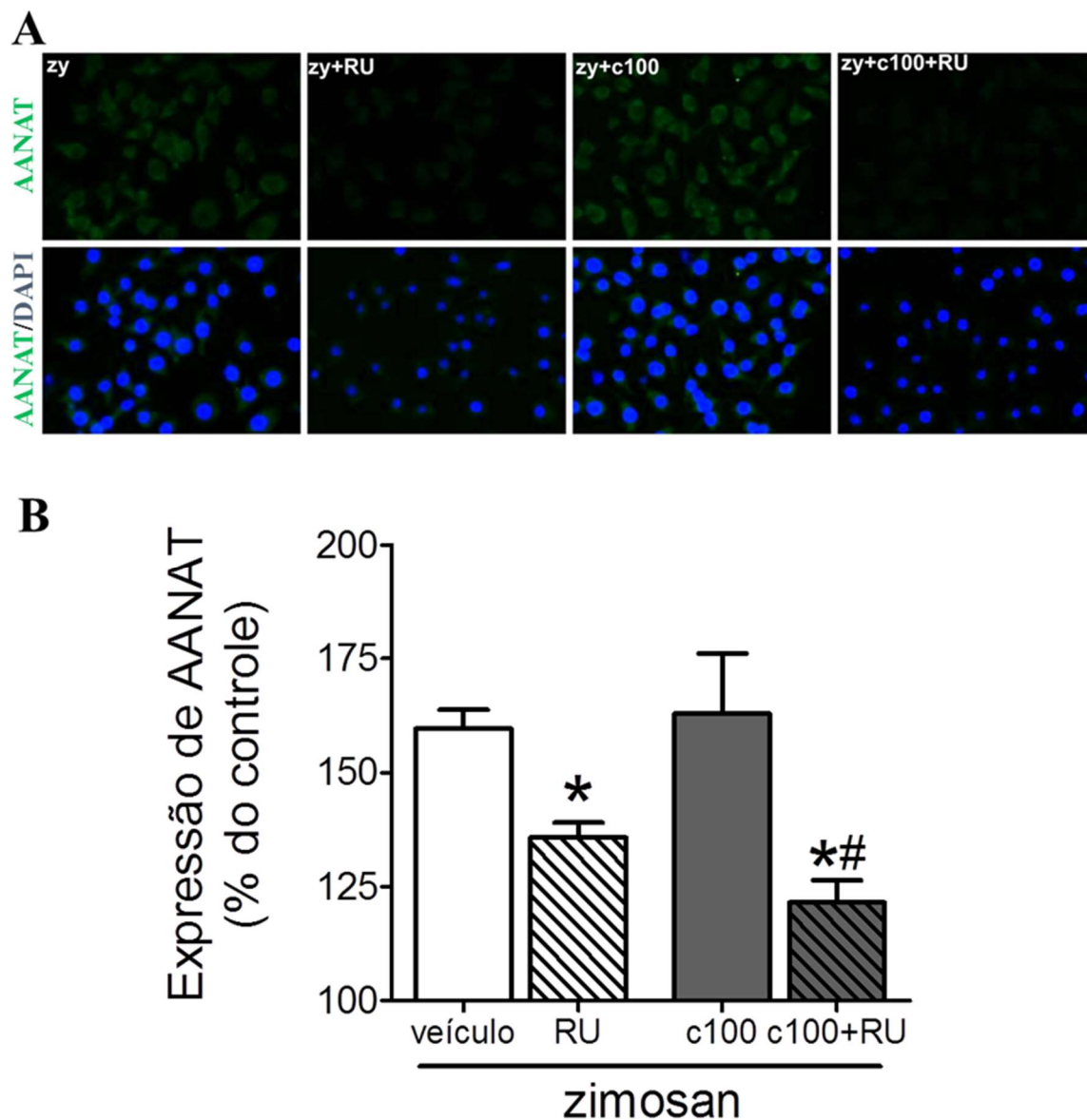


Figura 12. Efeito do antagonista de glicocorticoide mifepristone (RU486) sobre a expressão da enzima AANAT em macrófagos RAW 264.7 estimulados com corticosterona e zimosan. (A) - Análise por imunofluorescência da expressão de AANAT (marcada com FITC; verde) e do núcleo marcado com DAPI (azul). As células foram pré-incubadas com RU 486 (1,0 μ M) por 30 min antes da incubação com CORT nas concentrações de 100 μ M por 1 h e zimosan por 3 h (ainda na presença de RU486). Grupo zimosan (zy), zimosan + RU 486 (zy+RU), zimosan + CORT 100 μ M (zy+c100), zimosan + CORT 100 μ M + RU 486 (zy+c100+RU). **(B)** - Quantificação da expressão de AANAT, células RAW 264.7 tratadas com as doses de CORT 100 μ M + veículo do RU 486 (cinza), CORT 1 e 100 μ M + RU 486 (cinza hachurado). Para comparação dos grupos foi utilizado One-Way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey. Dados foram normalizados pela média do grupo controle e são apresentados como média \pm epm; n = 3-4 por grupo, * P<0,05 vs grupo tratado com zimosan mais veículo, # P<0,05 vs grupo tratado com CORT 100 μ M mais zimosan.

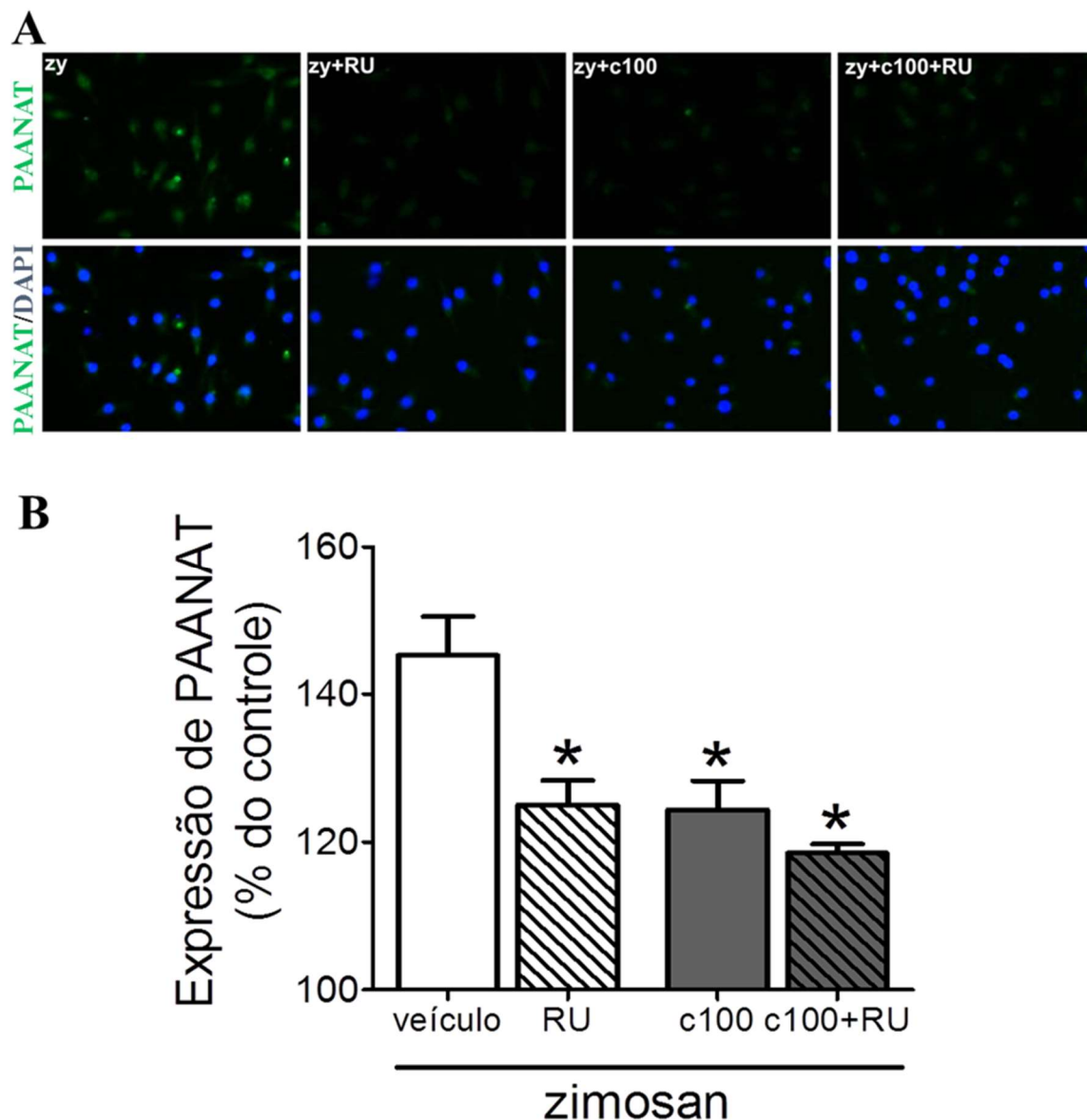


Figura 13. Efeito do antagonista de glicocorticoide mifepristone (RU486) sobre a expressão da enzima PAANAT em macrófagos RAW 264.7 estimulados com corticosterona e zimosan. (A) - Análise por imunofluorescência da expressão de PAANAT (marcada com FITC; verde) e do núcleo marcado com DAPI (azul). As células foram pré-incubadas com RU 486 (1,0 μ M) por 30 min antes da incubação com CORT nas concentrações de 100 μ M por 1 h e zimosan por 3 h (ainda na presença de RU486). Grupo zimosan (zy), zimosan + RU 486 (zy+RU), zimosan + CORT 100 μ M (zy+c100), zimosan + CORT 100 μ M + RU 486 (zy+c100+RU). **(B)** - Quantificação da expressão de PAANAT, células RAW 264.7 tratadas com as doses de CORT 100 μ M + veículo do RU 486 (cinza), CORT 1 e 100 μ M + RU 486 (cinza hachurado). Para comparação dos grupos foi utilizado One-Way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey. Dados foram normalizados pela média do grupo controle e são apresentados como média \pm epm; n = 3-4 por grupo, * P<0,05 vs grupo tratado com zimosan mais veículo, # P<0,05 vs grupo tratado com CORT 100 μ M mais zimosan.

