Marco Antonio Pires Camilo Lapa

Catecolaminas induzem a síntese de
melatonina na linhagem de macrófagos
RAW 264.7

São Paulo

2014

Marco Antonio Pires Camilo Lapa

Catecolaminas induzem a síntese de
melatonina na linhagem de macrófagos
RAW 264.7

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Regina P. Markus

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica

Lapa, Marco Antonio Pires Camilo

Catecolaminas induzem a síntese de melatonina na linhagem de macrófagos RAW 264.7. / Marco Antonio Pires Camilo Lapa; orientadora Regina Pekelmann Markus. -- São Paulo, 2014.

118 f.

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

1. Macrófagos. 2. Melatonina. 3. Adrenérgicos. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia. II. Título.

Comissão Julgadora

Prof. (a) Dr. (a)

Prof. (a) Dr. (a)

Prof. (a) Dr. (a)

Prof. (a) Dr. (a)

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

Dedico este trabalho à minha família e amigos, mas especialmente à minha velhinha, que está me apoiando neste momento (assim como o fez por toda vida), lá de onde a luz brilha mais forte...

Tonight, tonight

Time is never time at all
You can never ever leave without leaving a piece of youth
And our lives are forever changed
We will never be the same
The more you change the less you feel

Believe, believe in me, believe
Believe that life can change
That you're not stuck in vain
We're not the same, we're different tonight
Tonight, so bright
Tonight

And you know you're never sure
But you're sure you could be right
If you held yourself up to the light
And the embers never fade in your city by the lake
The place where you were born

Believe, believe in me, believe
Believe in the resolute urgency of now
And if you believe there's not a chance tonight
Tonight, so bright
Tonight

We'll crucify the insincere tonight
We'll make things right, we'll feel it all tonight
We'll find a way to offer up the night tonight
The indescribable moments of your life tonight
The impossible is possible tonight
Believe in me as I believe in you...
Tonight

Smashing Pumpkins

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha família, que sem seu apoio seria impossível sequer erguer minha cabeça dia após dia. Agradeço também ao bom e velho Deus que sempre me iluminou e jamais me deixou faltar nada.

Meus agradecimentos especiais à minha mãe, Iara, por ser fonte de inspiração e exemplo de retidão, e a minha amada avó, Astrogilda, que por pouco não conseguiu ver seu neto um doutor, mas que certamente está me acompanhando de perto em mais este momento. E um agradecimento ainda maior pela pessoa que me deu suporte de todas as formas que alguém poderia, à quem é minha companheira e amiga, e acima de tudo minha mulher e futura mãe dos meus filhotes, Camila Lopes Petrilli. Sem você eu nem veria sentido em nada.

Agradeço aos caros amigos do grupo da Prof^a Regina, mas especialmente aos amigos que estiveram comigo desde o início desta jornada: Daiane, Érika, Sanseray, Cláudia, Eduardo Tamura, Pedro, Marina. Faço aqui o adendo do meu amigo Luís, que apesar de mais recente, certamente me é muito caro. Obrigado meus queridos.

Agradeço aos nossos técnicos Débora Moura e Eduardo Braga. Vocês são excelentes profissionais que tornam o trabalho muito mais ágil, e indivíduos fantásticos que tornam meu cotidiano infinitamente melhor. Obrigado por tudo.

Agradeço aos amigos do Departamento de Fisiologia, grandes companheiros nos últimos anos. E um “obrigado” especial à nossa querida secretária Roseli, cuja ação prestativa já me ajudou em vezes incontáveis (sem exageros...).

Devo agradecer a Prof^a Zulma, que me disponibilizou um espaço em seu laboratório e suportou minha bagunça naquele cantinho por longos anos. Muito obrigado.

Agradecimento especial à minha orientadora, Prof^a Regina Markus, que me conduziu até este momento, sendo uma orientadora de valor inestimável, me dando total apoio, e as devidas palmadas. Ainda não sou o melhor do meu potencial, mas graças à você eu encontrei o caminho para alcançá-lo. Certamente nos esbarraremos ao longo deste caminho. Muito obrigado.

Finalmente um agradecimento especial ao Prof^o Peter A. Ward, da Universidade de Michigan, por me receber, disponibilizar seu laboratório, pelas conversas agradáveis sobre “soccer”. Não posso me esquecer do meu caro Jamison Grailer, que me ensinou virtualmente tudo no laboratório, as técnicas, e teve a capacidade de sair comigo em uma tempestade de neve junto com chuva! Eu nem sabia que isso era possível! Muito obrigado senhores. *Thanks guys!*

Obrigado Firaz (*lab manager*) e Sue Scott (secretária). Foram de uma gentileza ímpar e amistosos de tal modo que quase não me senti um estranho. Obrigado.

Agradeço também à CAPES, à FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro, fundamental para realização deste trabalho.

Índice

Introdução	13
1 – Monitoramento de invasores	14
1.2 – A imunidade inata	16
1.3 – Os receptores da imunidade inata	21
1.4 – Via de transdução de sinal NF- κ B	24
1.5 – Macrófagos – Fagócitos especializados	26
2 – Melatonina: Hormônio Cronobiótico x Mediador Imunológico	33
2.1 – Receptores de melatonina	37
2.2 – Funções da melatonina	39
3 – Sinalização Adrenérgica	42
3.1 – Receptores Adrenérgicos	43
3.2 – Modulação adrenérgica da resposta imunológica	45
4 – NF- κ B e a síntese de melatonina em macrófagos: integrando imunidade, melatonina e catecolaminas	48
Objetivos	50
Material e métodos	52
Resultados	63
Discussão	81
Conclusões	94
Resumo	97
Abstract	99
Referências Bibliográficas	101
Súmula Curricular	110
Anexo 1	117

Lista de Abreviaturas

AA-NAT	enzima aril-alquilamina-N-acetil-transferase
Adr	adrenalina
ALLN	N-acetil-L-leucil-L-leucil-L-norleucinal
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico
ASMT	enzima acetilserotonina metiltransferase
ATP	trifosfato de adenosina
C1/2/3	complexos proteicos
CRE	elementos responsivos a AMPc
CREB	proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc
CXCL1	quimiocina ligante ao motivo C-X-C 1
DAG	diacilglicerol
DAMPs	padrões moleculares associados a perigo
DNA	ácido desoxirribonucleico
ELISA	ensaio enzimático ligado a imuno-absorbancia
EMSA	ensaio de eletromobilidade em gel
GABA	ácido gama-amino-butírico
GPCRs	receptor acoplado a proteína G
HIOMT	enzima hidroxí-indol-O-metil-transferase
HMGB-1	proteína de alta mobilidade do grupo B1
HO-1	heme oxigenase-1
IFN- γ	interferon gama
IFN γ R	receptor para interferon gama

IgG	imunoglobulina G
IL	interleucinas
IL-1R	receptor para IL-1
iNOS	sintase de óxido nítrico induzida
IP3	inositol trifosfato
I κ B	proteína inibitória kappa B
IKK	quinases de I κ B
LBA	lavado broncoalveolar
LPA	lesão pulmonar aguda
LPS	lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas
MCP1	proteína quimiotática de monócitos 1
MIP-1a/2	proteínas inflamatórias de macrófagos
mL	mililitro
MT1/2	receptores metabotrópicos de melatonina
MyD88	fator de diferenciação mielóide 88
NAd	noradrenalina
NAS	N-acetilserotonina
NF- κ B	fator de transcrição nuclear kappa B
ng	nanograma
NLRs	receptores do tipo NOD
nM	nanomolar
NOD	domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeo
NOS2	gene que codifica a enzima sintase de óxido nítrico induzida

NSQ	núcleos supraquiasmáticos
P-AA-NAT	forma fosforilada da AA-NAT
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos
PBMCs	células mononucleares do sangue periférico
PDTC	pirrolidina ditiocarbamato
PBS	salina tamponada com fosfato
PKA	proteína quinase A
pKi	constante de afinidade
PRRs	receptores de reconhecimento de patógenos
RNA	ácido ribonucleico
ROS	espécies reativas de oxigênio
RT-PCR	reação em cadeia de polimerase com transcrição reversa
SFB	soro fetal bovino
SS	super-shift
TAD	domínio de ativação de transcrição
TIR	receptor Toll-IL1
TLRs	receptor do tipo Toll
TNF	fator de necrose tumoral
TRAF	fator associado ao receptor de TNF
TRIF	adaptador indutor de interferon β munido de domínio TIR
μ M	micromolar

Introdução

1 – Monitoramento de invasores

O sistema de defesa de mamíferos atua de forma a monitorar e proteger o organismo contra eventuais infecções por patógenos, contra moléculas e compostos nocivos endógenos, e também células que apresentam sua funcionalidade alterada, como por exemplo células cancerígenas [1, 2]. O sistema imunológico, dedicado ao monitoramento e defesa é constituído por órgãos linfoides primários, que são o timo e a medula óssea; secundários, representados pelos linfonodos espalhados pelo organismo, o baço, e os tecidos linfoides associados à mucosa ou ao intestino [1]; e células imunocompetentes, células que têm origem na medula óssea, e que podem se diferenciar em diversos tipos funcionais [1]. A sinalização para todo o organismo de que uma resposta de defesa está em andamento permite que os outros sistemas gerem respostas de ajuste para uma possível infecção ou lesão tecidual, como por exemplo uma resposta vagal anti-inflamatória [3], de modo a regular e contribuir com a eficácia da resposta contra o invasor.

A função do sistema imunológico é detectar, reconhecer e eliminar agentes agressores exógenos. Estes, podem ser reconhecidos coletivamente a partir de padrões moleculares expressos em suas membranas, conhecidos como PAMPs ou DAMPs (do inglês, *pathogen-associated molecular patterns* ou *danger-associated molecular patterns*, respectivamente). A interação destes PAMPs ou DAMPs com receptores

Introdução

específicos gera cascatas de sinalização que desencadeiam programas organizados de resposta celular capazes de combater o agente agressor. Pode-se separar o processo de resposta inata contra um dado patógeno, de modo a caracterizar quais eventos são predominantes naquela fase. A resposta imune inata é composta por uma fase de montagem da inflamação, seguida pela fase aguda, uma fase regulatória onde a inflamação é reduzida, e uma fase de regeneração tecidual [1].

1.2 – A imunidade inata

A imunidade inata é uma resposta estereotipada que permite o reconhecimento de patógenos e o desenvolvimento de um procedimento padrão independentemente do agente agressor. A primeira linha de defesa da imunidade inata é a pele, que protege e isola o interior do organismo do meio externo [1]. Após uma eventual lesão, são as células imunocompetentes residentes nos tecidos (macrófagos, células dendríticas, células NK, por exemplo) que fazem o reconhecimento inicial de agentes infecciosos, combatem estes patógenos, processam antígenos para apresentação, e geram sinalização (citocinas e quimiocinas) que entra na corrente sanguínea para atrair leucócitos circulantes para o local infeccionado [2], permitindo assim um processo de combate ao agente infeccioso.

O processo envolve a formação de moléculas citotóxicas e a fagocitose do agente agressor, ou de debris celulares. O foco de nossa tese é o estudo do macrófago, um fagócito profissional capaz de sintetizar melatonina [4, 5].

A segmentação do processo inflamatório permite uma melhor análise do fenômeno como um todo, apesar de não estar isenta de uma conotação muito mais didática do que funcional, uma vez que fatores diversos podem interferir na duração de cada fase, e que nem sempre é

Introdução

muito preciso qual o ponto exato em que se passa de uma fase da resposta para a próxima.

A fase de resposta inicial é o processo de montagem da resposta inflamatória, que envolve o reconhecimento inicial de um PAMP ou DAMP por células residentes da área afetada (como por exemplo macrófagos e células dendríticas residentes), acompanhado de uma sinalização com citocinas pró-inflamatórias e/ou quimiotáticas como o fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*) ou interleucina(IL)-1 β , ou proteína inflamatória de macrófagos-2 (MIP-2, do inglês *macrophage inflammatory protein-2*) [1, 6-8]. Esta sinalização via citocinas serve para recrutar leucócitos circulantes como os neutrófilos [9], que serão atraídos até a região infectada e passarão da circulação para o tecido. Outro evento de suma importância que acontece na fase inicial de resposta, incluindo a montagem da inflamação e também a fase de ataque seguinte, é o processo de fagocitose do agente infeccioso. A fagocitose é um mecanismo de reconhecimento e eliminação de microrganismos, que gera sinalização para a montagem da resposta inflamatória por desencadear ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B, do inglês *nuclear factor kappa B*) [10, 11]. Macrófagos e células dendríticas fagocitam e processam os patógenos de forma a apresentarem em sua superfície antígenos passíveis de serem reconhecidos por linfócitos B e T de forma a levar a resposta imune inata para a fase adaptativa [6, 12]. A ativação da via NF- κ B desencadeia a transcrição, temporalmente coordenada, de um pacote de

Introdução

genes que leva à síntese de moléculas citotóxicas e posteriormente de moléculas capazes de ativar o processo de fagocitose.