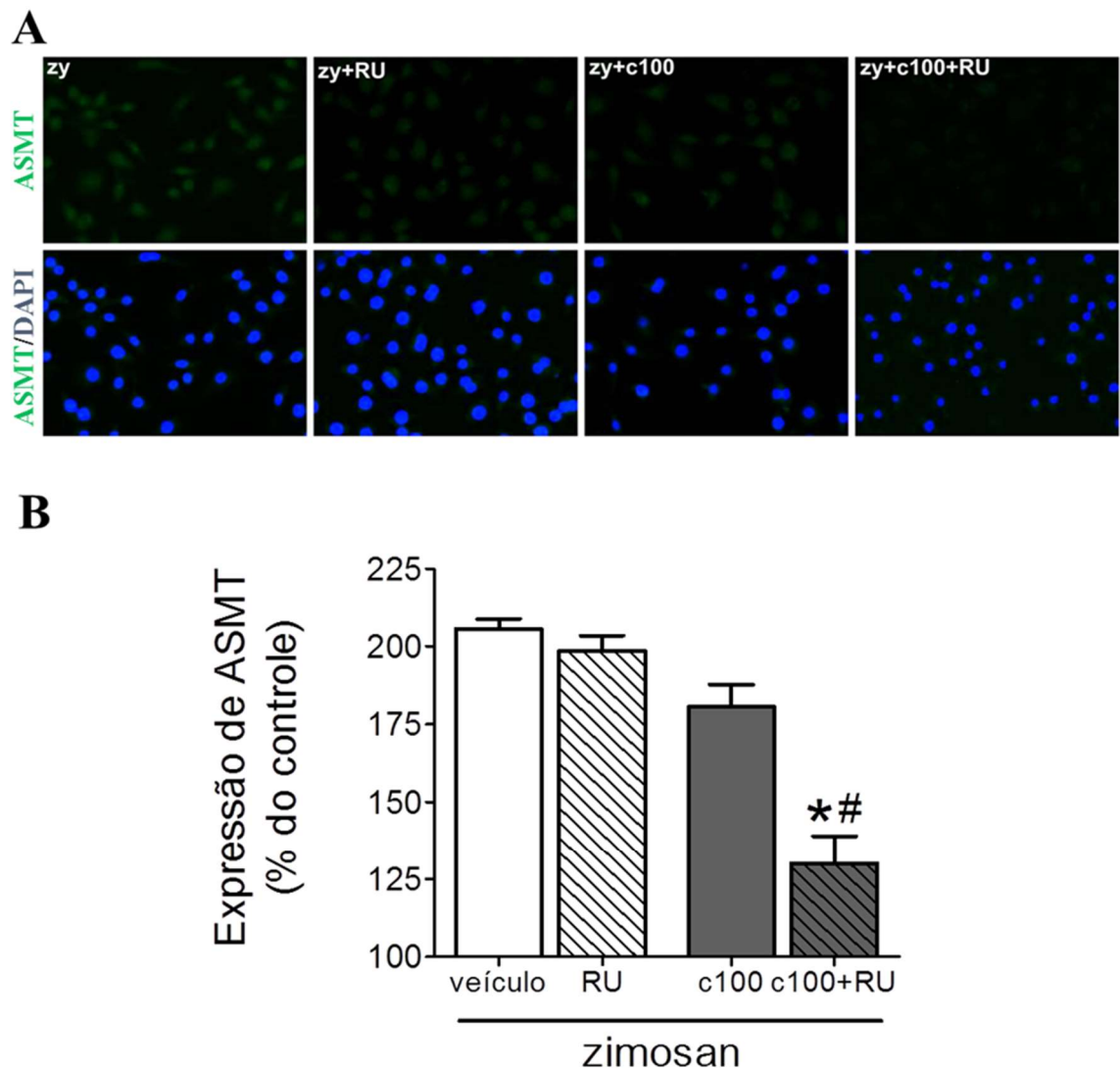


Figura 14. Efeito do antagonista de glicocorticoide mifepristone (RU486) sobre a expressão da enzima ASMT em macrófagos RAW 264.7 estimulados com corticosterona e zimosan. (A) - Análise por imunofluorescência da expressão de ASMT (marcada com FITC; verde) e do núcleo marcado com DAPI (azul). As células foram pré-incubadas com RU 486 (1,0 μ M) por 30 min antes da incubação com CORT nas concentrações de 100 μ M por 1 h e zimosan por 3 h (ainda na presença de RU486). Grupo zimosan (zy), zimosan + RU 486 (zy+RU), zimosan + CORT 100 μ M (zy+c100), zimosan + CORT 100 μ M + RU 486 (zy+c100+RU). **(B)** - Quantificação da expressão de PAANAT, células RAW 264.7 tratadas com as doses de CORT 100 μ M + veículo do RU 486 (cinza), CORT 1 e 100 μ M + RU 486 (cinza hachurado). Para comparação dos grupos foi utilizado One-Way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey. Dados foram normalizados pela média do grupo controle e são apresentados como média \pm epm; n = 3-4 por grupo, * P<0,05 vs grupo tratado com zimosan mais veículo, # P<0,05 vs grupo tratado com CORT 100 μ M mais zimosan.

4.7 Bloqueio de receptores de mineralocorticoides (MR) por Spirolactone (Spiro) em células estimuladas com corticosterona e zimosan

Dado o efeito inesperado obtido com o inibidor de GR e tendo em mente que os glicocorticoides possuem uma afinidade maior por receptores de mineralocorticoide (MR) do que por GR (Reul & De Kloet, 1985) e de que efeitos antagônicos entre GR e MR já foram descritos em outros modelos (Kloet *et al.*, 1998; Atucha *et al.*, 2015; Maubec *et al.*, 2015), testamos os efeitos do antagonista de MR Spirolactone (Spiro, 30 μM), 30 min antes do tratamento com CORT, sobre as células tratadas com zimosan e CORT 100 μM .

O bloqueio dos receptores de MR com Spiro não induziu nenhum efeito sobre a expressão das enzimas AANAT (Fig. 15), PAANAT (Fig. 16) e ASMT (Fig. 17) em células tratadas apenas com zimosan. Por outro lado, em células tratadas com zimosan na presença de CORT 100 μM , o tratamento com Spiro induziu uma inibição significativamente mais pronunciada na expressão de AANAT (Fig. 15), PAANAT (Fig. 16) e ASMT (Fig. 17).

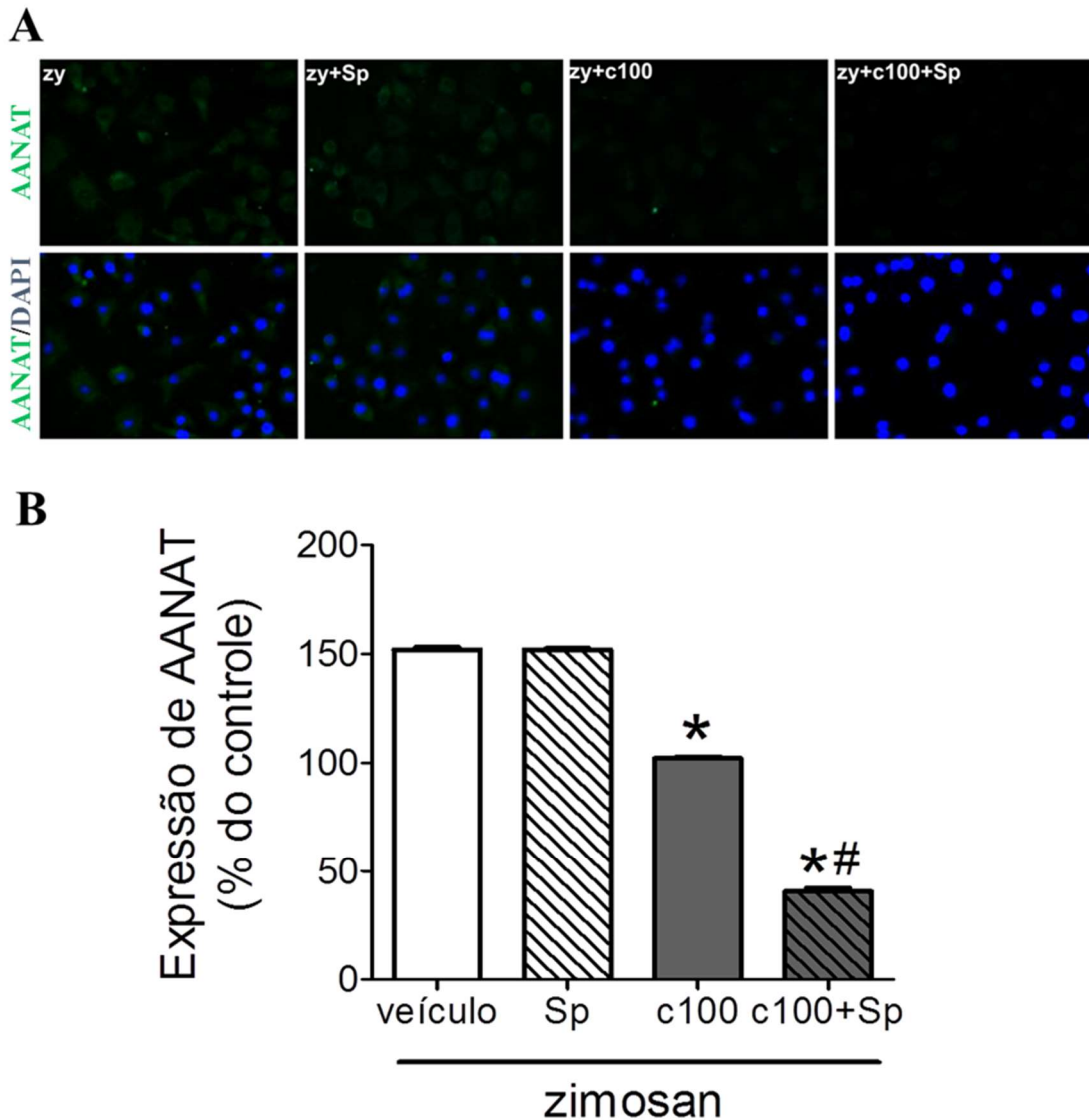


Figura 15. Efeito do antagonista de glicocorticoide Spirolactone (Spiro) sobre a expressão da enzima AANAT em macrófagos RAW 264.7 estimulados com corticosterona e zimosan. (A) - Análise por imunofluorescência da expressão de AANAT (marcada com FITC; verde) e do núcleo marcado com DAPI (azul). As células foram pré-incubadas com Spiro (30 μ M) por 30 min antes da incubação com CORT 100 μ M por 1 h e zimosan por 3 h. Os grupos com estímulo de zimosan (zy), zimosan + Spiro (zy+Sp), zimosan + CORT 100 μ M (zy+c100), zimosan + CORT 100 μ M + Spiro (zy+c100+Sp). **(B)** - Quantificação da expressão de AANAT, células RAW 264.7 tratadas com zimosan + veículos (veículo - branco), zimosan + Spiro (Sp - branco hachurado), zimosan + CORT 100 (c100 - cinza escuro) e zimosan + CORT 100 + Spiro (c100+Sp - cinza escuro hachurado). Para comparação dos grupos foi utilizado One-Way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey. Dados foram normalizados pela média do grupo controle e são apresentados como média \pm epm; n = 4 por grupo, * significativamente diferente do grupo tratado com zimosan com os veículos e # significativamente diferente do grupo tratado com zimosan mais CORT 100 μ M.

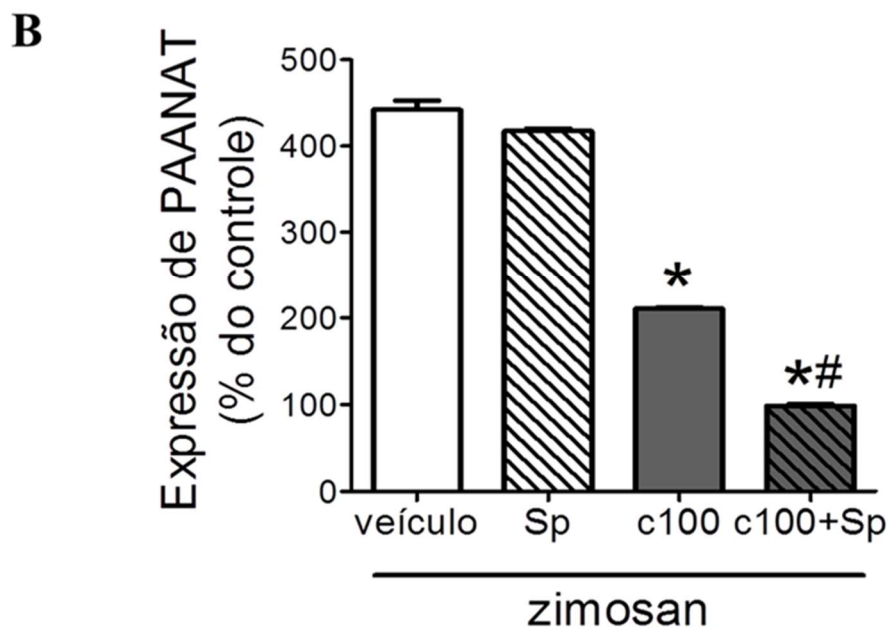
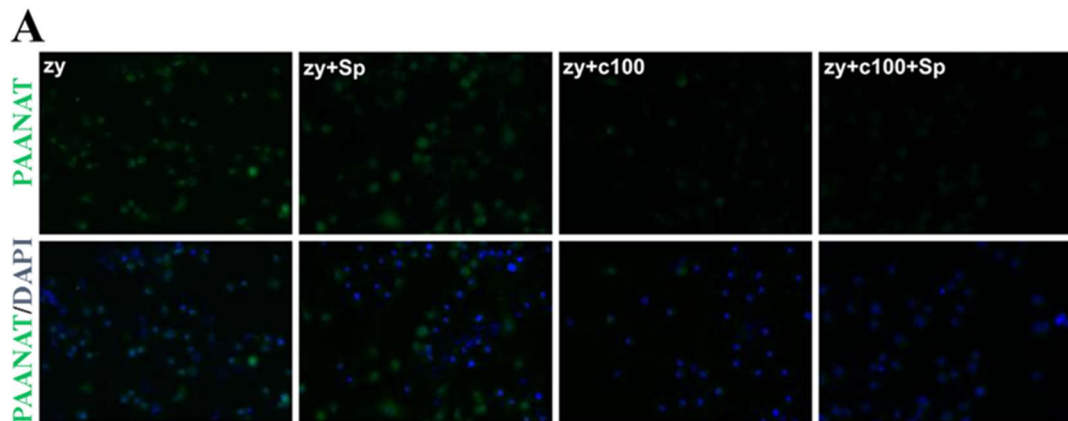


Figura 16. Efeito do antagonista de glicocorticoide Spirolactone (Spiro/Sp) sobre a expressão da enzima PAANAT em macrófagos RAW 264.7 estimulados com corticosterona e zimosan.

(A) - Análise por imunofluorescência da expressão de PAANAT (marcada com FITC; verde) e do núcleo marcado com DAPI (azul). As células foram pré-incubadas com Spiro (30 μ M) por 30 min antes da incubação com CORT 100 μ M por 1 h e zimosan por 3 h. Os grupos com estímulo de zimosan (zy), zimosan + Spiro (zy+Sp), zimosan + CORT 100 μ M (zy+c100), zimosan + CORT 100 μ M + Spiro (zy+c100+Sp). (B) - Quantificação da expressão de PAANAT, células RAW 264.7 tratadas com zimosan + veículos (veículo - branco), zimosan + Spiro (Sp - branco hachurado), zimosan + CORT 100 (c100 - cinza escuro) e zimosan + CORT 100 + Spiro (c100+Sp - cinza escuro hachurado). Para comparação dos grupos foi utilizado One-Way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey. Dados foram normalizados pela média do grupo controle e são apresentados como média \pm epm; n = 4 por grupo, * significativamente diferente do grupo tratado com zimosan com os veículos e # significativamente diferente do grupo tratado com zimosan mais CORT 100 μ M.

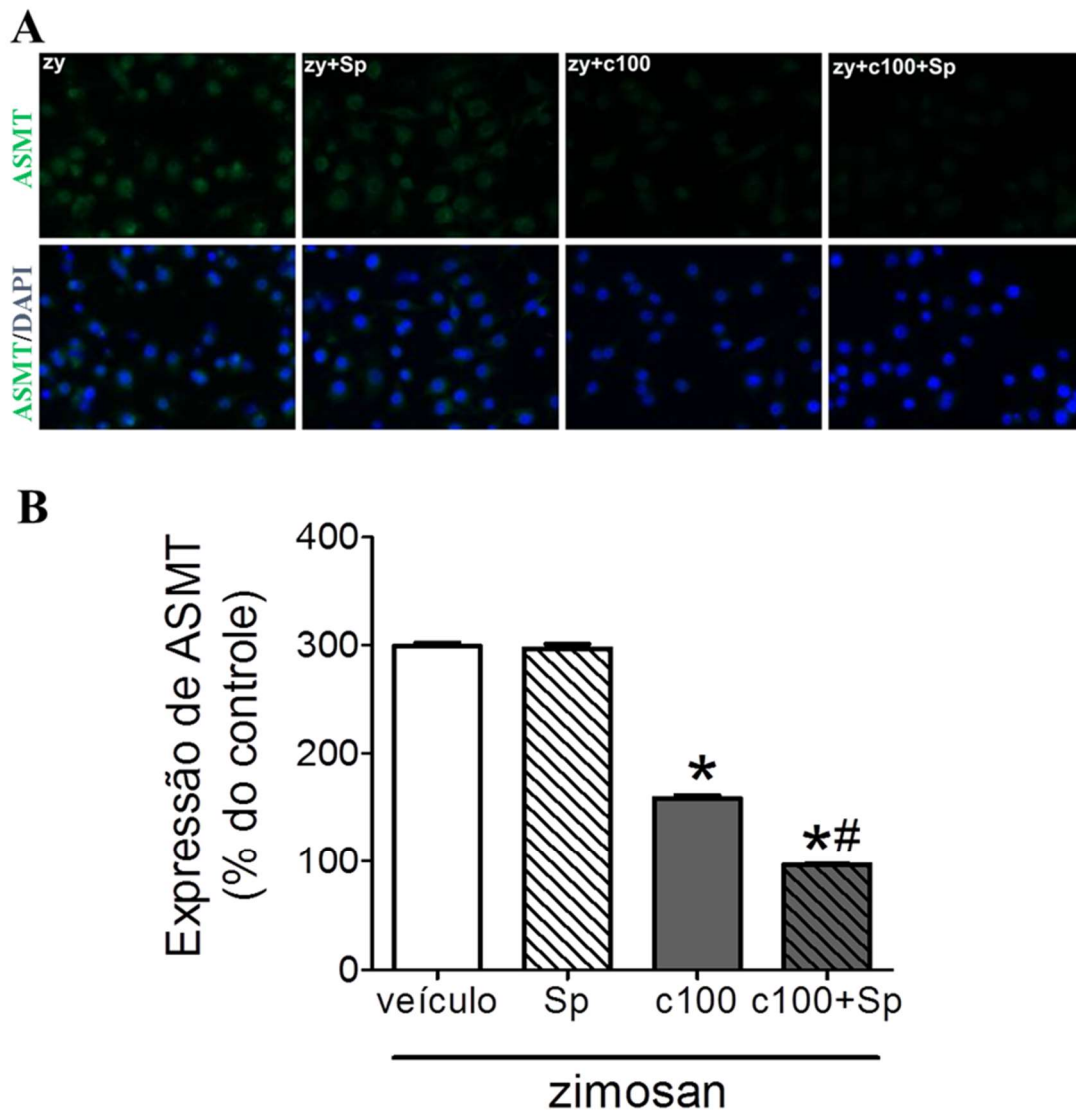


Figura 17. Efeito do antagonista de glicocorticoide Spirolactone (Spiro/Sp) sobre a expressão da enzima ASMT em macrófagos RAW 264.7 estimulados com corticosterona e zimosan. (A) - Análise por imunofluorescência da expressão de ASMT (marcada com FITC; verde) e do núcleo marcado com DAPI (azul). As células foram pré-incubadas com Spiro (30 μ M) por 30 min antes da incubação com CORT 100 μ M por 1 h e zimosan por 3 h. Os grupos com estímulo de zimosan (zy), zimosan + Spiro (zy+Sp), zimosan + CORT 100 μ M (zy+c100), zimosan + CORT 100 μ M + Spiro (zy+c100+Sp). **(B)** - Quantificação da expressão de ASMT, células RAW 264.7 tratadas com zimosan + veículos (veículo - branco), zimosan + Spiro (Sp - branco hachurado), zimosan + CORT 100 (c100 - cinza escuro) e zimosan + CORT 100 + Spiro (c100+Sp - cinza escuro hachurado). Para comparação dos grupos foi utilizado One-Way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey. Dados foram normalizados pela média do grupo controle e são apresentados como média \pm epm; n = 4 por grupo, * significativamente diferente do grupo tratado com zimosan com os veículos e # significativamente diferente do grupo tratado com zimosan mais CORT 100 μ M.