Logo na sequência da fase de montagem, entramos na fase inflamatória aguda propriamente dita, quando todas as células que poderiam ser recrutadas da circulação (neutrófilos, linfócitos e monócitos) já foram recrutadas, e estão dando “combate” aos agentes infecciosos. Neste ponto uma grande quantidade de citocinas são produzidas, principalmente as de cunho inflamatório e microbicida, de modo a manter as células ali presentes em um estado ativado e apto a eliminar microrganismos [1]. Os neutrófilos estão em grande atividade, realizando a fagocitose de microrganismos e os eliminando através de uma combinação de mecanismos citotóxicos [13]. Os macrófagos continuam fagocitando, produzindo citocinas e espécies reativas de oxigênio ou hidrogênio, e começam a fazer apresentação de antígenos para linfócitos T e B ativados [6, 14]. As células dendríticas já se encaminham para os linfonodos e baço para fazer apresentação de antígenos e selecionar linfócitos T e B específicos contra o antígeno apresentado, fazendo o *link* com a resposta adaptativa [12]. Um ponto de interesse é que neste momento, entre outras vias de sinalização, a via NF- κ B está altamente ativada nas células presentes no local da infecção, uma vez que moléculas capazes de mantê-la em atividade ainda se encontram presentes [15, 16], o que mantém a expressão dos pacotes gênicos envolvidos com a resposta inflamatória em cada tipo celular envolvido [17]. Também existe formação de radicais livres como

Introdução

óxido nítrico e outras espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio por parte dos fagócitos que são importantes para a eliminação de microrganismos, mas que também podem vir a lesionar o tecido circundante [1, 10, 14, 18, 19].

Após a fase aguda uma etapa regulatória se segue. Os macrófagos ativados via receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês *Toll-like receptor*) sofrem diferenciação para o fenótipo regulador e passam a produzir moléculas anti-inflamatórias e continuam com o processo de fagocitose, de forma a permitir a continuação da retirada de microrganismos do espaço extracelular [6]. Neste momento é postulado que a melatonina produzida pelas células se acumule, alcançando concentração local elevada, e esta pode contribuir para a inativação da via NF- κ B [20-22], que também tem sua atividade regulada através de uma retroalimentação negativa que se faz relevante nesta fase da resposta [17]. Outra possível ação da melatonina neste ponto seria inativar a produção de espécies reativas ao interagir com enzimas que produzem estas moléculas ou inativa-las diretamente, devido sua alta capacidade antioxidativa [23].

A etapa final neste processo, a fase de resolução, seria após a total eliminação dos agentes patogênicos; morte ou migração dos linfócitos T/B e células dendríticas para os órgãos linfóides; inativação da sinalização das vias pró-inflamatórias como o NF- κ B; e diferenciação de macrófagos para o fenótipo regenerador de lesões, que auxilia no

Introdução

reparo tecidual na região, permitindo um retorno do tecido às condições basais [1, 6].

Uma vez descrita as etapas da resposta inflamatória, vamos abordar os elementos que permitem que este processo ocorra, dando ênfase à função dos macrófagos neste processo.

1.3 – Os receptores da imunidade inata

Dentre os diversos receptores envolvidos com o reconhecimento de PAMPs e DAMPs, os principais são os TLRs, cujas isoformas identificadas em mamíferos vão do TLR1 ao TLR13 [15, 24, 25]. Estes receptores em conjunto com os receptores que serão abordados em breve, são conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *pattern recognition receptors*). Os receptores TLR são proteínas altamente conservadas que formam uma superfamília com os receptores de IL-1, com a qual compartilham um domínio intracelular denominado TIR (do inglês, *Toll-IL1 receptor*), e estão presentes em todas as células imunocompetentes que participam da defesa inata do organismo, como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas [26-28]. Cada TLR é capaz de reconhecer um grupo de PAMPs/DAMPs específicos, como por exemplo o TLR4 reconhece o LPS de bactérias gram-negativas ou o taxol de plantas, o dímero TLR2/6 reconhece moléculas ricas em β -glucanas como o zimosan ou glicolipídios, ou ainda o TLR3 que reconhece o RNA viral de fita dupla [15]. Pode-se considerar fundamental que existem dois pontos que todos os receptores TLR compartilham: o primeiro é que na maior parte das vezes os TLRs utilizam as mesmas moléculas adaptadoras para sinalização intracelular (MyD88, TRAF). Isto não ocorre em alguns casos na ativação de TLR4, e no caso do TLR3 que sinaliza via TRIF [15, 25]; o segundo é que qualquer dos TLRs ativados acionam a via de

Introdução

sinalização do NF- κ B [15, 17]. Os receptores TLR são capazes de reconhecer diversos padrões moleculares que estão presentes em virtualmente todos os possíveis patógenos, e com isso o papel de reconhecimento e direcionamento da resposta inflamatória é feito.

Contudo, não apenas o reconhecimento por parte dos TLRs é necessário, mas também os receptores envolvidos com a fagocitose ou ingestão de microrganismos são fundamentais. Os receptores do tipo lectina-C como a dectina-1 ou dectina-2 [29, 30] são fundamentais para realizar a fagocitose de PAMPs ricos em manose, e permitir assim tanto a eliminação do patógeno quanto o processamento dos antígenos que serão apresentados posteriormente e garantir a continuidade da resposta inata para a adaptativa [31]. Observamos que macrófagos ativados com lipopolissacarídeo (LPS) ou zimosan, que são PAMPs de bactérias gram-negativas e de fungos, respectivamente, produzem a indolamina melatonina de forma dependente da ativação do fator de transcrição NF- κ B, e esta potencia o processo de fagocitose de partículas ricas em manose, como o zimosan [4]. Melatonina produzida por macrófagos ou fagócitos mononucleares do colostro humano interagem com receptores de melatonina MT₂ promovendo o aumento da expressão de uma proteína de membrana responsável pela fagocitose de zimosan [5].

Os receptores do tipo Fc, que são responsáveis por fagocitar PAMPs opsonizados por imunoglobulinas são também fundamentais no processamento de antígenos, e atuam conjuntamente com TLRs, IL-1R

Introdução

e IFN γ R em células dendríticas (por exemplo) para reconhecimento de PAMPs e direcionamento da resposta em termos de citocinas produzidas como TNF ou IL-17 [32]. Apenas para citar, existem muitos outros receptores da imunidade inata que se localizam não na membrana celular, mas no citoplasma, como os receptores do tipo NOD (NLRs, do inglês *NOD-like receptors*), que além de reconhecerem PAMPs sozinhos, podem fazer reconhecimento conjunto com TLRs [33].

Em síntese, o sistema de defesa inato se utiliza de uma gama de PRRs que em conjunto permitem o reconhecimento de virtualmente qualquer patógeno, integra essa informação através da produção de citocinas específicas que ativam e atraem outras células para a região infectada, e finalmente passam adiante a informação necessária para as células efetoras do sistema de defesa adaptativa poderem finalizar com eventuais patógenos que restaram e ainda gerar proteção contra futuras infecções.

1.4 – Via de transdução de sinal NF- κ B

Considerada uma das vias de sinalização centrais na resposta inflamatória, a via de sinalização do fator de transcrição nuclear kappa B é ubíqua nas células imunocompetentes, e também altamente relevante em diversos outros tecidos, como nos neurônios, onde regula a sobrevivência celular; na pele; ou ainda na glândula pineal onde participa na regulação da síntese noturna de melatonina [17, 34-36].

A molécula do NF- κ B é um dímero (que pode ser tanto um homodímero quanto heterodímero), composto por proteínas da família NF- κ B/Rel que podem ser divididas em duas classes, as que possuem e as que não possuem domínio de transativação TAD, (do inglês *transcription activation domain*). As subunidades p50 e p52 não possuem TAD, enquanto as subunidades RelA, RelB e c-Rel que apresentam o TAD, podendo regular positivamente a expressão gênica [17]. Portanto, dímeros que apresentam subunidades que apresentam TAD, como por exemplo o heterodímero p50/RelA, induziriam a expressão gênica, enquanto o homodímero p50/p50 teria uma função repressora.

A regulação da atividade do NF- κ B ocorre principalmente através da presença de proteínas da família I κ B (α , β , ϵ , γ , ζ e Bcl-3), que são responsáveis por se ligar aos dímeros NF- κ B, e mantê-los sequestrados no citoplasma em uma forma inativa [17], durante estados basais de atividade [37]. Uma vez que receptores de membrana como os TLRs são

Introdução

ativados [15], a cascata de sinalização iniciada leva à ativação de quinases específicas para as proteínas da família I κ B, as I κ B-quinases (IKKs α , β ou γ ; do inglês *I κ B kinases*) que são complexos proteicos responsáveis por fosforilar as moléculas de I κ B e assim marcá-las para degradação proteassomal, e também as subunidades com TAD como RelA (na região da Ser536), estabilizando a conformação funcional da molécula [17, 38].

O controle da expressão gênica é exercido pela interação do dímero de NF- κ B com elementos κ B presentes no promotor ou em regiões reguladoras intrônicas. Apesar de alguma especificidade, de forma geral estas regiões são capazes de ligar de forma eficiente tanto dímeros que possuem ou os que não possuem TAD. Portanto, na dependência do ambiente celular que exerce um controle sobre a translocação nuclear dos dímeros de NF- κ B a transcrição de um mesmo gene pode ser induzida ou reprimida [17].

1.5 – Macrófagos – Fagócitos especializados

Macrófagos são células especializadas derivadas de monócitos, responsáveis pela fagocitose de partículas/microrganismos exógenos e debris celulares, apresentação de antígenos, além de contribuir com o andamento do processo de defesa através da produção de moléculas moduladoras da resposta imunológica, as citocinas [1, 6, 14]. A função primária destas células é realizar a fagocitose de partículas/ antígenos/ microrganismos que são reconhecidos pelos seus receptores de membrana, os receptores TLRs [6, 15], os receptores para fagocitose como a dectina-1 [29, 39], receptores do sistema complemento e receptores para imunoglobulinas do tipo Fc [40, 41], e receptores do tipo *scavenger* [42]. Estes receptores são conjuntamente conhecidos como receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs, do inglês *pathogen recognition receptors*) e são responsáveis pelo reconhecimento dos PAMPs e DAMPs, e são considerados a primeira linha defesa celular contra infecções e os principais receptores da imunidade inata.

Os macrófagos são caracterizados de acordo com o estágio de ativação. Macrófagos teciduais, isto é, os residentes, quando estimulados por interferon- γ (IFN- γ) ou TNF passam a um estágio denominado “classicamente ativado” e possuem atividade microbicida. Quando na presença de IL-4, os macrófagos se tornam “regeneradores teciduais” e são responsáveis pela reparação de tecidos lesionados; e quando ativados com IL-10 na presença de prostaglandinas, complexos

Introdução

imunes, ligantes de receptores acoplados à proteína G (GPCRs, do inglês *G-protein coupled receptors*), glicocorticoides ou células apoptóticas, eles assumem função anti-inflamatória e se tornam macrófagos “regulatórios”. Porém, não existe uma diferenciação tão específica como esta citada, sendo possível qualquer grau de variação na ativação desta células, de modo que os macrófagos podem apresentar marcadores e também atividade que os colocaria dentro de mais de uma destas classificações, o que acaba contestando a definição mais clássica de polarização de fenótipo para um perfil M1 (atividade pró-inflamatória) ou M2 (atividade anti-inflamatória ou reguladora) [6]. Esta informação é importante pois permite compreender a relevância que os macrófagos têm como células que participam de todas as etapas da resposta de defesa, tendo papel crucial durante a montagem e execução da resposta inflamatória (ao fagocitar patógenos e produzir citocinas) e também na fase de resolução do processo ao auxiliar na finalização da inflamação e regeneração tecidual [6].

Os macrófagos são fundamentais para a resposta imune inata, uma vez que nos tecidos, os macrófagos residentes já se encontram em prontidão para reconhecimento de PAMPs ou DAMPs, e após o contato inicial com potenciais patógenos, a sinalização gerada pelas células ativadas causa o recrutamento de monócitos circulantes, que irão se diferenciar em macrófagos no tecido [1]. Como mencionado anteriormente, macrófagos são células especializadas em fagocitar patógenos e debris celulares (quando em estado de homeostasia) [6, 14],

Introdução

eliminando-os da área lesada, e ao mesmo tempo produzir citocinas (TNF, IL-1, IL-6, IL-23) que irão ativar células T, células dendríticas e outros macrófagos próximos, tendo aumento também em sua própria atividade microbicida e expressão de moléculas co-estimulatórias de membrana [6, 14]. Usualmente, os macrófagos são tidos como células apresentadoras de antígenos, mas diferente das células dendríticas, macrófagos executam essa função na área da inflamação e não em órgãos linfóides, sendo menos eficientes em ativar as células T quiescentes do que as células dendríticas [1]. Entretanto, macrófagos desempenham uma importante função reguladora, pois eles apresentam maior tempo de vida e se mantêm na área inflamada, e dependendo do contexto de moléculas sinalizadoras no microambiente, eles assumem diferentes fenótipos com diferentes capacidades modulatórias [6].

Diversas linhagens de macrófagos imortalizadas são usualmente utilizadas no estudo das funções de macrófagos, e apresentam capacidade de resposta muito semelhante às células primárias. Os macrófagos de linhagem murina RAW 264.7 são utilizadas como modelo para avaliação da atividade da via NF- κ B, servindo como modelo experimental para analisar a ação anti-inflamatória de compostos variados, e um dos parâmetros de análise é a atividade desta via [43-46]. Esta linhagem apresenta também a capacidade de produzir melatonina após ativação de NF- κ B com agonistas de TLR4 (LPS) ou TLR2/6 (zimosan) [4]. Posto que dois dos parâmetros que pretendemos

Introdução

avaliar em nosso modelo são parâmetros satisfatoriamente analisados neste grupo celular, nos pareceu justificado a seleção destas células.

Ao considerarmos que o processo de fagocitose por macrófagos é o primeiro passo na resposta de células que já estão presentes nos tecidos, na primeira etapa da resposta inata, podemos supor que o efeito de potenciar a capacidade fagocítica de macrófagos gerada pela melatonina [4, 5, 47] é uma ação fundamental na montagem da resposta inflamatória de mamíferos. Como citado anteriormente, a ativação de macrófagos RAW 264.7 com LPS ou zimosan, ou ainda células mononucleares do colostro humano é dependente da translocação nuclear de NF- κ B [4, 5].