4.8 Papel dos receptores de glicocorticoides no efeito da corticosterona mais zimosan sobre a expressão de NF κ B total e nuclear

Sabendo-se da importância do NF κ B para produção de MEL induzida por zimosan em macrófagos RAW 264.7, e que ao bloquear essa via, há inibição parcial da produção de melatonina induzida por este PAMP (Pires-Lapa *et al* 2013), analisamos se o antagonista RU486 altera o padrão de expressão total e nuclear deste fator de transcrição (subunidade p65) em células tratadas ou não com CORT e incubadas com zimosan.

Nos resultados obtidos, observamos que o bloqueio dos receptores de GR com o antagonista RU486 em células estimuladas com CORT 100 μ M e zimosan, reduziu a intensidade de p65 total (Fig.18A) e nuclear (Fig.18 B-K). Os efeitos do bloqueio de GR são apresentados em histogramas a partir da análise dos dados obtidos por meio da intensidade de p65 nuclear de cada grupo analisado (Fig. 18 C-G) e intensidade de p65 total comparando os dois grupos (Fig.18 H-K), Tomando esses dados em conjunto podemos inferir que o tratamento com RU486 diminui a ativação de p65 induzida por zimosan.

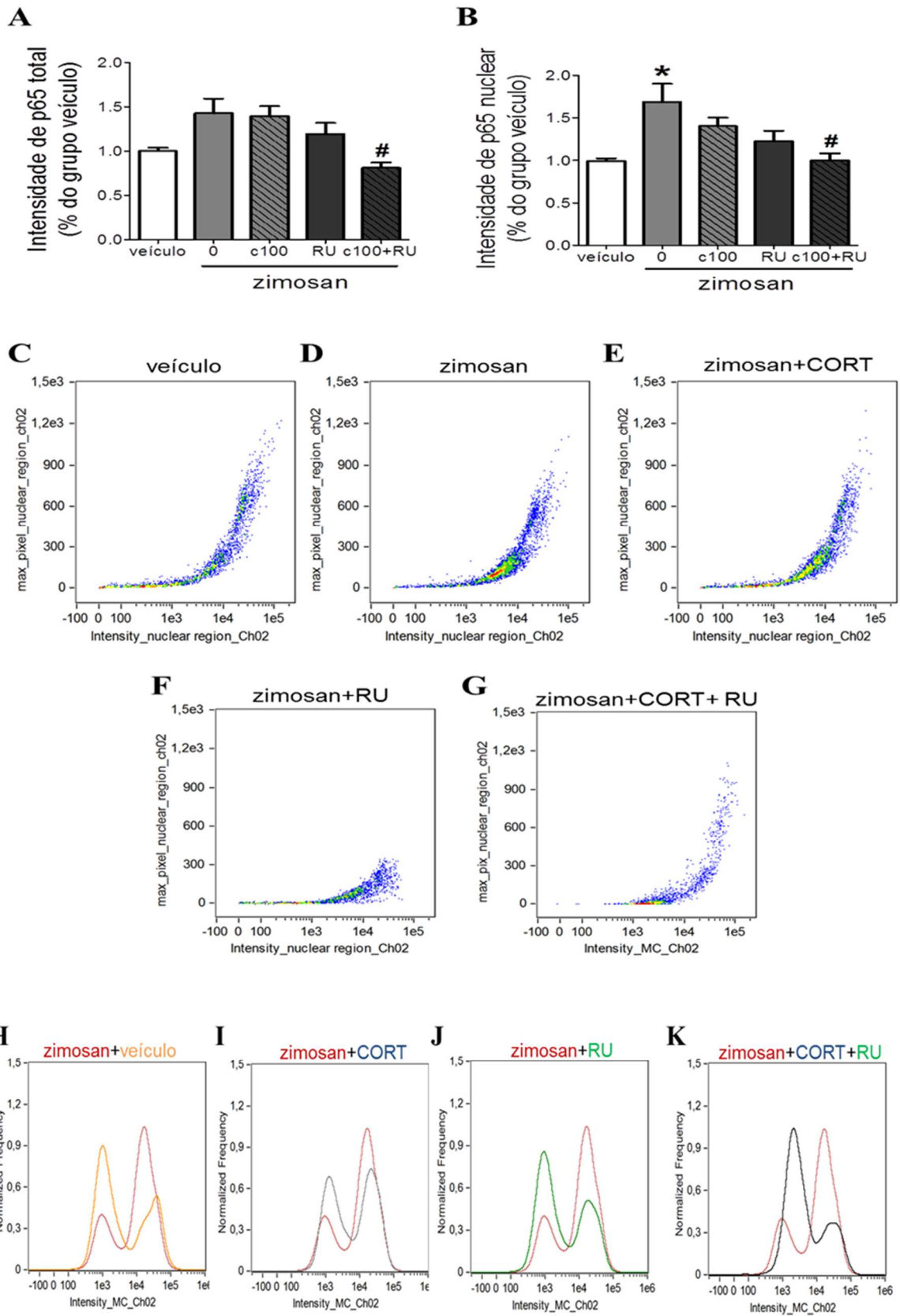


Figura 18. Efeito do antagonista de glicocorticoide mifepristone (RU486) sobre a expressão da subunidade p65 do fator de transcrição NFκB em macrófagos RAW 264.7 estimulados com corticosterona e zimosan. (A) - Quantificação da expressão total e **(B) -** nuclear de p65 em células RAW 264.7 tratadas com apenas o veículo da CORT (branco), tratadas com zy (0-cinza claro), zy mais CORT100 μM (c100-cinza claro hachurado), zy mais RU (RU- cinza escuro), zy mais CORT 100 mais RU (c100+RU- cinza escuro hachurado). **(C-G)** – Histograma representativo da intensidade de p65 nuclear nas células RAW 264.7, cada histograma representa um grupo analisado, sendo eles **(C)**- veículo, **(D)**- zimosan, **(E)**- zy mais CORT 100 μM , **(F)** – zy mais RU486 e **(G)** – zy mais CORT mais RU486. **(H-K)** – Expressão de p65 total comparando dois grupos, H- zy (vermelho) e veículo da CORT (laranja), **(I)** – zy (vermelho) e CORT (azul), **(J)** – zy (vermelho) e RU (verde), **(K)** - zy (vermelho) e zy mais CORT mais RU 486 (preto). As quantificações foram realizadas por citometria de fluxo acoplada a imagem (FlowSight, Merck, Alemanha) e processadas com o auxílio do software INSPIRE (Merck, Alemanha). Para comparação dos grupos foi utilizado One-Way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey. Dados foram normalizados pela média do grupo controle e são apresentados como média ± epm; n = 4 por grupo, * significativamente diferente do grupo tratado com veículo da CORT 100 μM e # significativamente diferente do grupo tratado com zy mais CORT 100 μM.

5. Discussão

No presente trabalho, procuramos investigar os efeitos da corticosterona sobre a produção de melatonina em macrófagos de linhagem RAW 264,7. Nosso estudo mostra que a CORT *per se* aumenta a produção de melatonina nesta linhagem de macrófagos, não altera a produção de melatonina induzida por LPS ou adrenalina e inibe a produção de melatonina induzida por zimosan. Deste modo, demonstramos na presente dissertação que os efeitos da CORT são contextos específicos, ou seja, podemos observar efeitos diferentes sobre a produção de MEL dependendo do tipo de estímulo que está atuando sobre os macrófagos. Como mencionado anteriormente, efeitos duais da CORT já foram demonstrados sobre a produção de melatonina pela glândula pineal de ratos em trabalhos anteriores do nosso grupo. Na pineal, a CORT pode tanto potencializar quanto inibir a produção de MEL induzida por estimulação noradrenérgica, dependendo da concentração de CORT e do perfil da estimulação adrenérgica imposto sobre a glândula. Neste contexto, a CORT potencializa a síntese de MEL pela pineal quando apenas os receptores β adrenérgicos estão estimulados (Ferreira *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2006). Contudo, é observada a inibição da produção de melatonina na presença de CORT quando ambos receptores β_1 e α_1 adrenérgicos são ativados (Fernandes *et al.*, 2017). Além disso, tanto o efeito potencializador quanto o inibidor da CORT são dependentes de GR, pois quando houve o bloqueio desses receptores com RU486 os efeitos potencializadores e inibidores da CORT foram revertidos (Ferreira *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2017).

Os efeitos da CORT (mediados pela ativação de GR) sobre a produção de melatonina pela pineal estão associados com a modulação da transcrição do gene *Aanat* (Fernandes *et al.*, 2006) e com o aumento das atividades das enzimas AANAT e ASMT (Fernandes *et al.*, 2009). Deste modo, no presente trabalho optamos por medir a expressão das enzimas AANAT total e PAANAT (conformação biologicamente ativa) e ASMT para determinar os

efeitos da CORT e, conseqüentemente, da ativação dos receptores GR sobre o sistema melatonérgico dos macrófagos. Nossos resultados demonstraram que a CORT 100 μ M potencializa a síntese de melatonina por estas células. É interessante notar que apesar das concentrações mais baixas de melatonina serem capazes de induzir um aumento na expressão de AANAT e ASMT, a concentração de 100 μ M induz o aumento mais pronunciado na expressão da AANAT fosforilada, ou seja, da enzima biologicamente ativa. Estes dados podem explicar o porquê de apenas esta concentração ser capaz de induzir um aumento na produção de melatonina em macrófagos RAW. Por fim, quando bloqueamos GR com RU486, há a inibição do aumento induzido pela CORT de todas as enzimas envolvidas na via de biossíntese de MEL (AANAT, PAANAT e ASMT).