A síntese de melatonina não é um evento singular, mas algo que é ubíquo no organismo. Praticamente todo conhecimento disponível sobre a síntese de melatonina se deve a estudos na glândula pineal. Glândulas pineais de ratos em cultura ativadas com LPS ou TNF induzem a ativação da via NF- κ B, o que causa o bloqueio da síntese de melatonina induzida por noradrenalina [48, 49], o que pode ser correlato com o observado em glândulas pineais retiradas de ratos ao longo de um ciclo de claro/escuro (12/12), onde existe NF- κ B nuclear durante a fase de claro, e logo antes do apagar das luzes há uma queda nesse NF- κ B nuclear, e então inicia-se a produção de melatonina [36].

De forma contrária ao observado na glândula pineal, a ativação da via NF- κ B em células imunocompetentes é fundamental para a síntese de melatonina.

Introdução

Com isso, temos um quadro onde a ativação da via NF- κ B na glândula pineal por agonistas de TLRs (LPS) ou citocinas pró-inflamatórias (TNF) causa o bloqueio da produção de melatonina [48-50], enquanto nas células imunocompetentes, ou “periferia”, a ativação de NF- κ B é o responsável pela produção de melatonina [4, 5], o que é uma das bases da teoria do Eixo Imune-Pineal (Figura 1) [51]. O mesmo fator de transcrição é responsável por respostas diametralmente opostas na glândula pineal e nas células imunocompetentes. Mas qual seria a razão para este paradoxo?

O Eixo Imune-Pineal

Physiological Conditions

Immune-Pineal Axis Activation

Recovery Phase

Figura 1 – Esquema proposto do funcionamento do Eixo Imune-Pineal. A hipótese do Eixo Imune-Pineal é de que durante condições homeostáticas de higidez, a melatonina produzida na fase de escuro pela glândula pineal inibe o rolamento e adesão de neutrófilos ao endotélio, impedindo a montagem de uma resposta inflamatória. Uma vez que sinais de perigo são detectados, a sinalização gerada é capaz de inibir, através da ativação de NF-κB, a síntese noturna de melatonina na pineal, o que permite o rolamento e adesão de neutrófilos. Enquanto as células imunocompetentes passam a produzir melatonina localmente, via ativação de NF-κB, e esta melatonina atua facilitando a resolução do processo, seja potenciando a fagocitose de microrganismos ou auxiliando na inativação de NF-κB. Adaptado de Markus *et al.*, 2013.

Introdução

Uma das razões para isto seria a presença da subunidade c-Rel nos dímeros translocados ao núcleo, tanto em macrófagos RAW 264.7 quanto em fagócitos mononucleares do colostro humano ativados [4, 5], uma subunidade do NF- κ B que apresenta TAD, e que não foi detectada na glândula pineal [36, 48, 49].

Em trabalhos anteriores, demonstramos que os macrófagos RAW 264.7 são capazes de produzir melatonina após ativação com agonistas para TLRs: LPS para TLR 4; zimosan para TLRs 2 e 6, e também dectina-1 [15, 29], e que esta melatonina é NF- κ B-dependente. Confirmamos também que além de produzir melatonina, estas células são afetadas por esta melatonina sintetizada, que potencia a fagocitose de partículas de zimosan [4, 5], ou seja, que a melatonina exerce um efeito altamente relevante na função considerada primordial deste tipo de célula.

Para melhor compreender os fatores envolvidos na síntese da melatonina vamos apresentar a via de biossíntese e sua regulação na glândula pineal assim como um apanhado geral dos mecanismos e formas de atuação da melatonina.

2 – Melatonina: Hormônio Cronobiótico x Mediador Imunológico

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina, $C_{13}H_{16}N_2O_2$) é uma indolamina oriunda do aminoácido essencial triptofano, sintetizada em mamíferos por diversos tipos celulares [52]. Seu caráter anfílico favorece a passagem passiva por membranas celulares permitindo atingir o meio extracelular e a corrente sanguínea sem necessidade de moléculas transportadoras ou gasto energético [53].

A glândula pineal sintetiza melatonina de forma rítmica, marcando a fase de escuro. Este ritmo é determinado pelo controle da atividade/transcrição da enzima aril-alquilamina-N-acetil-transferase (AA-NAT) que catalisa a conversão de serotonina em N-acetilserotonina (NAS). Apesar de este não ser o passo limitante da síntese acaba se tornando chave porque a atividade desta enzima aumenta em mais de 100 vezes no escuro [52]. Muitas das células que sintetizam melatonina, a exemplo dos pinealócitos expressam as enzimas que transformam serotonina; AA-NAT e acetilserotonina-N-metiltransferase (ASMT, também chamada de hidroxindol-O-metil-transferase - HIOMT). Estas enzimas foram localizadas em células mononucleares do sangue periférico humano [54], em macrófagos peritoneais [55], em mastócitos [56], no sistema digestório [57-59], na retina [60], glândula harderiana [61]; cérebro [62]; epitélio respiratório [63]; medula óssea [64]; placenta [65]; timo, baço e rins [64, 66]; ovário e testículos [67-69]; e pele [70].

Introdução

Dentre os dados mencionados, alguns deles foram observados em ratos, outros em coelhos, em hamsters ou humanos.

A via biossintética da melatonina tem origem no triptofano sendo convertido a 5-hidroxi-triptofano pela enzima triptofano hidroxilase, o que é seguido pela descarboxilação deste composto em serotonina, que é convertida em N-acetilserotonina pela enzima AA-NAT, e esta por sua vez sofre ação da ASMT para ser transformada em melatonina (Figura 2) [52].

Figura 2 – Via biossintética da melatonina. Sequência das reações enzimáticas na via de síntese da melatonina, apresentando as enzimas envolvidas e cada um de seus substratos. Adaptado de *Vias de transdução envolvidas na síntese do colostro humano*, Dissertação de mestrado, Pires-Lapa M.A., 2010.

Introdução

Na glândula pineal, a via biossintética da melatonina é regulada pelo ciclo de claro/escuro ambiental, como mencionando anteriormente. A luz captada na retina gera um sinal que inibe a liberação de noradrenalina pelas inervações simpáticas sobre a glândula pineal. Na ausência de luz, essa inibição deixa de existir, e a produção de melatonina é ativada na glândula [52]. A luz ativa o trato retino-hipotalâmico que projeta-se para os núcleos paraventriculares (nos núcleos supraquiasmáticos), promovendo uma inibição da via simpática (via sinalização GABAérgica) que inerva a glândula pineal via coluna intermediolateral [52, 71]. Como a ativação da transcrição e atividade da enzima AA-NAT é diretamente dependente da estimulação adrenérgica, no claro não há produção de melatonina.

Foi observado que em roedores ocorre aumento gênico e também aumento da atividade da enzima AA-NAT, enquanto no homem esta enzima é constitutivamente expressa e, durante a noite, há considerável aumento na atividade enzimática. A indução da transcrição gênica ocorre por ligação de CREB-fosforilado (do inglês, *cAMP response element-binding*) a elementos regulados por CRE (do inglês, *cAMP response elements*) localizados no promotor do gene, enquanto a ativação enzimática é decorrente da fosforilação pela proteína quinase dependente de AMPc (PKA, do inglês *protein kinase A*) da proteína chaperona 14-3-3, que se liga a AA-NAT e além de mantê-la estabilizada, protege a AA-NAT de ser degradada [52].

Introdução

Nos últimos anos, foi observado que a melatonina é também produzida por células do sistema de defesa, em condição não rítmica. Células imunocompetentes sintetizam esta indolamina como parte integrante da resposta de defesa [4, 5, 23, 54-56, 72, 73].

Dados do nosso laboratório, incluindo da minha dissertação de mestrado mostraram que a ativação de macrófagos por agentes que ativam a translocação nuclear do fator de transcrição NF- κ B, é capaz de levar à indução da transcrição do gene que codifica a enzima AA-NAT. O promotor e primeiro intron deste gene contém elementos κ B que quando interagem com dímeros de NF- κ B que possuem TAD resultam na sua transcrição [51]. Estes dados obtidos inicialmente com células de linhagem (RAW 264.7) [4] foram confirmados usando células mononucleares do colostro humano [5].

Vale notar que a ativação da via NF- κ B em pinealócitos resulta no bloqueio da transcrição de *Aa-nat*. Estes dados aparentemente controversos podem ser explicados pelo fato de LPS e TNF na glândula pineal e pinealócitos induzir um aumento de dímeros de NF- κ B que não possuem domínios de ativação. Portanto, a sua ligação com os elementos κ B levaria a um bloqueio da transcrição.

2.1 – Receptores de melatonina

Os receptores de melatonina são moléculas de sete domínios transmembrânicos acoplados à proteína G, que foram primeiramente identificados em melanócitos do anfíbio *Xenopus*, e posteriormente encontrados homólogos em outras espécies de vertebrados. Em mamíferos dois subtipos de receptores de membrana são encontrados, MT₁ e MT₂, que como dito anteriormente, são receptores típicos GPCRs, e podem estar acoplados a diferentes isoformas da proteína G, variando de acordo com a localização dos receptores nas células e tecidos [74, 75].

A melatonina é um agonista total de ambos receptores de melatonina MT₁ (pK_i: 9,1 – 9,7) e MT₂ (pK_i: 9,4 – 9,8) (www.iuphar-db.org/DATABASE). O efeito clássico observado em ambos receptores é uma sinalização através da proteína G, que pode estar acoplada a qualquer das isoformas da proteína G [74, 76]. Na maior parte das observações, a ativação dos receptores MT causa diminuição dos níveis de cAMP, seguido por diminuição da atividade da PKA e da fosforilação do fator de transcrição CREB [77].

Os receptores para melatonina MT₁ e MT₂ são encontrados em diversos órgãos e tecidos, como por exemplo na retina; diversas áreas do cérebro; nas vasculaturas cerebrais e periféricas; glândula harderiana, órgãos reprodutivos e córtex da adrenal. Estes receptores

Introdução

são responsáveis efeitos cronobióticos que ocorrem nos núcleos supraquiasmáticos (NSQ) [74, 78, 79].

É importante levar em consideração a natureza dos receptores de melatonina MT_1 e MT_2 para uma melhor avaliação e discussão de possíveis efeitos desta indolamina, uma vez que a concentração da melatonina utilizada em um dado experimento ou eventualmente quantificada, muito nos revela se o efeito da melatonina estaria ocorrendo via receptores (que apresentam afinidade na faixa do nM) ou por vias não relacionadas aos receptores MT, quando a concentração de melatonina se encontra em níveis mais elevados.

2.2 – Funções da melatonina

De forma geral, podemos dizer que a melatonina possui dois grupos de ações, um relacionado à sinalização cronobiótica, e um outro grupo que engloba todas as outras ações não-cronobióticas. A função da melatonina produzida de forma rítmica pela glândula pineal é a função cronobiótica, envolvida na sincronização dos organismos com o ciclo de claro e escuro ambiental, assim como a sincronização dos processos sazonais como a reprodução [52]. Sabe-se também que a produção de melatonina na fase de escuro favorece o sono em organismos com hábitos diurnos como os seres humanos [80]. Um ponto interessante a se observar é que a melatonina produzida pela glândula pineal atua majoritariamente como um hormônio clássico, que é produzido e liberado na circulação para agir em diferentes pontos do organismo, entretanto é possível que a melatonina atue na própria glândula modulando sua própria síntese, como sugerido pela adição de triptofano à glândulas pineais de ratos, levando a uma redução no conteúdo de melatonina e diminuição da atividade da AA-NAT [81].

Diversos tecidos são capazes de produzir esta indolamina, sugerindo uma função local, diferente da função cronobiótica exercida pela melatonina circulante. Em culturas de células do cerebelo de rato incubadas com LPS, a melatonina tem um efeito citoprotetor. Já em células controle a melatonina induz produção de óxido nítrico e morte celular [82]. Nas vias aéreas, a melatonina é capaz de reduzir o processo

Introdução

inflamatório no modelo de asma induzido por ovalbumina [83]. Em um modelo de indução de dano no DNA de células da medula óssea de camundongos, a melatonina protege as células de dano no DNA, ao neutralizar radicais livres [84]. O sistema melatonérgico é importante também na pele humana, onde ocorre síntese e metabolização desta indolamina que atua na proteção contra o dano ao DNA causado por altos índices de radiação ultravioleta [85].

Considerando que a ativação das células imunocompetentes é capaz de induzir a síntese de melatonina, e que esta molécula atua facilitando um processo integrante e fundamental na resposta imunológica inata, a fagocitose [4, 5], foi suposto que a melatonina exerce um papel no início da montagem da resposta inflamatória. Esta hipótese parece divergir do que tem sido mostrado por outros autores que sugerem ser a melatonina uma molécula anti-inflamatória. Sabemos que a melatonina é produzida por linfócitos [54], mastócitos [56], macrófagos peritoneais [55], células mono e polimorfonucleares do colostro humano [5, 73], em macrófagos de linhagem murina RAW 264.7 [4]; e isto está diretamente correlacionado com efeitos diretos da melatonina sobre a função destas células. Pode-se citar a modulação da produção da citocina IL-2 em linfócitos T ou células da linhagem Jurkat [86-88]; em mastócitos a melatonina tem efeito protetor contra citotoxicidade [89]; no tecido endotelial, a melatonina reduz o rolamento e adesão de neutrófilos, o que desfavorece o processo de montagem de uma resposta inflamatória [90]. E como um fator de grande relevância

Introdução

no contexto da modulação da função de células imunocompetentes, a melatonina é capaz de inibir a atividade de uma das vias de sinalização central na resposta imune, a via NF- κ B [20, 72, 91-93].