O tratamento com CORT inibiu a expressão das enzimas AANAT, PAANAT e ASMT em macrófagos incubados com zimosan, demonstrando os efeitos moleculares associados ao efeito inibitório deste glicocorticoide sobre a produção de melatonina induzida por este PAMP. No entanto, quando analisamos os efeitos do bloqueio de GR sobre as células estimuladas com zimosan na presença ou ausência de CORT, constatamos, curiosamente, que o efeito sobre a redução na expressão das enzimas AANAT, PAANAT e ASMT foi mais pronunciado do que o tratamento apenas com CORT. Mais ainda, no caso da expressão de AANAT e PAANAT o tratamento com RU486 foi capaz de inibir o aumento induzido por zimosan na expressão destas enzimas mesmo na ausência de CORT.

Além dos receptores do tipo GR, a CORT também pode se ligar aos receptores do tipo mineralocorticoides (MR). Sabendo-se que os receptores de GR e MR têm um antagonismo mútuo entre si (Krozowski & Funder, 1983; Reul & De Kloet, 1985), e que a afinidade dos glicocorticoides é maior por MR do que por GR, sendo a ativação de GR obtida por concentrações mais elevadas de glicocorticoides (Reul & De Kloet, 1985), resolvemos analisar se a ativação de MR poderia estar influenciando os efeitos da CORT em células

estimuladas com zimosan. O bloqueio dos receptores do tipo MR com Spirolactone (Spiro) resultou em efeito inibitório similar ao observado quando bloqueamos GR na presença de CORT em todas as enzimas da via de síntese de melatonina. Nosso pressuposto é de que ao bloquearmos os receptores do tipo MR, os efeitos derivados da ativação de receptores do tipo GR seriam favorecidos. Avaliados isoladamente, estes dados sugerem a existência de uma modulação antagônica entre os receptores do tipo GR e MR como observado em células da glia (De Kloet & Reul, 1987; Tanaka *et al.*, 1997) e outros modelos celulares (Kloet *et al.*, 1998; Atucha *et al.*, 2015; Maubec *et al.*, 2015). Deste modo, como os efeitos inibidores obtidos com Spiro são similares aos obtidos com o inibidor de GR, RU486, resolvemos investigar outros mecanismos que pudessem explicar os resultados obtidos a partir do bloqueador de GR.

Estudos anteriores do nosso grupo mostram que LPS e zimosan ativam o fator de transição nuclear NF κ B em macrófagos RAW 264.7, que a utilização de bloqueadores desta via inibe a produção de melatonina induzida por zimosan (Pires-Lapa *et al.* 2013) e que zimosan induz nestes macrófagos um aumento das subunidades de NF κ B Rel-c, Rel-A e p50 na forma dos dímeros p50/Rel-A (p65) e p50/c-Rel. (Muxel *et al.*, 2012). Como mencionado anteriormente, o NF κ B é constituído por dímeros que podem conter as subunidades p50, p52, Rel A/p65, Rel B e c-Rel em combinações de homodímeros ou heterodímeros (Hayden & Ghosh, 2008). A ativação funcional da via de NF κ B é dependente do tipo de dímeros que são ativados. As subunidades mencionadas podem ser classificadas em duas classes, as que são positivas para o domínio de transativação TAD (do inglês *transcription activation domain*) que são Rel A/p65, Rel B e c-Rel e as que não possuem esse domínio, sendo elas p50 e p52 (Hayden & Ghosh, 2008). As subunidades que possuem esse domínio de transativação (RelA/p65, Rel B e c-Rel) regulam positivamente a expressão gênica, enquanto que p50 e p52 reprimem a expressão gênica (Meffert & Baltimore, 2005; Hayden & Ghosh,

2008). Na pineal, a ativação de NFκB tem efeito inibitório na produção de melatonina, devido a ativação do homodímero TAD negativo p50/p50, enquanto que em macrófagos a ativação da via de NFκB induz a ativação de heterodímeros que possuem as subunidades TAD positivas p65 e c-Rel (Muxel *et al.*, 2012; Pires-Lapa *et al.*, 2013) e estimulam a produção de melatonina.

Dentre os efeitos imunomodulatórios conhecidos dos glicocorticoides, está a inibição dos genes induzidos pelo NFκB. Muitos estudos têm demonstrado a existência de um antagonismo mútuo entre estes fatores de transcrição (Konig *et al.*, 1992; Ray & Prefontaine, 1994; Gottlicher *et al.*, 1998; Adcock *et al.*, 1999; Smoak & Cidlowski, 2004; Rao *et al.*, 2011). Alguns mecanismos moleculares foram propostos para explicar esse antagonismo mútuo entre NFκB e GR. Uma das primeiras hipóteses foi a de que GR poderia inibir a ação do fator de transcrição NFκB aumentando a síntese da enzima inibitória IκB, promovendo uma maior permanência de NFκB inativo no citoplasma (Scheinman *et al.*, 1995). Porém, este mecanismo requer uma melhor elucidação, uma vez que não há indícios de regiões responsivas a glicocorticoides no promotor do gene IκB. A segunda hipótese, mais atual, explica o antagonismo mútuo entre esses fatores de transcrição por meio da interação proteína/proteína entre GR e NFκB. Alguns estudos demonstram essa interação entre os fatores de transcrição GR e NFκB *in vitro* (Ray & Prefontaine, 1994; Scheinman *et al.*, 1995) e *in vivo* (Adcock *et al.*, 1999). Grande parte dos estudos baseia-se na determinação de cofatores de transcrição responsáveis pela interação entre GR e NFκB. A deleção do domínio conhecido como LBD (*ligand binding domain*) dos receptores para glicocorticoides, por exemplo, diminui a transrepressão sobre o NFκB (Oro *et al.*, 1988). A mutação do domínio RHD (rel homology domain) da subunidade p65 do NFκB inibindo a repressão sobre a ativação gênica induzida por GR (Wissink *et al.*, 1997). Além disso, foi demonstrado que o CBP (CREB binding protein) é capaz de aumentar tanto a repressão do GR sobre NFκB,

quanto à repressão de NFκB sobre a transcrição induzida por GR (Wissink *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 2011).

Apesar de inibir vários dos efeitos genômicos induzidos por GR (Spiga *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012; Suhong *et al.*, 2015) o antagonista RU486 não impede a translocação nuclear de GR (Peeters *et al.*, 2008) e, portanto, é possível que na presença deste ligante o GR continue exercendo efeitos inibitórios sobre a atividade do NFκB. Como dito anteriormente, a linhagem, RAW 264.7 apresenta a capacidade de produzir melatonina após ativação de NFκB com agonistas de TLR4 (LPS) ou TLR2/6 (zy) - (Muxel, *et al.*, 2012). Deste modo, resolvemos avaliar se o efeito observado quando bloqueamos GR em células estimuladas com CORT e zimosan estariam associados a uma inibição da via do NFκB. Neste sentido, ao analisarmos a expressão celular e nuclear da subunidade TAD positiva p65 constatamos que, em células incubadas com CORT mais zimosan o tratamento com RU486 induziu uma redução na expressão de p65 total e nuclear em comparação ao grupo tratado apenas com zimosan. Deste modo, hipotetizamos que GR e NFκB estão sendo antagonizados mutuamente e que o aparente efeito contraditório do RU486 possa estar associado à inibição sobre esta via. Estudos que comprovem a associação entre o NFκB e o GR translocado após incubação com RU486 são necessários para a confirmação desta hipótese.

A fagocitose é um mecanismo essencial para o processo de defesa do organismo, sendo as células dendríticas, os neutrófilos e os macrófagos as principais células da resposta imune inata que desempenham tal função, além de mediar diversas outras funções no desenvolvimento de processos de defesa (Mosser *et al.*, 2008). A produção de melatonina induzida por zimosan em macrófagos aumenta a capacidade fagocítica destas células (Pires-Lapa *et al.*, 2013). Considerando o papel da melatonina sobre a fagocitose, no qual a melatonina potencializa o processo fagocítico em macrófagos (Pawlak *et al.*, 2005; Muxel *et al.*, 2012, Pires-Lapa *et al.*, 2013), nossos dados indicam que parte do papel

imunomodulatório da ativação de GR pela CORT esteja relacionado com a modulação negativa da produção de melatonina e, conseqüentemente, da fagocitose de macrófagos. O papel da CORT modulando a fagocitose em macrófagos já foi demonstrado em macrófagos peritoneais de rato (Zhong *et al.*, 2013), contudo nenhum trabalho associou este efeito com a inibição da produção de melatonina por estas células. Deste modo, estudos posteriores que visem entender os efeitos dos glicocorticoides sobre a produção de MEL em células imunocompetentes é fundamental para um melhor entendimento da dinâmica funcional imunoendócrina, durante o desenvolvimento apropriado de respostas de defesa contra agentes agressores.

Em suma, nosso trabalho proporciona um melhor entendimento sobre o Eixo Imune-Pineal, em um contexto onde há a modulação de glicocorticoides sobre a produção de MEL em células imunes. No caso, a corticosterona se ligará ao seu receptor, translocando-se para o núcleo, onde se ligará a região responsiva a glicocorticoides (GRE), promovendo o aumento da transcrição dos genes de *Aanat* e *Asmt*, que aumentará a produção das enzimas AANAT, PAANAT, ASMT e, conseqüentemente, a produção de MEL (Fig.19 A). Por outro lado, quando há o estímulo por zimosan, haverá a ativação da via de NFκB, que será translocado até as regiões responsivas a NFκB, promovendo, dentre outros efeitos, o aumento da transcrição dos genes *Aanat* e *Asmt*, no aumento na produção das enzimas AANAT, PAANAT, ASMT e, conseqüentemente, da produção de MEL por estas células (Fig.19 B). Ao estimularmos as células com corticosterona frente a um desafio imunológico, no caso zimosan, a corticosterona em altas concentrações se ligará aos receptores de GR que serão translocados até o núcleo, promovendo um antagonismo sobre a ação de MR e NFκB. Desse modo, haverá a redução da transcrição dos genes de *Aanat* e *Asmt* e, conseqüentemente, na expressão das enzimas AANAT, PAANAT, ASMT e, presumivelmente de MEL (Fig.19 C).

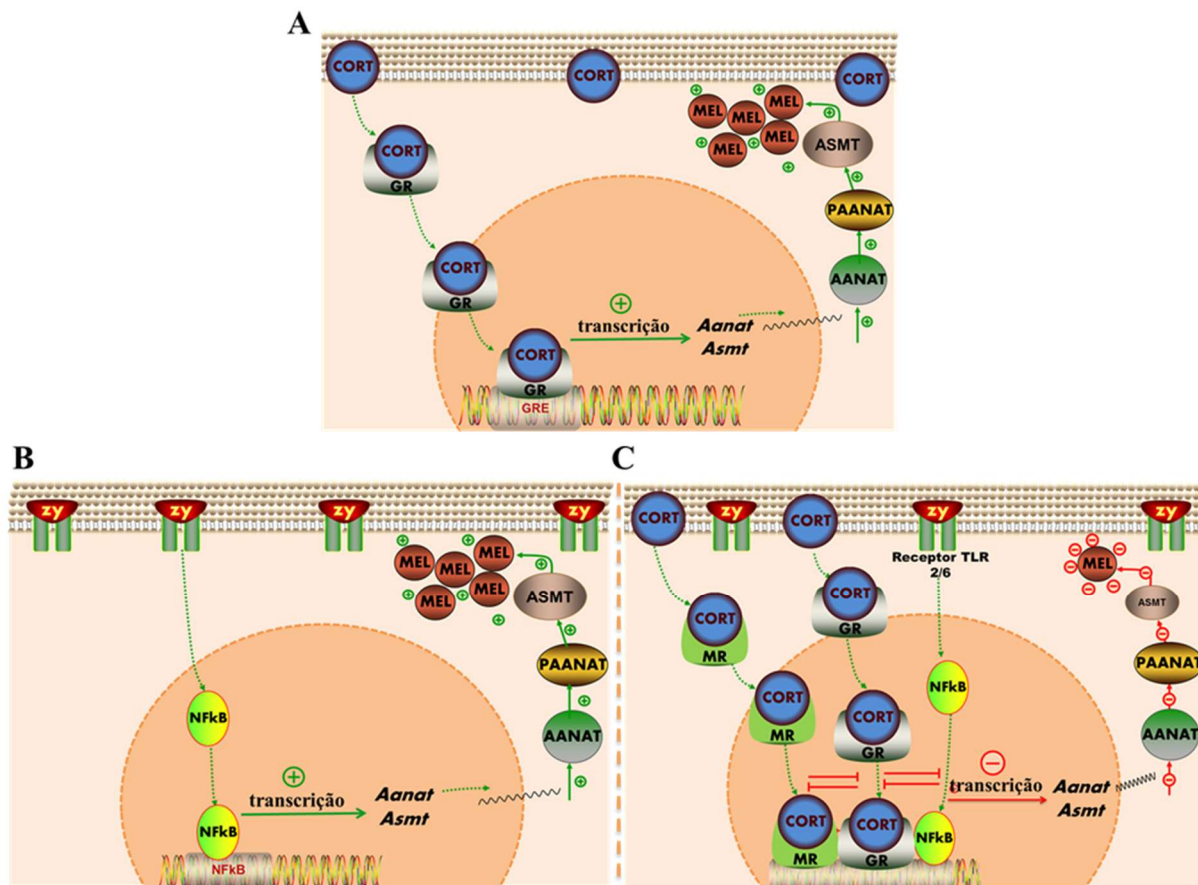


Figura 19. Produção de melatonina por macrófagos RAW 264.7 em diferentes padrões de estímulo. (A) – Corticosterona (CORT) agindo via receptores de glicocorticoides (GR) se liga a região responsiva a glicocorticoides (GRE), aumenta a expressão das enzimas chaves da via biossintética da melatonina (MEL) AANAT (PAANAT) e ASMT e, conseqüentemente, a produção de melatonina. **(B)** – Zimosan (zy) via ativação de receptores do tipo Toll (TLR2/TLR4) aumenta a produção de melatonina por uma via dependente do fator de transcrição nuclear kB (NFκB). **(C)** - Antagonismo entre receptores de glicocorticoides (GR) e mineralocorticoide (MR), antagonismo entre GR e o fator de transcrição NFκB diminuindo a transcrição das enzimas chaves da via biossintética da melatonina e, conseqüentemente, a produção desse hormônio em células estimuladas com zimosan.

A utilização de corticoides sintéticos é amplamente utilizada no combate de diferentes quadros patológicos. Os dados do nosso grupo de pesquisa mostram que altas concentrações de CORT podem modular a produção de melatonina pela pineal e, como demonstrado na presente dissertação, podem reduzir a produção de MEL e a fagocitose desencadeada por esta produção em macrófagos. Neste sentido, processos de estresse crônicos ou o tratamento continuado com glicocorticoides exógenos podem, por meio da modulação da produção de melatonina, induzir uma menor capacidade de monitoramento e defesa contra agentes patogênicos. Portanto, novos estudos que avaliem interações hormonais na funcionalidade de células de defesa podem embasar propostas que visem ajustes terapêuticos que resultem em grande eficácia e baixo índice de efeitos colaterais indesejados.

6. Conclusões

O presente trabalho nos permite concluir que:

1. A corticosterona possui um efeito dual na produção de MEL por macrófagos RAW 264.7, efeito este, dependente do estímulo no qual essas células foram submetidas. Tanto corticosterona quanto zimosan aumentam a produção de MEL, mas incubados concomitantemente, reduzem a produção desse hormônio.
2. A produção de MEL via estimulação com corticosterona e corticosterona mais zimosan é dependente da ativação de GR e MR, e que o bloqueio de GR em células estimuladas com CORT mais zimosan leva a redução na expressão da subunidade p65 de NFκB nuclear e total.
3. A corticosterona reduz a fagocitose em macrófagos de linhagem RAW 264.7.

7.Referências Bibliográficas

ADEREM, A.; UNDERHILL, D.M. **Mechanisms of phagocytosis in macrophages.** *Annu Rev Immunol* , v. 17, p.593-623, 1999.

ADCOCK, I.M.; NASUHARA, Y.; STEVENS, D.A. & BARNES, P.J. **Ligand - induced differentiation of glucocorticoid receptor (GR) trans-repression and transactivation: preferential targetting of NF-kappaB and lack of I-kappaB involvement.** *Br J Pharmacol*, v.127, p. 1003-1011, 1999.

AKIRA, S.; TAKEDA K. **Toll-like receptor signalling.** *Nat Rev Immunol* 2, v. 4, p.499-511, 2004.

AMINOFF, M.J. **Brown-Séquard and his syndrome.** *J Hist Neurosci*, v.5, p.14-20, 1996.

ATUCHA, E.; ZALACHORAS, I.VAN DEN HEUVEL, J.K.; VAN WEERT, L.T.; MELCHERS,D.; MOL, I.M.; BELANOFF, J.K.; HOUTMAN, R.; HUNT, H.; ROOZENDALL, B.; MEIJER, O.C.**A mixed glucocorticoid/mineralocorticoid selective modulator with dominant antagonism in the male rat brain.** *Endocrinology*, v.156,p. 4105-41014, 2015.

AXEROLD, J. & WEISSBACH, H. **Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin.** *Science*, v.131, p. 1312, 1960

BAVARESCO, I.; BERNARDI, A.; BASTTASTINI, A. M. O. **Glicocorticóides: usos clássicos e emprego no tratamento do câncer.** *Infarma*, v. 17, n. 7/9, p. 58-60, 2005.

BERTRAND, P.P; POLGLAZE, K.E; BERTRAND, R.L; SANDOW, S.L, POZO, M.J. **Detection of melatonin production from the intestinal epithelium using electrochemical methods.** *Curr Pharm Des*, v. 20 (30), p. 4802-4806, 2014.

BLEDSON, R.K.; MONTANA, V.G.; STANLEY, T.B.; DELVES, C.J.; APOLITO, C.J.; MCKEE, D.D. **Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition.** *Cell*, v. 110, p.93-105, 2002.

BROWN GD, TAYLOR PR, REID D.M.; WILLMENT, J.A.; WILLIAMS, D.L.; MARTINEZ-POMARES, L.; WONG, S.Y.; GORDON,S. **Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages.** *J Exp Med*, v.196, p.407-412, 2002.

BUBENIK G.A; BROWN G.M; UHLIR I; GROTA L.J. **Immunohistological localization of N-acetylmethylphenethylamines in pineal gland, retina and cerebellum.** *Brain Res*, v. 81, p. 233–242, 1974.

BUBENIK G.A; BROWN G.M; GROTA L.J. **Immunohistological localization of melatonin in the rat digestive system.** *Experientia*, v. 33, p.662–663, 1978.

BUBENIK G.A. **Localization of melatonin in the digestive tract of the rat. Effect of maturation, diurnal variation, melatonin treatment and pinealectomy.** *Horm Res*, v. 12, p.313–323, 1980.

BUBENIK G.A. **Gastrointestinal melatonin location, function and clinical relevance.** *Dig Dis Sci*, v.47, p.2336-2348, 2002.

BUBENIK G.A. **Thirty-four years since the discovery of gastrointestinal melatonin.** *J. Physiol Pharmacol*, v. 59, p. 33-51, 2008.

CARDINALI D.P. & ROSNER J.M. **Retinal localization of the hydroxyindole-O-methyl transferase (HIOMT) in the rat.** *Endocrinology* , v.89, p. 301–303, 1971.

CARATTI, G.; MATTHEWS, L.; POOLMAN, T.; KERSHAW, S.; BAXTER, M.; RAY, D. **Glucocorticoid receptor function in health and disease.** *Clin Endocrinol*, v. 83, p. 441-448, 2015.

CARRILO-VICO, A.; LARDONE, P.; FERNÁNDEZ-SANTOS, J.M.; MARTÍN-LACAVE, I.; CALVO, J.R.; KARASEK, M.; GUERRERO, J.M. **Human lymphocyte-synthesized melatonin is involved in the regulation of the interleukin-2/interleukin-2 receptor system.** *J Clin Endocrinol Metab*, v.90, p. 992-1000, 2004.