A melatonina produzida por células imunocompetentes ativadas localmente poderia atuar como uma facilitadora da resolução do processo inflamatório, atuando ao menos em duas fases distintas do processo. Como mencionado anteriormente, no início da resposta ela facilitaria a ingestão de partículas ou micro-organismos (quando estivesse em concentrações na faixa de nM), regulando a síntese de citocinas [86] ou mesmo a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (o que é fundamental para processos microbicidas durante uma resposta imunológica) [94], e após seu acúmulo na área da inflamação (alcançando a faixa de μ M, onde a melatonina apresenta seus efeitos antioxidantes) [23], ela auxiliaria na finalização do processo inflamatório, bloqueando a atividade da via NF- κ B [20, 21].

3 – Sinalização Adrenérgica

As catecolaminas noradrenalina e adrenalina são sintetizadas a partir do aminoácido essencial tirosina na medula da glândula suprarrenal e nos terminais nervosos adrenérgicos e em células do sistema imunológico [95]. Macrófagos, neutrófilos e linfócitos T e B ativados com LPS sintetizam catecolaminas que atuam de forma autócrina e parácrina, potenciando ou ativando a via NF- κ B [96-98].

Podem ser liberadas como neurotransmissores na comunicação do sistema nervoso autônomo, ou ainda na circulação em condições de estresse ou perigo [95, 99].

3.1 – Receptores Adrenérgicos

A adrenalina e a noradrenalina atuam sobre receptores adrenérgicos, possuindo diferentes níveis de afinidade entre os diversos subtipos de receptores, o que varia conforme o tecido e grupo celular envolvido [99]. Os receptores adrenérgicos são subdivididos entre α_1 (α_{1a} , α_{1b} e α_{1d}), α_2 (α_{2a} , α_{2b} e α_{2c}) e β (β_1 , β_2 e β_3) (Figura 3), e estes se diferenciam principalmente pelos sistemas efetores em cada grupo celular onde se encontram.

Modificado de <http://www.iuphar-db.org/DATABASE>

Figura 3 – Classificação dos adrenoreceptores. Classificação dos subtipos de adrenoreceptores identificados em mamíferos. Adaptado de www.iuphar-db.org/DATABASE.

Introdução

Tipicamente, os receptores α_1 estão acoplados à proteína G_{aq} , que causa aumento dos mensageiros intracelulares inositol-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). Os receptores α_2 são acoplados à proteína G_{ai} , que possui atividade inibitória nas células em que se encontram ao inibirem a atividade da enzima adenilil ciclase. E finalmente os receptores β , que se encontram acoplados à proteína G_{as} , que induz uma cascata de sinalização através da ativação da adenilil ciclase e respectivamente do segundo mensageiro AMPc [99].

A noradrenalina é um potente agonista de receptores α_2 em relação a adrenalina, e ambas apresentam afinidade semelhante em relação aos receptores α_1 (www.iuphar-db.org/DATABASE). A noradrenalina tem relativamente pouca potência sobre β , porém ela é menos potente que a adrenalina sobre os receptores α . A adrenalina atua como um potente agonista tanto sobre receptores α quanto β [99]. É interessante observar que ambas catecolaminas atuam como agonistas para todos os receptores adrenérgicos em diferentes concentrações, mas que temos disponível diversos agonistas e antagonistas altamente seletivos para os adrenoceptores, e que muitos dos efeitos destes receptores em dado contexto são acessados através de ferramentas farmacológicas que são atualmente disponíveis.

3.2 – Modulação adrenérgica da resposta imunológica

A sinalização através das catecolaminas como transmissores do sistema autônomo já foi e ainda é amplamente estudada, e está diretamente relacionada com a regulação e ajuste da função de órgãos nos mamíferos (por exemplo: coração, fígado, estômago) [100]. Entretanto, um sistema que sofre grande influência das catecolaminas é o sistema imunológico, e que o perfil de resposta gerado é dependente do subtipo de adrenoceptor ativado.

A ativação de adrenoceptores α_2 , induz a ativação e translocação de NF- κ B para o núcleo de macrófagos alveolares, peritoneais e neutrófilos de ratos e camundongos, induzindo a síntese de TNF, IL-1 β e IL-6, e servindo como um estímulo retroalimentador positivo da resposta inflamatória [96, 97]. No mesmo modelo experimental de lesão pulmonar aguda, foi observado que a ativação seletiva dos receptores β_2 -adrenérgicos gera um efeito anti-inflamatório, reduzindo todos os parâmetros inflamatórios avaliados – TNF, IL-12, CXCL1, MCP-1 e MIP1a – enquanto aumenta a concentração de IL-10 (uma citocina de ação anti-inflamatória) no lavado broncoalveolar [101].

A ativação de receptores β_1 -adrenérgicos em RAW 264.7 induz o aumento da expressão da enzima heme-oxigenase-1 (HO-1), reduzindo a liberação de HMGB-1 pelas células, um fator determinante em situações de sepse, aumentando a sobrevivência de camundongos em

Introdução

modelo experimental de sepse [102]. Na linhagem de células humanas monocíticas U937 e também em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*) a ativação seletiva de receptores β_2 potencia o efeito anti-inflamatório da corticosterona [103].

Agonistas para adrenoceptores β_2 induzem efeitos anti-inflamatórios e anti-nociceptivos em ratos, no modelo de edema de pata [104]. Outro efeito anti-inflamatório atribuído ao receptor adrenérgico β_2 em macrófagos RAW 264.7 é o efeito bloqueador na atividade tardia de NF- κ B induzido por ativação de TLR4, contribuindo para a estabilização do complexo NF- κ B/I κ B α no citoplasma [105]. Em células dendríticas de camundongos, a apresentação de antígenos é inibida pela ativação de adrenoceptores β_2 com o agonista S-albuterol, que inibe a translocação nuclear de NF- κ B induzida por LPS [106]. Uma informação de considerável relevância neste contexto, é de que a ativação de adrenoceptores β induz efeito anti-inflamatório em condições onde as células são concomitantemente ativadas com um agente ativador da resposta inflamatória (como o LPS), mas, quando ativados de forma isolada, o efeito observado é pró-inflamatório [107, 108].

Como citado anteriormente, a adrenalina apresenta pouco efeito sobre receptores β (quando comparado à receptores α), que aparentemente desempenham um papel mais voltado à supressão da resposta inflamatória, e de fato, a pré-incubação de macrófagos peritoneais de ratos com adrenalina antes da adição de LPS potencializou a

Introdução

fagocitose de bactérias, e também a produção de TNF, IL-1 β e IL-10 [109], sugerindo que ativação de receptores α pode estar relacionado à uma ação pró-inflamatória, o oposto dos receptores β .

4 – NF- κ B e a síntese de melatonina em macrófagos: integrando imunidade, melatonina e catecolaminas

As informações expostas até então nos levam a concluir que células imunocompetentes são altamente reguladas por catecolaminas, que por sua vez ativam a via NF- κ B, com a exceção da ativação seletiva de adrenos receptores β_2 [101], e que a própria ativação com PAMPs/DAMPs ativam NF- κ B nestas células [15], o que induziria a síntese de catecolaminas [96, 97]. Pudemos demonstrar anteriormente que a síntese de melatonina em macrófagos e fagócitos mononucleares do colostro humano é dependente da ativação de NF- κ B [4, 5].

Já foi bastante discutido em outros trabalhos como a descarga de noradrenalina na glândula pineal é a efetora do processo de ativação da síntese de melatonina, ativando os adrenos receptores α_1 , α_2 e sobretudo β_1 (o subtipo de receptor adrenérgico com maior densidade na glândula pineal) [52]. Uma publicação de nosso grupo demonstrou um ritmo de NF- κ B no núcleo das células da glândula pineal, e, coincidentemente com o apagar das luzes e início da síntese de melatonina [36], ocorre a descarga de noradrenalina na pineal, ativando os receptores adrenérgicos mencionados [52], principalmente receptores β_1 (por serem os mais abundantes). Poderíamos então considerar a hipótese de que a ativação do adrenos receptor β_1 participaria na queda do conteúdo nuclear de NF- κ B nas células das glândulas pineais dos ratos utilizados [36], o

Introdução

que seria coerente com alguns dos dados citados anteriormente (adrenoceptores β inativando NF- κ B), e ainda assim estaríamos dentro do contexto do Eixo Imune-Pineal, pois o mesmo sinal que induz a síntese de melatonina em macrófagos (NF- κ B) a estaria bloqueando na pineal (Figura 9) [51]. Porém neste caso específico permitindo a produção de melatonina por estar sendo inibido (NF- κ B) por/ou conjuntamente com a descarga simpática na glândula.

Dados do grupo do Prof. Peter A. Ward mostram como o processo inflamatório tanto *in vivo* quanto *in vitro* gera e é potenciado por catecolaminas [96, 97]. Assim sendo, a via NF- κ B seria o nodo de conexão na produção de melatonina em células imunocompetentes, fazendo a conexão da sinalização adrenérgica, que poderia ter origem no sistema imunológico mas também no sistema nervoso autônomo, com a produção periférica desta indolamina.

Objetivos

Objetivos

- Avaliar se a ativação por catecolaminas da via de transdução de sinal NF- κ B em macrófagos RAW 264.7 poderia induzir a produção de melatonina.
- Caracterizar a participação da via NF- κ B, e quais subunidades compõem os dímeros translocados ao núcleo das células.
- Determinar se adrenoceptores β participam nesta síntese.
- Avaliar o efeito da melatonina *in vivo*, em conjunto com o agonista β -adrenérgico S-albuterol sobre a resposta inflamatória, utilizando o modelo experimental de lesão pulmonar aguda em camundongos e também em macrófagos alveolares da linhagem MH-S (ATCC® CRL-2019™).

Material e métodos

Material e Métodos

Drogas e reagentes

Os reagentes adrenalina, noradrenalina, isoprenalina, propranolol, forskolina, S-albuterol e os anticorpos primários são da empresa *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, EUA). O meio de cultura RPMI 1640 e o soro fetal bovino (SFB) são da *Gibco-Life Technologies* (Grand Island, NY, EUA). Os anticorpos secundários fluorescentes e os anticorpos para as subunidades do NF- κ B (p50, RelA, p52, c-Rel, RelB ou Bcl3) são da *Santa Cruz Biotechnologies* (Dallas, TX, EUA). Os inibidores da via NF- κ B acetil-L-leucil-L-leucil-L-norleucinal (ALLN) e pirrolidina ditiocarbamato (PDTC) são da *Tocris* (Minneapolis, MN, EUA). O kit de ELISA para dosagem de melatonina foi adquirido da *IBL International* (Hamburg, Alemanha). Todos os reagentes utilizados nos experimentos possuem grau de pureza analítica. Qualquer reagente ou equipamento não descrito nesta seção serão descritos conforme apresentados no texto.

Macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7

Foram utilizados macrófagos de origem murina da linhagem RAW 264.7 como modelo experimental. Estas células foram mantidas em garrafas de cultura (75 cm²) em condições constantes de 37° C, 5% CO₂, em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB com 1% de penicilina/estreptomicina.

Material e Métodos

Detecção da proteína AA-NAT por imunocitoquímica

A imunoreatividade da proteína AAN-NAT em células RAW 264.7 plaqueadas em lâminas de cultura celular (2×10^5 céls/poço) foi observada após incubação (15 min.) com Adr ou NAd (0,1; 0,2; 0,4; 0,8; e 1,6 nM). As células foram fixadas com metanol/acetona (1:1, 15 min. A -20°C), permeabilizadas com Tween 20 (0,5%; 10 min. a temperatura ambiente) e incubadas com anticorpo de coelho anti-AA-NAT (1:200) ou anti-fosfo-AA-NAT (P-AA-NAT; 1:200 – ambos mantidos *overnight* à 4°C). Posteriormente, incubou-se com o anticorpo secundário IgG anti-coelho marcado com PerCP (1:300) por 1 hora à temperatura ambiente em câmara escura.

As lâminas foram analisadas por microscopia confocal (Zeiss LSM 510) com uma objetiva de 63x com imersão em água. O fluoróforo PerCP foi excitado com o laser HeNe 543/633 e a fluorescência emitida foi observada no comprimento de onda de 650 nm. Imagens aleatórias foram tiradas de quatro campos em cada poço, em uma resolução de 1024×1024 pixels com parâmetros de configuração idênticos para todas as fotos (*pinhole*, velocidade de escaneamento e potência do laser). Para quantificar a intensidade de fluorescência relativa da AA-NAT ou P-AA-NAT, todas as células de cada campo foram contadas (~30 céls/campo), e a fluorescência individual de cada célula foi medida pelo programa *ImageJ* 1.41 (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

Material e Métodos

Participação de β -adrenoceptores na síntese de melatonina

A atividade dos β -adrenoceptores foi determinada pela pré-incubação (30 minutos) do bloqueador beta, propranolol (concentração selecionada da curva de concentração testada: 0,3 nM) junto a Adr (0,2 nM) ou NAd (0,4 nM) por 15 minutos, então o mesmo protocolo de imunocitoquímica citado anteriormente foi realizado para P-AA-NAT.

Participação da via NF- κ B na produção de melatonina em macrófagos RAW 264.7 estimulados com catecolaminas

O ensaio de EMSA para determinar a translocação nuclear de NF- κ B foi realizado com extratos nucleares proteicos de macrófagos RAW 264.7 (2×10^6 céls) nos grupos controle (veículo), Adr (0,2 nM) ou NAd (0,4 nM) conforme descrito previamente em trabalhos anteriores do nosso grupo [110]. Após incubação de 15 minutos com os tratamentos citados, e subsequente protocolo de extração de proteína nuclear [110], 7 μ g de proteína dos extratos nucleares foram incubados com tampão (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM $MgCl_2$; 50 mM NaCl; 0,5 mM DTT; 0,5 mM EDTA; 4% glicerol; e 0,02U poli-dIdC) por 20 min. a temperatura ambiente. Em seguida, 2 μ g de anticorpo contra p50, p52, Rel-A, RelB, c-Rel ou Bcl3 foram adicionados. Após 45 min., os extratos foram incubados com uma sonda dupla-fita de NF- κ B marcada com ^{32}P (5'-agttgaggggactttcccaggc-3'; Sinapse, São Paulo, Brasil) por 30 minutos a

Material e Métodos

temperatura ambiente. Estes extratos foram colocados para correr em um gel não-desnaturante de poliacrilamida (6%) (*Bio-Rad Laboratories*, Richmond, CA, EUA) em tampão TBE (Tris-Borato/EDTA). Após a secagem, o gel foi exposto a um filme fotográfico XAR-5 Kodak (Rochester, NY, EUA) por 72 hrs a -80°C, e analisado.

A participação da via NF- κ B no aumento da expressão da enzima P-AA-NAT induzido por catecolaminas foi determinado por imunocitoquímica após a incubação (30 min.) dos macrófagos RAW 264.7 (2×10^5 céls/poço) com os inibidores farmacológicos da via NF- κ B, acetil-L-leucil-L-leucil-L-norleucinal (ALLN; 50 μ M) ou pirrolidina ditiocarbamato (PDTC; 25 μ M) antes da adição de Adr (0.2 nM) ou NAd (0.4 nM) por 15 min.

Participação de AMPc no aumento da expressão de P-AA-NAT induzido por catecolaminas

As células (2×10^5 céls/poço) foram incubadas com forskolina (10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} ou 3×10^{-7}) por 15 minutos, e após este tempo as células passaram pelo protocolo de imunocitoquímica descrito anteriormente para detecção de P-AA-NAT.

Material e Métodos

Quantificação de melatonina no sobrenadante das células RAW 264.7

Os sobrenadantes de macrófagos RAW 264.7 (2×10^6 céls/poço) incubados por 3 horas com Adr (0,2 nM) ou NAd (0,4 nM), na presença ou ausência de incubação prévia (30 min.) com propranolol (0,3 nM), PDTC (25 μ M) ou ALLN (50 μ M), foram coletados com proteção contra luz direta. A quantificação de melatonina foi feita com um kit comercial de ELISA, e foi procedido conforme as instruções do fabricante (*IBL International*).

Animais

Todos os procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com o *Guide of Care and Use of Laboratory Animals* publicado pelo Instituto Nacional de Saúde dos EUA. O estudo foi aprovado pelo *University Animal Care and Use Committee* (UCUCA) (protocolo número: PRO00005749), da Universidade de Michigan (EUA), e realizado conforme as recomendações apropriadas. Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 livres de patógenos (*Jackson Laboratories*, Bar Harbor, ME, EUA), com 1 mês de idade. Os animais foram mantidos em condições controladas com água e comida *ad libitum*, em salas no biotério de animais do *Medicine School Research Building 1*, vistoriadas pelo serviço de manejo de biotério da *Unit for Laboratory Animal Medicine* (ULAM).

Material e Métodos

Modelo de Lesão Pulmonar Aguda (LPA)

Foi utilizado o modelo de lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por LPS já estabelecido no laboratório do Prof^o Peter A. Ward, da Universidade de Michigan [111, 112]. Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal com cetamina/xilazina (150 mg e 13 mg/Kg, respectivamente), e então o procedimento cirúrgico de exposição da traqueia foi realizado. No grupo controle (SHAM) foi injetado por via intratraqueal (i.t.) 30 µL de PBS estéril (37°C), enquanto que os grupos tratados receberam LPS 60 µg (*E.coli* o111:B4), LPS 60 µg + S-abuterol 10⁻⁵ M, ou LPS 60 µg + Melatonina 1 nM (todos da *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EUA). Todos os tratamentos foram realizados com o mesmo volume de 30 µL, nas respectivas concentrações a velocidade de injeção de 2 µL/15 seg (7 minutos e 50 segundos por animal em média). Os animais foram suturados e colocados para recuperação em câmara com luz vermelha para melhor conforto térmico. Após 6 horas foram eutanaziados em câmara com gelo seco (CO₂) e 1 mL de PBS estéril gelado foi instilado nos pulmões através de uma incisão na traqueia. O lavado broncoalveolar (LBA) foi colhido e estocado a -80°C para posterior quantificação de citocinas e melatonina. Os pulmões foram coletados, e adicionamos 1 mL de TRIzol (Sigma) em cada tubo com pulmão para homogeneização. Os homogenatos passaram pelo processo de extração de RNA imediatamente ou estocados em -20°C no máximo por 1 dia para então serem processados para análise da expressão gênica de *Aa-nat* e *Tnf*.

Material e Métodos

Cultura e manutenção dos macrófagos alveolares MH-S

Macrófagos alveolares de linhagem murina MH-S (ATCC® CRL-2019™) foram mantidos em garrafas de cultura (75 cm²), com meio de cultura RPMI 1640 com 10% de SFB, enriquecido com 1% de L-glutamina e 1% de penicilina/estreptomicina em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Para os ensaios de ativação celular foram plaqueadas 1 x 10⁶ céls/poço em placas de 24 poços, e estas foram mantidas *overnight* em meio de cultura completo. No dia seguinte o meio foi removido, e um novo meio sem SFB (37°C) foi adicionado para a realização dos ensaios. Os poços foram incubados (37°C, 5%, CO₂) com as drogas nas concentrações especificadas nos resultados conforme o grupo experimental por 4 horas. Após as incubações o sobrenadante foi removido e estocado a -80°C para posterior dosagem de citocinas ou melatonina.

Para o ensaio de avaliação da expressão gênica de *Aa-nat*, 3 x 10⁶ céls/poço foram incubadas por 18 horas com RPMI, LPS 1µg/mL, ou LPS 1µg/mL + curva de concentração de melatonina (0,01; 0,1; 1; 10 e 100 nM).

Dosagem de citocinas e melatonina nos lavados broncoalveolar ou sobrenadantes de cultura celular de MH-S

A dosagem do conteúdo das citocinas IL-1β, TNF, IL-6 ou melatonina em amostras de LBA ou sobrenadante das culturas

Material e Métodos

celulares foi feita por kit comercial de ELISA (R&D Systems – Minneapolis, MN, EUA). Os kits foram realizados conforme as instruções dos fabricantes.

Avaliação da expressão gênica de *Aa-anat*, *Arginase-1* e *Nos2* (*iNOS*)

Para avaliar a expressão gênica de *Aa-nat*, *Arginase-1* e *Nos2*, foi realizada extração de RNA dos pulmões homogeneizados ou das células MH-S, que após o ensaio de LPA, no caso dos pulmões, ou ativação das células (para as MH-S) foi adicionado 1 mL de TRIzol aos tubos/poços. Os pulmões foram homogeneizados em um homogeneizador de tecidos e as células com a pipeta por “*up and down*”, sendo então raspadas da placa. O lisado resultante (em ambos os casos) foi transferido para tubos de 1.5 mL. Cada amostra foi processada como se segue: incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente; adicionado 0.2 mL de clorofórmio para cada 1 mL de TRIzol e vortexadas vigorosamente; incubadas por 3 minutos a temperatura ambiente; centrifugadas a 12000 x g por 15 minutos, a 4°C; a camada aquosa foi transferida para um novo tubo; adicionado 0.5 mL de isopropanol (100%) e vortexado vigorosamente; foi então incubada por 10 minutos a temperatura ambiente e depois centrifugada a 12000 x g por 5 minutos a 4°C; o sobrenadante foi removido e o *pellet* deixado para secar por 10-20 minutos; adicionamos 50 µL de água livre de RNase e ressuspendemos o *pellet*; incubamos por 15 minutos a 60°C. Checamos a concentração e

Material e Métodos

pureza do RNA por espectrofotometria; diluímos então o RNA para 200 ng/mL e estocamos a -80°C. O RNA extraído foi tratado com DNase (*Life Technologies*, Grand Island, NY, EUA) para remoção de qualquer DNA genômico. O cDNA foi obtido por transcrição reversa seguindo o protocolo fornecido pela empresa (oligo dT primers – *SuperScript II Reverse Transcriptase*; *Life Technologies*, Grand Island, NY, EUA) e o RT-PCR em tempo real foi realizado utilizando reagentes da *Life Technologies* no equipamento 7500 real-time PCR System (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA), conforme as instruções do produto. Os resultados foram analisados pelo método de 2-ddCt para quantificação relativa e normalizado por *Gapdh*. Os primers (*Life Technologies*, Grand Island, NY, EUA) usados para amplificação foram:

Tabela 1 – Sequência de bases dos primers utilizados nos ensaios de RT-PCR em tempo real.

Gene	Forward	Reverse
<i>Gapdh</i>	5' CTCAACAGCAACTCCCACTCTTCC 3'	5' GGTGGTCCAGGGTTTCTTACTCC 3'
<i>Arginase-1</i>	5' ATGGAAGAGACCTTCAGCTACCTGC 3'	5' GCTGTCTTCCCAAGAGTTGGG 3'
<i>Nos2</i>	5' ACATCGACCCGTCACAGTAT 3'	5' CAGAGGGGTAGGCTTGCTCTGG 3'
<i>Aa-nat</i>	5' GTCGACTCCTATGAAACAGTCGT 3'	5' ATCTAAAGTCCTACAGTTCGGGA 3'

Análise Estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os grupos foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguido

Material e Métodos

pelo pós-teste de Newman-Keuls. Quando dois grupos foram comparados utilizamos o teste t de Student. Os valores de P menores de 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Retas foram obtidas usando o método de mínimos quadrados e testados usando análise de variância. A análise estatística foi feita por meio do programa de computador GraphPad Prism® versão 5.00 (GraphPad Software©).

Resultados

Resultados

A enzima que transforma serotonina em N-acetilserotonina é um passo chave na síntese de melatonina e em glândulas pineais é induzida por ativação de adrenocetores β , avaliamos a expressão de AA-NAT total ou fosforilada em macrófagos RAW 264.7 incubados com adrenalina ou noradrenalina.

Os dois agonistas, incubados por 15 minutos, mostram um efeito sobre a imunoreatividade da AA-NAT, mas esta resposta não apresenta curvas concentração-efeito clássicas (figura 4). No caso da adrenalina há uma tendência de aumento de 25% da expressão de AA-NAT, que já é observada com a concentração de 0,2 nM. A noradrenalina também promoveu um aumento da expressão de AA-NAT, e esta foi maior que a da adrenalina. Um outro ponto interessante é que avaliando as respostas à noradrenalina de acordo com uma regressão linear, esta apresentou uma inclinação diferente de zero (quando testada por análise de variância da reta de regressão), indicando uma resposta dependente da concentração.

Resultados

Figura 4 – Curva concentração-resposta de adrenalina (curva em preto) ou noradrenalina (curva em cinza) (15 minutos). Catecolaminas aumentam a expressão de AA-NAT total em macrófagos RAW 264.7. A figura da esquerda mostra um registro típico e a da direita a quantificação. Os dados estão apresentados como média $\pm$ e.p.m., $n = 3-5$ poços por ponto. Curva de noradrenalina: $F_{[1, 22]}=4.684$; $P<0,05$. Os experimentos foram realizados em três dias diferentes. Os dados foram normalizados pelo grupo veículo, que está representado pela reta pontilhada – 100%.

A expressão da forma ativa da enzima, isto é, a fosforilada por PKA também foi avaliada porque esta poderia ser induzida por adrenoreceptores β . Como pode ser observado nas imagens de imunocitoquímica apresentadas na figura 5, tanto adrenalina quanto noradrenalina aumentam a expressão de P-AA-NAT. A quantificação destes dados evidenciou curvas concentração-resposta clássicas. Como as concentrações escolhidas não incluem valores inferiores a 50% do efeito máximo não é possível extrapolar o valor da afinidade.

Figura 5 – Curva concentração-resposta de adrenalina (curva em preto) ou noradrenalina (curva em cinza) (15 minutos). Catecolaminas induzem o aumento da imunoreatividade de P-AA-NAT em macrófagos RAW 264.7. Os dados estão apresentados como média $\pm$ e.p.m., $n=3-4$ por grupo. A figura é representativa dos tratamentos na concentração de efeito máximo. Os dados foram normalizados pelo grupo veículo. Os dados foram normalizados pelo grupo veículo.

Os experimentos seguintes focaram apenas a forma fosforilada, que é a forma ativa. Optamos por testar as concentrações de 0,2 nM de adrenalina e 0,4 nM de noradrenalina para permitir a visualização de bloqueio da resposta. O bloqueio de adrenoreceptores β com o antagonista competitivo não-seletivo, propranolol (0,3 nM, 30 min.) reduziu significativamente a imunoreatividade da P-AA-NAT induzida por adrenalina e noradrenalina (Figura 6). Este dado sugere que, à semelhança do que ocorre com a glândula pineal, a ativação de

Resultados

adrenoceptores β seria capaz de ativar a via biossintética da melatonina.

Figura 6 – Pré-incubação com o antagonista de receptores β -adrenérgicos (propranolol 0,3 nM) reverte o aumento gerado por Adr (0,2 nM) ou NAd (0,4 nM) sobre a imunoreatividade de P-AA-NAT. Os dados estão apresentados como média $\pm$ e.p.m., $n=3-4$ por grupo; * = $p<0,05$. Os dados foram normalizados pelo grupo veículo.