CARRILLO-VICO A.; GUERRERO, J.M.; LARDONE, P.; REITER, R.J. **A review of the multiple actions of melatonin on the immune system.** *Endocrine*, v.27, p.189–200, 2005.

CARRILO-VICO, A.; REITER, R.J.; LARDONE, P.J.; HERREIRA, J.L.; FERNÁNDEZ-MONTESINOS, R.; GUERRERO, J.M ; POZO, D. **The modulatory role of melatonina on imune responsiveness,** *Curr Opin Investig Drugs*, v. 7, p. 423-431.2006.

CHECKLEY, S. **The neuroendocrinology of depression and chronic stress.** *Br Med Bull*.v.52(3), p.597-617, 1996.

CHEN, C.Q.; FICHNA. J.; BASHASHATI, M.; LI, Y.Y.; STORR, M. **Distribution, function and physiological role of melatonin in the lower gut,** *J Gastroenterol*, v. 34, p.3888-3898, 2011.

CHEN,Y.; WANG,Y.; ZHUANG Y.; ZHOU, F.; HUANG L. **Mifepristone increases the cytotoxicity of uterine natural killer cells by acting as a glucocorticoid antagonist via ERK activation.** *Plos One* , v. 7, e- 36413, p. 1-10, 2012.

CRESPO, E.G. & VIEGAS, E.G. **Evolução do complexo pineal dos vertebrados.** *Col Nat, Nova Série*, v. 16, p.5-86, 1991.

COOPER, R.A. E. **The human pineal gland and pineal cysts.** *J Anat*, v.67, p. 28-46, 1932.

DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.; CARVALHO-SOUZA, C.E.; TAMURA, E.K.; PINATO, L.; CECON, E.; FERNANDES, P.A.; DE AVELLAR, M.C.; FERREIRA,

Z.S.; MARKUS, R.P. **TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFκB pathway.** *J pineal Res*, v. 49, p. 182-192, 2010.

DESCARTES, R. **As paixões da alma. In os pensadores.** Ed. Civita, Abril Cult e Indust, v. 15, p. 238, 1973.

DE KLOET, E.R.; REUL, J.M. **Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: a concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems.** *Psychoneuroendocrinology*, v. 12, p. 83-105, 1987.

ERWIG, L. P. & HENSON, P. M. **Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis.** *Am. J. Pathol*, v.171, p. 2–8, 2007.

FÁLCON, J. **Cellular circadian clocks in the pineal.** *Prog Neurobiol*, v.58, p.121-162, 1999.

FERNANDES, P.A.C.M.; CECON, E.; MARKUS, R.P.; FERREIRA, Z.S. **Effect of TNF-alpha on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a 'feedback' of the immune response on circadian timing.** *J Pineal Res*, v. 41, p. 344-350.2006.

FERNANDES, P.A.C.M. **Regulação da produção hormonal da glândula pineal de ratos por moduladores do processo inflamatório.** Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2009.

FERREIRA, Z.S.; FERNANDES, P.A.;DUMA, D.; ASSREUY, J.; AVELLAS, M.C.; MARKUS,R.P. **Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonina synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B.** *J Pineal Res*, v.38, p.182-188.2005.

FISHER, S.P.; FOSTER, R.G.; PEIRSON, S.N. **The circadian control of sleep.** *Handb Exp Pharmacol*, v. 217, p.157-183, 2013.

GERBER, J. S. & MOSSER, D. M. **Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fcγ receptors.** *J. Immunol*, v.166, p. 6861–6868, 2001.

GHOSH, S.; MAY, M.J.; KOPP, E.B. **NFκB and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses.** *Annu. Rev. Immunol*, v. 16, p. 225–260, 1998.

GOMEZ-CORVERA, A.; CERRILLO, I.; MOLINERO, P. **Evidence of immune system melatonin production by two pineal melatonin deficient mice, C57BL/6 and Swiss strains.** *J Pineal Res*, v.47, p. 15-22, 2009.

GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica.** Rio de Janeiro: *Mc Graw Hill*, v. 10, p. 422- 424, 2003.

GOTTLICHER, M.; HECK, S.; HERRLICH, P. **Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action.** *J Mol Med*, v.76, p. 480–489, 1998.

GUYTON, A.C.; Hall, J. E. **Tratado de fisiologia médica,** Guanabara Koogan, v.11, p.944-960, 2006.

HACK, C.E.; AARDEN, L.A.; THIJIS, L.G. **Role of cytokines in sepsis.** *Adv Immunol*, v. 66, p. 101-195, 1997.

HASKO, G.; PACHER, P.; DEITCH, E. A. & VIZI, E. S. **Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors.** *Pharmacol. Ther*, v. 113, p. 264–275, 2007.

HAYDEN, M.S. & GHOSH, S. **Shared principles in NF-KappaB signaling.** *Cell*, v.132, p. 344-362, 2008.

HUANG, H.; WANG, Z.; WENG, S.J.; SUN, X.H.; YANG, X.L. **Neuromodulatory role of melatonina in retinal information processing.** *Prog Retin Eye Res*, v. 32, p. 64-87, 2012.

KARSTEN, C.M.; KOHL, J. **The immunoglobulin, IgG Fc receptor and complement triangle in autoimmune diseases.** *Immunobiology*, v. 217, p.1067-1079, 2012.

KLEIN D.C. & WELLER, J.L. **Rapid light-induced decrease in pineal serotonin N - acetyltransferase activity.** *Science*, V.177, p.532-533, 1972.

KLEIN D.C. **Circadian rhythms in the pineal gland.** In: Krieger, D.T. ed. **Endocrine rhythms**, New York, *Raven Press*, p. 203-224, 1979.

KLEIN, D.C. **Photoneural regulation of the mammalian pineal gland.** *Ciba Found Symp*, v. 117, p. 38-56, 1985.

KONIG, H.; PONTA, H. RAHMSDORF, H.J.; HERRLICH, P. **Interference between pathway-specific transcription factors: glucocorticoids antagonize phorbol ester-induced AP-1 activity without altering AP-1 site occupation in vivo.** *EMBO J*, v. 11, p. 2241–2246, 1992.

KONTUREK, S.J.; KONTUREK, P.C.; BRZOZOWSKI, T. **Melatonin in gastroprotection against stress-induced acute gastric lesions and in healing of chronic gastric ulcers.** *J Physiol Pharmacol*, v. 57, p. 51-66, 2006.

KROZOWSKI, Z.S. & FUNDER, J.W. **Renal mineralocorticoid receptors and hippocampal corticosterone-binding species have identical intrinsic steroid specificity.** *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 80, p. 6056-6060, 1983.

KUMAR, R. & THOMPSON, E.B. **Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure, function relationship.** *J Steroid Biochem Mol Biol*. V. 94, p. 383-394, 2005.

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

LERNER, A.B, CASE, J.D, TAKAHASHI, D. **Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes.** *J Am Chem Soc*, v.80, p. 2057-2058, 1958.

MACCHI, M.M.; BRUCE, J.N. **Human pineal physiology and functional significance of melatonin.** *Front Neuroendocrinology*, v.25 (3-4), p. 95-177, 2004.

LOKE, P.; GALLAGHER, I.; NAIR, M.G.; ZANG, X.; BROMBACHER, F.; MOHRS, M.; ALLISON, J.P.; ALLEN, J.E. **Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4+ T cells to be sustained during chronic infection.** *J Immunol*, v.179, p. 3926–3936, 2007.

LOPES, C.; DELYRA, J.L.; MARKUS, R.P. & MARIANO, M. **Circadian rhythm in experimental chronic inflammation is modulated by melatonin.** *J Pineal Res*, v.23, p.72-78, 1997.

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

LOTUFO, C.M.; LOPES,C.; DUBOCOVICH,M.L.; FARSKY.S.H.; MARKUS, R.P. **Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation.** *Eur J Pharmacol*, v.430, p.351-357, 2001.

LOVENBERG, W.; JEQUIER, E. & SJOERDSMA, A. **Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor.** *Science*, v.155, p. 217-219, 1967.

MACKANESS, G. B. **Cellular immunity and the parasite.** *Adv. Exp. Med. Biol*, v. 93, p.65–73, 1977.

MAITRA, S.K.; HASAN, K.N. **The role of melatonina as a hormone and na antioxidante in the control of fish reproduction.** *Front Endocrinol (Lausanne)*, v. 4, p. 7-38, 2016.

MALDONADO, M.D.; GARCIA-MORENO, H.; CALVO, J.R. **Melatonin protects mast cells against cytotoxicity mediated by chemical stimuli PMACI: possible clinical use.** *J Neuroimmunol*, v. 262, p. 62-65, 2013.

MARKUS, R. P.; CECON, E. **O tempo biológico e a defesa do organismo: uma conversa bidirecional entre a glândula pineal e o sistema imunológico.** *Cienc. Cult. [online]*, v.65, n.1, p. 52-55. ISSN 0009-6725, 2013.

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

MARTINEZ, F. O.; SICA, A.; MANTOVANI, A. & LOCATI, M. **Macrophage activation and polarization.** *Front. Biosci*, v.13, p. 453–461, 2008.

MARTINS, E. JR.; FERREIRA, A.C.; SKORUPA, A.L.; AFECHÉ, S.C.; CIPOLLA NETO, J.; COSTA ROSA, L.F. **Tryptophan consumption and indoleamines production by peritoneal cavity macrophages.** *J Leukoc Biol*, v.75, p.1116–1121, 2004.

MAUBEC, E.; LAOUÉNAN, C.; DESCHAMPS, L.; NGUVEN, V.T.; SCHEERSENVARICH, I.; WACKENHEIM-JACOBS, A.C.; STEFF, M.; DUHAMEL, S.; TUBIANA, S.; BRAHIMI, N.; LECLERC-MERCIER, S.; CRICKX,B.; PERRET, C.; ARACTINGI, S.; ESCOUBET, B.; DUVAL, X.; ARNAUD, P.; JAISSER, F.; MENTRÉ, F.; FARMAN, N. **Topical mineralocorticoid receptor blockade limits glucocorticoid-induced epidermal atrophy in human skin.** *J Invest dermatol*, v. 135, p. 1781-1789, 2015.

MEDZHITOV, R. & JANEWAY, C. JR. **Innate immune recognition: mechanisms and pathways.** *Immunol Rev*, v.173, p. 89 -97. 2000.