De fato, tanto a adrenalina quanto noradrenalina induzem um aumento do conteúdo de melatonina no meio de cultura, e este aumento foi bloqueado com propranolol (figura 7A). Comprovamos que a ativação de adrenoceptores β induz produção de melatonina em células RAW 264.7 através da realização de curvas concentração-efeito para isoprenalina (figura 7B).

Resultados

Figura 7 – O bloqueio de receptores β -adrenérgicos (propranolol 0,3 nM) reverte o efeito indutor de Adr (0,2 nM) ou NAd (0,4 nM) (3 horas de incubação), sobre o conteúdo de melatonina dosado no meio de cultura das células RAW 264.7 (A). A ativação seletiva de receptores β -adrenérgicos (3 horas de incubação) com isoprenalina (10, 100 ou 1000 nM) induz produção de melatonina em células RAW 264.7 (B). Os dados foram normalizados pelo grupo veículo de cada experimento, e estão apresentados como média $\pm$ e.p.m., $n=4-9$ por grupo. *= $p<0,05$ em relação ao veículo.

A indução da produção de melatonina em glândulas pineais via estimulação de adrenoreceptores β é mediada pela ativação da adenilil ciclase – proteína quinase A – AMPc – CREB-P, que interage com elementos específicos no promotor do gene da AA-NAT levando à sua transcrição. CREB-P também ativa a enzima AA-NAT. Portanto, após demonstrar que adrenalina e noradrenalina induzem a fosforilação de AA-NAT e a síntese de melatonina em células RAW 264.7 passamos a avaliar se a forskolina (1×10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , e 3×10^{-7} ; 15 minutos), diterpeno que ativa diretamente a adenilil ciclase também poderia aumentar a forma fosforilada da AA-NAT. Como pode ser visto na figura

Resultados

8, forskolina reduziu de forma dependente da concentração a expressão de P-AA-NAT. Dessa forma, passamos a avaliar outro possível mecanismo responsável pela ação das catecolaminas.

Figura 8 – Curva de concentração-resposta de forskolina (0,01; 0,03; 0,1 e 0,3 μM – 15 minutos) reduz a expressão basal da imunoreatividade de P-AA-NAT em macrófagos RAW 264.7. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m., n=3 por grupo. *=p<0,05 em relação ao veículo. Os dados foram normalizados pelo grupo veículo.

Considerando que catecolaminas em macrófago peritoneal de camundongos e ratos ativam a via de sinalização NF-κB [4, 5, 96, 97] e que o promotor e primeiro intron do gene que codifica a enzima AA-NAT apresenta elementos κB [113] que quando estimulados levam à formação do RNAm e da proteína [4], passamos a avaliar se o mesmo ocorre nas células RAW 264.7. Além disso, também foi analisada o

Resultados

efeito de bloqueadores da via NF- κ B sobre a síntese de melatonina induzida por catecolaminas.

A incubação das células RAW 264.7 por 10 minutos com adrenalina (0,2 nM) ou noradrenalina (0,4 nM) causou a formação de 3 complexos proteicos, muito semelhantes ao observado nestas mesmas células ativadas com zimosan [4], e que foram chamados de C1, C2 e C3 (Figura 9A). A quantificação da densidade ótica de cada complexo revelou que ambas catecolaminas aumentaram a expressão de C1 e C2, quando comparado com o grupo veículo. No caso do complexo C3 apenas adrenalina induziu um aumento significativo da expressão da proteína presente no extrato nuclear (Figura 9B). Com o intuito de identificar quais subunidades da via NF- κ B estavam compondo os dímeros translocados ao núcleo em cada grupo, utilizamos anticorpos específicos para cada subunidade, de modo que uma vez que estes se ligam à sua subunidade específica, ocorre uma mudança conformacional, e conseqüentemente alteração no arrasto de cada complexo no gel, o *super-shift* (SS). No grupo veículo houve um atraso da corrida no gel, gerando uma banda SS nos extratos nucleares incubados com os anticorpos para Rel-A e c-Rel. Vale ressaltar que os anticorpos para Rel-A ou c-Rel incubados de forma isolada não foram capazes de induzir o retardo da banda.

Nas células tratadas com NAd 0,4 nM houve um retardo das bandas de NF- κ B nos extratos nucleares incubados com os anticorpos

Resultados

p50+Rel-A, c-Rel, p52 e Bcl3, enquanto as células tratadas com adrenalina (0,2 nM) foi detectado p50, Rel-A, p50+Rel-A, c-Rel, e Bcl3 (Figura 9C).

Figura 9 – Catecolaminas são capazes de induzir a translocação nuclear de NF-κB em suas concentrações de resposta máxima (Adr 0,2 nM e NAd 0,4 nM), após 10 minutos de incubação em células RAW 264.7. Os complexos proteicos gerados no ensaio foram denominados C1, C2 e C3 (A). Quantificação da densidade ótica (O.D.) dos complexos proteicos C1, C2 e C3. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m., n=3 por grupo; * = p<0,05 comparados ao grupo veículo (B). Estes géis demonstram o ensaio de *Super-Shift* (SS) com anticorpos para cada subunidade que podem compor os dímeros NF-κB, nos extratos proteicos nucleares de células

Resultados

tratadas exatamente como em A. As flechas pretas apontam para pontos onde houve atraso no arrasto dos complexos proteicos, demonstrando onde ocorreu ligação dos anticorpos (C).

Avaliamos, então, se as catecolaminas estariam tendo seu efeito mediado pela via NF- κ B na produção de melatonina. Utilizamos os bloqueadores da via NF- κ B, PDTC (25 μ M) e ALLN (50 μ M), pré-incubados por 30 minutos antes da adição de cada catecolamina (Adr 0,2 nM ou NAd 0,4 nM).

A quantificação da imunoreatividade para P-AA-NAT demonstrou que o bloqueio da via NF- κ B com PDTC ou ALLN resultou em uma inibição da indução da proteína fosforilada quer por NAd quer por Adr (Figura 10A). A seguir foi avaliada a importância desta via na produção da melatonina propriamente dita. Os inibidores de NF- κ B antagonizaram o aumento do conteúdo de melatonina induzido por noradrenalina (0,4 nM, 3 horas) comprovando que esta via de sinalização é desencadeada no processo induzido por noradrenalina. No caso da adrenalina (0,2 nM, 3h), o protocolo utilizado apenas mostrou uma tendência dos bloqueadores de NF- κ B em inibir a potenciação da produção de melatonina (Figura 10B).

Resultados

Figura 10 – O bloqueio da atividade da via NF-κB através da incubação prévia (30 min) com PDTC (25 μM) ou ALLN (50 μM) reverte o aumento gerado por Adr (0,2 nM) ou NAd (0,4 nM) sobre imunoreatividade de P-AA-NAT (15 minutos de incubação). Os dados estão apresentados como média ± e.p.m., n=3-5 por grupo (A). O mesmo tratamento que A, reverte o aumento gerado por NAd (0,4 nM) sobre o conteúdo de melatonina no meio de cultura das células (3 hrs de incubação). Os dados estão apresentados como média ± e.p.m., n=3-8 por grupo.

Para analisar a capacidade da melatonina em um modelo de resposta inflamatória onde a utilização de agonistas adrenérgicos fosse relevante, escolhemos avaliar o modelo de inflamação pulmonar aguda, no caso um modelo experimental que simula a asma, um processo inflamatório agudo nos pulmões. Este tipo de afecção é usualmente tratado com agonistas β-adrenérgicos [114-116]. Optamos por realizar uma abordagem *in vitro* com macrófagos alveolares de linhagem murina MH-S; e uma abordagem *in vivo* em camundongos C57BL/6, com o modelo de indução de lesão pulmonar aguda.

Resultados

Inicialmente utilizamos o modelo *in vitro* de macrófagos alveolares murinos MH-S, para avaliar a resposta das células imunocompetentes que estariam presentes nos pulmões, à melatonina. Analisamos a produção de citocinas pró-inflamatórias induzidas pela ativação de TLR4 com LPS. A incubação com LPS aumentou a produção de TNF, e tanto S-albuterol quanto melatonina reverteram parcialmente o efeito do LPS. A incubação conjunta de S-albuterol com melatonina foi capaz de reduzir o efeito do LPS neste ensaio, sugerindo que em conjunto, o efeito principal nesta inibição é do S-albuterol (Figura 11A). Em relação à dosagem de IL-1 β observamos que o LPS induziu aumento da síntese desta citocina após 4 horas de incubação, e que a melatonina potencializou este aumento, tendo seu efeito parcialmente revertido pela adição de S-albuterol (Figura 11B). Para a citocina IL-6, o LPS induziu um potente aumento, que não é bloqueado pelo agonista β_2 , S-albuterol, enquanto a melatonina é capaz de reduzir o conteúdo de IL-6 significativamente (Figura 11C).

Figura 11 - Conteúdo de citocinas pró-inflamatórias no sobrenadante das culturas dos macrófagos MH-S (10^6 céls/poço) incubados por 4 horas conforme os grupos descritos. Quantificação de TNF (A), IL-1 β (B) ou IL-6 (C) presente no sobrenadante após 4 horas de incubação. Cada grupo possui N= 3-8. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

A modulação da produção de citocinas pró-inflamatórias pela melatonina nos sugeriu a possibilidade desta indolamina poder regular também a polarização do fenótipo dos macrófagos alveolares entre os perfis M1 ou M2. Realizamos a análise da expressão gênica de *Nos2* ou *Arginase-1* como os parâmetros de caracterização do fenótipo nestas células, uma vez que a alta expressão de *Nos2* caracteriza o fenótipo M1, enquanto a elevada expressão de *arginase-1* identifica células polarizadas em M2 [112]. Avaliando a expressão gênica de *Nos2*,

Resultados

observamos que a melatonina a partir da concentração de 1 μM é capaz de reduzir bruscamente a expressão de *Nos2* dependente de LPS (Figura 12A). No caso da *Arginase-1*, o LPS é capaz de reduzir a expressão gênica desta enzima, mas a melatonina não exerce efeito sobre a inibição causada por LPS nestas condições (Figura 12B).

Figura 12 – Expressão gênica de *Nos2* ou *Arginase-1* em macrófagos MH-S (3×10^6 céls/poço) após 18 horas de incubação conforme os grupos demonstrados. Curva concentração-resposta de melatonina sobre a expressão gênica de *Nos2* (A). Curva concentração-resposta de melatonina na expressão gênica de *arginase-1* (B). Cada ponto possui N= 3-4. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média expressos em relação ao valor de transcrição de *Gapdh* obtidos na mesma corrida. Importante salientar que este valor foi usado como denominador porque não variou entre os experimentos.

Tendo mostrado que macrófagos de linhagem RAW 264.7 podiam produzir melatonina quando incubados com adrenalina ou noradrenalina, e que macrófagos alveolares MH-S seriam alvos válidos para a melatonina, tendo sua função alterada por esta indolamina,

Resultados

consideramos a possibilidade de que o agonista β_2 -adrenérgico, S-albuterol, apresentasse um efeito coordenado com a melatonina. E de fato, nos macrófagos MH-S tanto a melatonina quanto o S-abuterol tiveram um efeito anti-inflamatório. Passamos então para a abordagem *in vivo*. Para tanto, usamos o modelo de lesão pulmonar aguda por instilação intratraqueal de LPS [101]. Confirmamos o sucesso da indução da lesão através da expressão de *Tnf* em homogenatos de tecido pulmonar (figura 13A). O aumento de 120 vezes na expressão de Tnf observado com a instilação de LPS, foi bloqueado quando era instilado em conjunto o agonista seletivo β_2 -adrenérgico S-albuterol (30 μ l de uma solução 10^{-5} M). Realizamos a dosagem de citocinas no lavado broncoalveolar de camundongos obtido após 6 horas de instilação de LPS. A dosagem de TNF acompanhou o aumento na expressão de seu gene, e apresentou diferença entre os grupos, mostrando o efeito já conhecido do LPS, que aumentou a produção de TNF nos animais testados, e o efeito anti-inflamatório do S-albuterol também foi confirmado. A melatonina foi capaz de mimetizar o efeito anti-inflamatório do agonista β_2 , existindo inclusive diferença estatística entre o grupo LPS + S-albuterol contra LPS + Melatonina, sugerindo um efeito mais potente por parte da melatonina em relação à modulação da síntese de TNF nestas condições (Figura 13B). A quantificação de IL-1 β foi relativamente baixa, e apesar de uma tendência de aumento induzida por LPS, não houve nenhuma diferença estatística entre os grupos (Figura 13C). A quantificação de IL-6 mostrou uma resposta

Resultados

similar ao TNF, onde tanto o S-albuterol quanto a melatonina foram capazes de reverter o efeito do LPS de forma similar (Figura 13D).

Figura 12 – Expressão do gene *Tnf* em homogenato de pulmões de camundongos C57BL/6 submetidos a lesão pulmonar aguda induzida por instilação traqueal de LPS (60 μg), após 6 horas da injeção (i.t.) (A). Conteúdo de citocinas pró-inflamatórias no lavado broncoalveolar de camundongos C57BL/6 submetidos à lesão pulmonar aguda induzida por LPS. Quantificação de TNF (B), IL-1β (C) ou IL-6 (D) presente no LBA após 6 horas de injeção (i.t.) de 30 μL de PBS estéril com as drogas nas concentrações especificadas em cada grupo experimental. Cada grupo possui N= 3-4. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média.

Resultados

Nos mesmos tecidos também foi avaliada a expressão do gene que codifica a enzima AA-NAT, uma vez que determinamos a capacidade de modulação da resposta inflamatória que a melatonina exerce neste modelo. A expressão de *Aa-nat* induzida por LPS em pulmão de camundongos foi bloqueada por S-albuterol, indicando que catecolaminas endógenas atuando sobre receptores β_2 -adrenérgico reverterem a síntese de melatonina induzida por um agente que ativa a via NF- κ B.

Figura 13 – Expressão gênica de *Aa-nat* em homogenato de pulmões de camundongos C57BL/6 submetidos a lesão pulmonar aguda induzida por instilação traqueal de LPS (60 µg). Expressão gênica de *Aa-nat* induzida por LPS 60 µg após 6 horas da injeção (i.t.). Cada grupo possui N= 3-5. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média expressos em relação ao valor de transcrição de *Gapdh* obtidos na mesma corrida. Importante salientar que este valor foi usado como denominador porque não variou entre os experimentos.

Resultados

Demonstramos que catecolaminas são capazes de induzir a produção de melatonina em macrófagos RAW 264.7, por uma via dependente de NF- κ B. Demonstramos também que a melatonina pode atuar como um modulador da resposta inflamatória em pulmões, tendo como alvo macrófagos alveolares (MH-S), e também apresentando efeito *in vivo*, induzindo uma redução na produção de citocinas pró-inflamatórias e reduzindo a polarização de macrófagos alveolares para o fenótipo M1, que está relacionado com potente atividade inflamatória, sem necessariamente influenciar a polarização para um perfil M2. Como seria de se esperar, a ativação de NF- κ B por LPS nos tecidos pulmonares também foi capaz de induzir expressão da enzima chave na síntese de melatonina, a AA-NAT. Resta averiguar como a ativação β_2 -adrenérgica estaria reduzindo a expressão do gene desta enzima, uma vez que observamos que a ativação β -adrenérgica *in vitro* é responsável pelo aumento da enzima AA-NAT e também da produção de melatonina.

Discussão

Discussão

Neste trabalho é demonstrado pela primeira vez que a ativação de adrenoreceptores β em macrófagos induz a síntese de melatonina. Um outro fato relevante é que a sinalização dos adrenoreceptores β é feita através da via NF- κ B e não depende da ativação de adenilil ciclase, abrindo uma nova perspectiva para interação de catecolaminas e melatonina em células imunocompetentes. Este dado mostra uma outra face da interação de catecolaminas com macrófagos, visto que a literatura fortemente indica que estas aminas teriam uma ação anti-inflamatória [101-105, 116]. Para avaliar a relevância deste achado “*in vivo*” verificamos o efeito de um agonista β_2 -adrenérgico, classicamente usado como anti-inflamatório, sobre a expressão do gene que codifica a enzima AA-NAT em pulmões obtidos de um modelo de asma. Estes dados mostram um efeito oposto ao observado com a linhagem de células RAW 264.7, visto que S-albuterol reduziu de forma marcante a expressão de *Aa-nat* induzida por LPS. Portanto, este trabalho abre a perspectiva de que catecolaminas regulem de forma direta a produção de melatonina por macrófagos, e indica que há necessidade de ampliar estes estudos visto que os efeitos devem depender do estágio de ativação dos mesmos.

Nossos dados apontam para a possibilidade de melatonina ser produzida no tecido pulmonar durante uma resposta inflamatória localizada, e que a utilização de agonistas β_2 -adrenérgicos pode bloquear a produção de melatonina nesta situação. Nossos achados evidenciam uma aparente controvérsia entre os dados *in vitro* com os *in*

Discussão

vivo, uma vez que a síntese de melatonina em macrófagos é ativada pela ativação de adrenoceptores β .

Este “paradoxo”, evidenciado neste trabalho, abre novos horizontes para a compreensão dos efeitos da melatonina, uma molécula ubíqua e multitarefa.

Demonstramos pela primeira vez, que o estímulo adrenérgico em macrófagos RAW 264.7 pode desencadear a produção de melatonina, como consequência do aumento detectado na enzima AA-NAT, seja em sua forma total ou fosforilada. A participação crucial dos adrenoceptores β foi observada tanto no aumento da P-AA-NAT quanto na produção de melatonina. Como esperado, as catecolaminas foram capazes de induzir a translocação nuclear de NF- κ B acarretando na síntese de melatonina, o que foi observado no presente trabalho e também publicações prévias de nosso grupo [4, 5].

Considerando que em 15 minutos de incubação com os agonistas adrenérgicos já observamos aumento na expressão da AA-NAT total, pode-se supor que ocorra um aumento da expressão gênica da *Aa-nat*, uma vez que se não for fosforilada, a enzima é rapidamente degradada (meia vida de 3 a 5 minutos) [117, 118], mas também pode ser possível que uma forma pré-enzimática da AA-NAT esteja disponível e após o estímulo esta sofra alterações através de mecanismos pós-transcricionais como é observado quando há pulso de luz em animais durante a fase de escuro, e a quantidade da enzima AA-NAT diminui na

Discussão

glândula pineal mesmo com elevada quantidade RNAm para a *Aa-nat* [117]. Uma observação importante é que em números absolutos, a quantidade da enzima AA-NAT em sua forma fosforilada aumenta muito mais que sua forma total, com o mesmo tratamento (P-AA-NAT: cerca de 800% para adrenalina e 400% para a noradrenalina; AA-NAT total: cerca de 25% para adrenalina e 170% para noradrenalina), o que pode indicar que o efeito das catecolaminas neste modelo está muito mais relacionando com o processo de induzir a fosforilação, e com isso ativação da enzima, do que com sua transcrição [119, 120].

O bloqueio na expressão de P-AA-NAT e na síntese de melatonina gerada pelo propranolol, um antagonista β -adrenérgico não-seletivo (ou seja, bloqueia a ação de todas as isoformas de adrenoreceptores β) é coerente com o fato de que a adrenalina teve maior potência no aumento da P-AA-NAT do que a noradrenalina, e de fato, é a catecolamina que apresenta maior potência sobre os adrenoreceptores β [121]. Como citado anteriormente, a maior parte do efeito anti-inflamatório induzido por catecolaminas ocorre através de adrenoreceptores β [101-106], e que a ativação de adrenoreceptores α está mais relacionada com a ação pró-inflamatória [96, 97, 109]. A observação de que a ativação seletiva dos adrenoreceptores β , com isoprenalina, induz a síntese de melatonina pode sugerir que a melatonina estaria envolvida com a fase de resolução da resposta inflamatória. Todavia, a adrenalina apresenta maior afinidade e potência para adrenoreceptores α do que para β , e podemos ter deixado

Discussão

de detectar este efeito nos experimentos realizados. Não seria este um aparente efeito oposto ao esperado?

Antes de confirmarmos que ambas catecolaminas ativam NF- κ B no nosso modelo celular, já sabíamos que a via NF- κ B (que é a via de sinalização característica e central na resposta de defesa) é necessária para a síntese de melatonina em células imunocompetentes [4, 5, 51]. Sempre consideramos a síntese de melatonina neste tipo celular como um efeito que acompanha a ativação da resposta de defesa inata, ou seja, dentro de um contexto pró-inflamatório. Este viés pode ser justificado pela observação de potenciação da fagocitose por melatonina, um fenômeno crucial na primeira etapa da resposta inflamatória [4, 5].

Com base nestas informações poderíamos supor que existiria, nas células imunocompetentes, um balanço de fatores para que a sinalização adrenérgica desencadeie a produção de melatonina, como a expressão de cada um dos adrenoreceptores possíveis, ou o estado basal da via NF- κ B nas células. Além do fato de que os efeitos observados em células imunocompetentes são diferentes quando a ativação adrenérgica é acompanhada ou não por uma ativação imunogênica. Esta última prerrogativa apresenta considerável embasamento na literatura. Especificamente na linhagem murina de macrófagos RAW 264.7, foi observado que a ativação de adrenoreceptores β_2 sem um estímulo inflamatório induz aumento no RNAm e no conteúdo proteico de IL-1 β e

Discussão

IL-6, duas citocinas de ação pró-inflamatória [122]. Foi observado também que a ativação isolada de adrenocetores β gera aumento de arginase, mas seguida de incubação com LPS este efeito é oposto [107]. A formação de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) é um evento fundamental para a resposta de defesa contra microrganismos, e a ativação de adrenocetores β com isoprenalina induz a produção de ROS em macrófagos RAW 264.7 [108]. Em macrófagos peritoneais murinos primários, a ativação de adrenocetores β_2 potencia a produção da citocina pró-inflamatória IL-6 induzida por material particulado oriundo de poluição do ar [123].

Em modelos experimentais de asma, foi sugerido que adrenocetores β_2 , que usualmente sinalizam via proteína G_{as} e consequentemente AMPc, geram um efeito anti-inflamatório; entretanto estes receptores poderiam sinalizar alternativa e concomitantemente via β -arrestina, o que acabaria por induzir uma ação pró-inflamatória [116]. Esta informação é relevante no contexto deste trabalho uma vez que testamos isoladamente o ativador de adenilil ciclase, a forskolina, e observamos que o aumento de AMPc isoladamente reduziu P-AA-NAT abaixo dos valores basais. A indução de P-AA-NAT e melatonina dependente de catecolaminas poderia ser, de fato, relacionado à uma sinalização via β -arrestina, que induz sinalização inflamatória [124-126], o que poderia acionar NF- κ B, como observamos, e seria coerente com o dado observado com forskolina. Evidentemente, visto que este tipo de sinalização via β -arrestina foi observado em adrenocetores β_2 ,

Discussão

em nosso modelo experimental temos que considerar que adrenoceptores α também estão sendo ativados, uma vez que ambas catecolaminas podem ativar este grupo de receptores adrenérgicos. Mas como já citado, a ativação de adrenoceptores α induz uma resposta pró-inflamatória [96, 97], fato que vai na mesma direção dos dados aqui apresentados, se considerarmos a síntese de melatonina como um evento integrante da fase inicial da resposta imune.

É interessante pontuar que não apenas no caso da via NF- κ B a síntese de melatonina é regulada de formas opostas na glândula pineal e nas células imunocompetentes [51]. Foi demonstrado há alguns anos que a incubação da glândula pineal com forskolina induz o aumento da expressão e atividade da AA-NAT [127], exatamente o oposto do que observamos.

Realizamos inicialmente experimentos com catecolaminas exógenas, e observamos seu efeito nos macrófagos RAW 264.7. Entretanto, tanto as células imunocompetentes [96, 98] quanto o sistema nervoso autônomo (e suas terminações) e as adrenais poderiam ser fontes de catecolaminas *in vivo*. Apesar de não avaliarmos este tipo de sinalização traçando a origem das catecolaminas *in vivo*, decidimos abordar como o sistema de produção de melatonina dependente de catecolaminas seria relevante em um contexto *de* lesão pulmonar. O modelo experimental de lesão pulmonar aguda é o modelo que foi utilizado inicialmente para a observação tanto da produção de

Discussão

catecolaminas em uma resposta de defesa *in vivo* quanto para avaliar como estas catecolaminas estariam atuando neste modelo [96, 97, 101]. Nestes mesmos trabalhos foi avaliada a produção e função das catecolaminas em macrófagos e neutrófilos, acessando assim a funcionalidade de um modelo *in vitro*.

Avaliamos como a melatonina poderia modular a resposta inflamatória em um modelo estabelecido, onde temos a presença de macrófagos alveolares que poderiam, potencialmente, produzir melatonina dentro da resposta contra a lesão.

Para avaliar a função da melatonina em macrófagos alveolares utilizamos a linhagem de murina de macrófagos alveolares MH-S, no intuito de determinar o efeito em células semelhantes ao que seria encontrado *in vivo*.

Estas células usualmente são utilizadas como modelo para avaliar o efeito de alérgenos e antígenos que poderiam desencadear reações de asma alérgica [128, 129]. Foi demonstrado que esta linhagem celular apresenta resposta à agonista de TLRs 2 e 4, com elevada produção de TNF ou NO [130], o que dá razoável suporte ao modelo experimental abordado e também permite considerável grau de comparação/extrapolação para com o modelo *in vivo* de lesão pulmonar aguda que utilizamos.

Na avaliação da produção de citocinas, confirmamos novamente o efeito anti-inflamatório do agonista adrenérgico β_2 , e também da

Discussão

melatonina, sobre a produção de TNF. A produção de TNF nestas células quando ativadas com LPS já foi observado por outros grupos em diferentes tempos experimentais, assim como após exposição a antígenos animais [129, 130]. O efeito anti-inflamatório do S-albuterol não ocorreu sobre a produção de IL-6, mas a melatonina causou redução do conteúdo desta citocina no sobrenadante das culturas celulares.

A produção de IL-1 β não foi reduzida pelo S-albuterol na concentração utilizada, e interessantemente, a melatonina potencializou a produção de IL-1 β dependente de LPS. Neste caso, o S-albuterol reverteu a potenciação causada pela melatonina. Parece ser plausível que a melatonina regula de forma diferencial as diferentes citocinas, apesar destas estarem incluídas no mesmo “pacote” de resposta [1, 101], no caso, de ação pró-inflamatória. No tocante ao resultado observado no ensaio de quantificação de IL-1 β , e ressaltando que no ensaio *in vivo*, nem a melatonina nem o S-albuterol alteraram a produção de IL-1 β , podemos primeiramente considerar que o tempo/concentração utilizados não foram adequados para observar uma alteração na IL-1 β , uma vez que a IL-1 β é produzida em um tempo diferente do TNF, por exemplo, já que sua produção depende da formação do inflamassoma, liberação de ATP, e amadurecimento do precursor do IL-1 β [131]. Outro ponto de interesse seria que a ativação do adrenoceptor β_2 antagonizou o efeito potenciador da melatonina. Seria possível supor que neste contexto de ativação mediada por um

imunógeno como o LPS, o adrenoceptor β_2 realize sua sinalização principalmente pela proteína G_{as} , mediando assim uma função anti-inflamatória [116, 125]. Possivelmente no caso da regulação específica da IL-1 β , a melatonina estaria agindo via receptores de melatonina MT1/2, que usualmente são acoplados à proteína G_{ai} , ocasionando uma diminuição da quantidade de AMPc [77], o que se contrapõem ao efeito do adrenoceptor β_2 .