MEFFERT, M.K. & BALTIMORE, D. **Physiological functions for brain NF-kappaB.** *Trends Neurosci*, v. 28, p. 37-43, 2005.

MORRIS, C.J.; AESCHBACH, D.; SCHEER, F.A. **Circadian system, sleep and endocrinology.** *Mol Cell Endocrinol*, v. 349, p. 91-104, 2012.

MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P.; **Exploring the full spectrum of macrophage activation.** *Nat Rev Immunol*, v. 8, p.958-969, 2008.

MUXEL, S.M.; LAPA, M.A.P.; MONTEIRO, A.W.A.; CECON, E.;TAMURA, E.K.; FLOETER-WINTER, L.M.; MARKUS, R.P. **NF-κB drives the synthesis of melatonin in RAW 264.7 macrophages by inducing the transcription of the Arylalkylamine-N-Acetyltransferase (AA-NAT) gene,** *Jornal list Plos One*, v. 7 (12), PMC 3528721. 2012.

NEMEROFF, C.B. **The corticotropin-releasing factor (CRF hypothesis of depression: new findings and new directions.** *Mol Psychiatry*, v.1(4), p.336, 1996.

OGAWA, S.; LOZACH, J.; BENNER, C.; PASCUAL,G.; TANGIRALA, R.K.; WESTIN,S.; HOFFMANN, A.; SUBRAMANIAM, S. DAVID, M.; ROSENFELD, M.G.; GLASS, C.K. **Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and Toll-like receptors.** *Cell*, v.122, p. 707–721, 2005.

ORO, A.E.; HOLLENBERG, S.M. & EVANS, R.M. **Transcriptional inhibition by a glucocorticoid receptor-beta-galactosidase fusion protein.** *Cell*, v.55, p.1109-1114, 1988.

O'SHEA, J. J. & MURRAY, P. J. **Cytokine signaling modules in inflammatory responses.** *Immunity*, v.28, p.477–487, 2008.

PARK ,Y.M. **CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis.** *Exp Mol Med*, v.46, p.99, 2014.

PAWLAK, J.; SINGH, J.; LEA, R.W.; SKWARLO-SONTA, K . **Effect of melatonin on phagocytic activity and intracellular free calcium concentration in testicular macrophages from normal and streptozotocin-induced diabetic rats.** *Mol Cell Biochem*, v.275, p. 207-213, 2005.

PEETERS, B.W.; RUIGT, G.S.; CRAIGHEAD, M.; KITCHENER,P. **Differential effects of the new glucocorticoid receptor antagonista ORG34517 and RU486 (mifepristone) on glucocorticoid receptor nuclear translocation in the AtT20 cell line.** *Ann N Y Acad Sci*, v.1148, p. 536-541, 2008.

PIRES-LAPA, M.A.; TAMURA, E.K.; SALUSTINO, E.M.A.; MARKUS, R.P. **Melatonin synthesis in human colostrum mononuclear cells enhances dectin-1-mediated phagocytosis by mononuclear cells.** *J. Pineal Res*, v.55. p.240-246, 2013.

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

RAIKHLIN, N.T.; KVETNOY, I.M.; TOLKACHEV, V.N. **Melatonin may be synthesised in enterochromaffin cells.** *Nature*, v.255, p.344–345, 1975.

RAIKHLIN, N.T.; KVETNOY, I.M. **Melatonin and enterochromaffine cells.** *Acta Histochem*, v.55, p.19–24, 1976.

RAMAMOORTHY, S. & CIDLOWSKI, J.A. **Exploring the molecular mechanisms of glucocorticoid receptor action from sensitivity resistance.** *Endocr Dev*, v. 24, p. 41-56, 2013.

RAMAMOORTHY, S. & CIDLOWSKI, J. **Corticosteroids-mechanisms of action in health and disease.** *Rheum Dis Clin North Am*, v. 42, p. 15-31, 2016.

RAY, A. & PREFONTAINE, K.E. **Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor.** *Proc Natl Acad Sci USA*, v.91, p. 752-756, 1994.

RAO, N.A.; MCCALMAN,M.T.; MOULOS,P.; FRANCOIJS, K.J.; CHATZIOANNOU, A.; KOLISIS, F.N.; ALEXIS, M.N.; MITSIOU, D.J STUNNENBERG, H.G. **Coactivation of GR na NFκB alters the repertoire of their biding sites ant target genes.** *Genome res*, v. 21, p.1404-1416, 2011.

REUL, J.M.; DE KLOET, E.R. **Two receptor systems for corticosterone in rat brain microdistribution and differential occupation.** *Endocrinology*, v. 117, p. 2505-2511, 1985.

RIBELAYGA, C.; PÉVET, P. & SIMONNEAUX, V. **HIOMT drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the Siberian hamster.** *Am. J. Physiol*, v.278, p.1339-1345, 2000.

SANCHEZ-HIDALGO, M.; DE LA LASTRA, C.A.; CARRASCOSA-SALMORAL, M.P.; NARANJO, M.C.; GOMEZ-CORVERA, A.; CABALLERO, B.; GUERRERO, J.M. **Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues.** *Exp Gerontol*, v.44, p.328–334, 2009.

SCHEINMAN, R.I.; COGSWELL, P.C.; LOFQUIST, A.K. & BALDWIN, A.S. JR. **Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids.** *Science*, v. 270, p. 283-286, 1995.

SCHEINMAN, R. I.; GUALBERTO, A.; JEWELL, C.; CILOWSKI, J.A.; BALDWIN, A. S. JR. **Characterization of mechanisms involved in transrepression of NFkB by activated glucocorticoid receptors.** *Mol Cell Bio*, v.15, p. 943-953, 1995.

SMANS, L.C. & ZELISSEN, P.M. **Thomas Addison and the adrenal gland.** *Ned Tijdschr Geneesk*, v. 156, p. A 4778, 2012.

SMOAK K.A.; CIDLOWSKI J.A. **Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation.** *Mech.Ageing Dev*, v.125 (10-11), p. 697-706, 2004.

SNYDER, S.H.; & AXELROD,J. **A sensitive assay for 5-hydroxytryptophan decarboxylase.** *Biochem Pharmacol*, v.13, p.805-806, 1964.

SOARES JR, J.M.; SIMÕES, R.S.; SIMÕES, M.J.; BARACAT , E.C. **Aspectos moleculares dos receptores de melatonina na reprodução.** *Femina*, v.31 (6), p.495-500, 2003.

SOKOLOVIC, D.; DJORDJEVIC, B.; KOCIC, G.; VELJKOVIC, A.; MARINKOVIC, M.; BASIC, J.; JEVTOVIC-STOIMENOV, T.; STANOJKOVIC, Z. SOKOLOVIC, D.M.; PAVLOVIC, V.; DJINDJIC, B.; KRSTIC, D. **Melatonin protects rat thymus against oxidative stress caused by exposure to microwaves and modulates proliferation/apoptosis of thymocytes.** *Gen Physiol Biophys*, v.32, p. 79-90, 2013.

SPIGA, F.; KNIGHT, M.D.; DROSTE, K.S.; CONWAY-CAMPBELL, B.; KERSHAW,Y.; MACSWEENEY, P. C.; THOMSON, J.F.; CRAIGHEAD, M.; PEETERS, M.M. W.B.; LIGHTMAN, L., S. **Differential effect of glucocorticoid receptor antagonists on glucocorticoid receptor nuclea translocation and DNA biding.** *J Psychopharmacol*, v. 25, p. 211–221, 2011.

STERNBERG, E. M. **Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens.** *Nature Rev. Immunol*, v.6, p.318–328, 2006.

STRASSMANN, G.; PATIL-KOOTA, V.; FINKELMAN, F.; FONG, M. & KAMBAYASHI, T. **Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E2.** *J. Exp. Med.* v.180, p.2365–2370, 1994.

SUHONG, Y.; XINGTIAN, Y.; YEWEI, Z.; FANGWEI, X.; YUSHENG, L.; TING, Y.; CUICUI, Y.; JINGWEI, S.; YU, G.; FAN M,O.; GUONENG C.; PATRICK, J. S.; LEE, J. **Systems pharmacology of mifepristone (RU486) reveals its 47 hub targets and network: Comprehensive analysis and pharmacological focus on FAK-Src-Paxillin complex.** *Sci Rep*, v. 7830, p.1-10, 2015.

TAMURA, E.K.; CECON, E.; MONTEIRO A.W., SILVA C.L., MARKUS R.P. **Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells.** *J Pineal Res*, v. 46, p. 268-274, 2009.

TANAKA, J.; FUJITA, H.; MATSUDA, S.; TOKU, K.; SAKANAKA, M. MAEDA, N. **Glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors in microglial cells; the two receptors mediate differential effects of corticosteroids.** *Glia*, v. 20, p. 23-37, 1997.

TURNBULL, A.V.& RIVIER, C.L. **Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action.** *Physiol Rev*, v. 79, p. 1-71, 1999.

UNDERHILL, D.M.; GORDON,S.; IMHOF,B.A.; NÚÑEZ, G.; BOUSSO, P. **Élie Metchnikoff (1845-1916): celebrating 100 years of cellular immunology and beyond.** *Nat Rev immunol*, v.16 (10), p.651-656, 2016.

VOISIN, P.; NAMBOODIRI, M.A.A.; & KLEIN, D.C. **Arylamine N-acetyltransferase and aryl-alkylamine N-acetyltransferase in the mammalian pineal gland.** *J biol chem*, v.259, p. 10913-10918, 1984.

WISSINK, S.; VAN HEERDE, E.C.; SCHMITZ, M.L.; KALKHOVEN, E.;VAN DER BURG, B.; BAEUERLE, P.A. & VAN DER SAAG, P.T. **Distinct domains of the RelA NF-kappaB subunit are required for negative cross-talk and direct interaction with the glucocorticoid receptor.** *J Biol Chem*, v. 272, p. 22278-22284, 1997.

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

ZHONG, H.J.; WANG, H.Y.; YANG,C.; ZHOU, J.Y.; JIANG, J.X. **Low concentrations of corticosterone exert stimulatory effects on macrophage function in a manner dependent on glucocorticoid receptors.** *Int J Endocrinol*, v.2013, p.9-18, 2013.