Na intenção de nos aprofundarmos na avaliação do efeito da melatonina sobre a resposta destes macrófagos, optamos por medir o balanço da polarização para os fenótipos M1 ou M2. Diversas abordagens podem ser adotadas neste tipo análise, como por exemplo dosar as citocinas características de cada etapa de resposta, como TNF, IL-6, IL-1 β (entre outras) para um perfil mais M1 [101], ou IL10, IL-4 e IL-12 para um perfil mais M2 [132-134]. Outra abordagem seria avaliar a expressão das enzimas iNOS e Arginase-1, que são bastante características para os fenótipos M1 e M2, respectivamente [134].

Os resultados obtidos na avaliação de diferenciação de fenótipo nos mostraram que a melatonina tem um potente efeito inibitório sobre a expressão de *Nos2*, um dado que é coerente com dados anteriores de nosso grupo, onde a melatonina reduz de forma concentração-dependente a imunoreatividade para iNOS [21]. Em relação à *arginase-1*, uma enzima que compete diretamente por substrato com a iNOS e é característica na asma [135, 136], a melatonina não foi capaz de gerar

Discussão

nenhum efeito mensurável, sugerindo que a melatonina seria capaz de inibir a polarização M1, sem necessariamente potenciar o fenótipo M2. Considerando os efeitos observados da melatonina em células imunocompetentes, como potenciar fagocitose ou mediar a produção de IL-2 [4, 5, 137], pode-se considerar que ela exerceria um efeito mais voltado para a efetuação da resposta de defesa inata, que ocorre nos primeiros momentos de contato com um potencial patógeno. O efeito que observamos neste experimento já está em um ponto temporal mais adiantado em relação a resposta inata inicial, e coincide com as observações de que a melatonina teria um efeito anti-inflamatório, como inibir iNOS através do bloqueio da atividade de NF- κ B [20, 21, 138].

O efeito pró-inflamatório induzido por LPS nos pulmões é refletido pelo conteúdo de citocinas pró-inflamatórias no lavado broncoalveolar, que apresenta aumento do TNF e IL-6, que é semelhante ao observado no modelo de LPA induzido pela imunoglobulina IgG [101], e tanto o agonista adrenérgico β_2 , que tem função anti-inflamatória [101], quanto a melatonina, bloqueiam o aumento induzido por LPS.

Observamos a presença e aumento do RNAm para *Aa-nat* nos homogenatos de pulmão dos animais submetidos à LPA. O aumento na expressão de *Aa-nat* induzida por LPS foi considerada coerente com os dados que temos publicado nos últimos anos, e apesar de não podermos apontar com precisão quais células nos pulmões estão expressando *Aa-nat*, podemos sugerir que, como os pulmões são a

Discussão

maior superfície de contato de um mamífero com o meio externo, a maior parte desta AA-NAT deve ser oriunda de células epiteliais ou (em menor escala) de macrófagos alveolares residentes e neutrófilos recrutados. É conhecido que a melatonina é produzida pelas células do epitélio respiratório [63], e conjuntamente com os macrófagos [4, 5], que estariam presentes nos pulmões, podemos seguramente sugerir que a presença da AA-NAT nos pulmões como um todo seria esperada. O efeito anti-inflamatório do agonista adrenérgico β_2 [101], o S-albuterol é observado, tanto pela redução da expressão de *Tnf* quanto pela redução da *Aa-nat* induzida por NF- κ B [4, 5].

Desta forma, os dados apresentados nesta tese nos permite afirmar que a ativação de NF- κ B por agonistas adrenérgicos em macrófagos RAW 264.7 é capaz de induzir aumento na expressão de AA-NAT, aumento em sua fosforilação, o que é acompanhado pela síntese de melatonina. Este efeito ocorre via NF- κ B, mas não via AMPc isoladamente, possivelmente pelo requerimento da ativação de NF- κ B; ou porque este efeito mediado por adrenoceptores β estaria utilizando a cascata de sinalização pró-inflamatória dos GPCRs (ao invés da sinalização via AMPc), a β -arrestina [116, 124, 125]. Entretanto esta hipótese ainda precisaria ser comprovada empiricamente.

Compreender o mecanismo que diferencia o efeito da ativação de adrenoceptores β nos macrófagos ou em condições inflamatórias *in vivo*

Discussão

é uma nova questão levantada por este trabalho, no que se relaciona à síntese de melatonina.

Nos resta ainda compreendermos como este efeito estaria inserido em uma situação de estresse mas onde não houvesse uma infecção, sendo que uma descarga de catecolaminas na circulação poderia ocorrer nestas condições. Seria interessante considerar a possibilidade de melatonina, após avaliação mais extensa de seus efeitos, ser ministrada conjuntamente com medicamentos contra asma (como é o caso do S-albuterol), uma vez que existe uma somatória na redução de TNF no modelo de lesão pulmonar, o que poderia reduzir a intensidade do processo inflamatório nas vias aéreas como um todo.

Conclusões

Conclusões

O presente trabalho nos permite as seguintes conclusões:

- I. As catecolaminas adrenalina e noradrenalina são capazes de induzir aumento na expressão da enzima AA-NAT total ou sua forma fosforilada em macrófagos murinos de linhagem RAW 264.7;
- II. Esta indução na expressão de P-AA-NAT é mediada por receptores β -adrenérgicos;
- III. O aumento da P-AA-NAT induzido pelas catecolaminas, é refletido na presença de melatonina no sobrenadante das culturas celulares, e o agonista β -adrenérgico isoprenalina também é capaz de induzir esta produção;
- IV. Catecolaminas induzem a translocação de subunidades do NF- κ B que apresentam TAD (Rel-A e c-Rel), assim como observado com zimosan [4], mas diferentes subunidades foram detectadas neste caso (p52 e Bcl3);
- V. A produção de melatonina induzida pela ativação adrenérgica dos macrófagos RAW 264.7 é dependente da ativação da via NF- κ B;
- VI. A ativação isolada de adenilil ciclase com forskolina causou a redução na expressão de P-AA-NAT, o que sugere uma sinalização alternativa dos receptores adrenérgicos envolvidos, não a sinalização clássica de GPCRs via AMPc;

Conclusões

- VII. Nos macrófagos alveolares MH-S, a melatonina também reduz a produção das citocinas TNF e IL-6 induzidas por LPS, mas no caso da IL-1 β , ela potencializou o efeito do LPS;
- VIII. A melatonina modula o processo de polarização do fenótipo (M1/M2) de macrófagos MH-S, de modo a reduzir a expressão de *Nos2* (*iNOS*), mas sem alterar *arginase-1*.
- IX. Existe expressão de *Aa-nat* no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6, e a injeção traqueal de LPS aumenta a expressão deste gene;
- X. Melatonina exógena modula a resposta inflamatória na lesão pulmonar aguda induzida por LPS, atuando de forma semelhante ao agonista β_2 -adrenérgico S-albuterol, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias;

Resumo

Resumo

Macrófagos são capazes de sintetizar melatonina quando ativados por agonistas de TLRs de forma dependente da ativação da via NF- κ B. A melatonina produzida pelos macrófagos está relacionada com o favorecimento da fagocitose de partículas ricas em manose. Catecolaminas são capazes de ativar a via NF- κ B em células imunocompetentes, e são produzidas por estas células quando ativadas. É conhecido que a descarga noturna de noradrenalina na glândula pineal é responsável pela produção de melatonina na fase de escuro. Hipotetizamos que catecolaminas, ao exemplo da glândula pineal, pudessem induzir a síntese de melatonina em macrófagos. Avaliamos se agonistas adrenérgicos poderiam regular a produção de melatonina nos macrófagos RAW 264.7. Analisamos também o efeito da melatonina em conjunto com agonistas adrenérgicos no modelo experimental de lesão pulmonar aguda. Ambas catecolaminas foram capazes de aumentar a expressão da enzima AA-NAT total ou fosforilada e induzir a síntese de melatonina, via ativação de β -adrenoceptores; sendo dependente de NF- κ B, e não da sinalização mediada por AMPc. A instilação de LPS nos pulmões dos camundongos induz a expressão de *Tnf* e de *Aa-nat*, o que é inibido pelo agonista β_2 -adrenérgico. A melatonina exerce um efeito anti-inflamatório na produção de citocinas *in vivo* e *in vitro*, além de inibir a expressão de *Nos2* em macrófagos MH-S, sem alterar *arginase-1*. Os dados aqui apresentados sugerem que a via de sinalização NF- κ B faz a integração da sinalização adrenérgica com a produção de melatonina em macrófagos.

Abstract

Abstract

TLRs-activated macrophages can synthesize melatonin in a NF- κ B pathway-mediated manner. Macrophage-produced melatonin is related to the favoring of mannose-rich particles phagocytosis. Catecholamines can trigger NF- κ B pathway in immunocompetent cells, and are produced after activation. It is well known that the nocturnal surge of noradrenaline in the pineal gland is responsible for the dark phase melatonin synthesis. We hypothesized that catecholamines, like in pineal gland, could induce melatonin synthesis by macrophages. We evaluated if adrenergic agonists could regulate melatonin production in RAW 264.7 macrophages. We also analyzed the effect of melatonin together with adrenergic agonist in the experimental model of acute lung injury. Both catecholamines were able to increase the expression of total or phosphorylated AA-NAT enzyme, and induce melatonin synthesis through β -adrenoceptor activation; in a NF- κ B-dependent way, but not by the cAMP signaling. LPS instillation in the mice lungs induces *Tnf* and *Aa-nat* expression, which is inhibited by the β_2 -adrenergic agonist. Melatonin exerts an anti-inflammatory effect in cytokine production both *in vivo* and *in vitro*, besides the inhibition of *Nos2* in MH-S macrophages, without changing *arginase-1*. The presented data suggests that the NF- κ B signaling pathway fulfill the integration of adrenergic signaling with melatonin synthesis in macrophages.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

1. Janeway C. Immunobiology 5 : the immune system in health and disease. In, Garland Pub., New York, 2001; pp. xviii, 732 p.
2. Janeway CA. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect* 2001; **3**:1167-1171.
3. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002; **420**:853-9.
4. Muxel SM, Pires-Lapa MA, Monteiro AW et al. NF-kappaB drives the synthesis of melatonin in RAW 264.7 macrophages by inducing the transcription of the arylalkylamine-N-acetyltransferase (AA-NAT) gene. *PLoS One* 2012; **7**:e52010.
5. Pires-Lapa MA, Tamura EK, Salustiano EM et al. Melatonin synthesis in human colostrum mononuclear cells enhances dectin-1-mediated phagocytosis by mononuclear cells. *J Pineal Res* 2013; **55**:240-6.
6. Mosser DM , Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**:958-69.
7. Lee J, Cacalano G, Camerato T et al. Chemokine binding and activities mediated by the mouse IL-8 receptor. *J Immunol* 1995; **155**:2158-64.
8. Bozic CR, Gerard NP, Von Uexkull-Guldenband C et al. The murine interleukin 8 type B receptor homologue and its ligands. Expression and biological characterization. *J Biol Chem* 1994; **269**:29355-8.
9. Farsky SP, Sannomiya P , Garcia-Leme J. Secreted glucocorticoids regulate leukocyte-endothelial interactions in inflammation. A direct vital microscopic study. *J Leukoc Biol* 1995; **57**:379-86.
10. Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ et al. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* 2003; **197**:1107-17.
11. Ruland J. CARD9 signaling in the innate immune response. *Ann N Y Acad Sci* 2008; **1143**:35-44.
12. Banchereau J , Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; **392**:245-52.
13. Mayadas TN, Cullere X , Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol* 2014; **9**:181-218.
14. Aderem A , Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999; **17**:593-623.
15. Akira S , Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; **4**:499-511.
16. Kawai T , Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 2007; **13**:460-9.
17. Hayden MS , Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 2008; **132**:344-62.
18. Riedl MA , Nel AE. Importance of oxidative stress in the pathogenesis and treatment of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008; **8**:49-56.
19. Ciencewicki J, Trivedi S , Kleeberger SR. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2008; **122**:456-68; quiz 469-70.
20. Aparicio-Soto M, Alarcon-De-La-Lastra C, Cardeno A et al. Melatonin modulates microsomal PGE synthase 1 and NF-E2-related factor-2-regulated antioxidant enzyme expression in LPS-induced murine peritoneal macrophages. *Br J Pharmacol* 2014; **171**:134-44.
21. Tamura EK, Cecon E, Monteiro AW et al. Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells. *J Pineal Res* 2009; **46**:268-74.

Referências Bibliográficas

22. Silva CL, Tamura EK, Macedo SM et al. Melatonin inhibits nitric oxide production by microvascular endothelial cells in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol* 2007; **151**:195-205.
23. Tan DX, Manchester LC, Terron MP et al. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 2007; **42**:28-42.
24. Kaczanowska S, Joseph AM, Davila E. TLR agonists: our best frenemy in cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol* 2013; **93**:847-63.
25. Beutler B. Microbe sensing, positive feedback loops, and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Immunol Rev* 2009; **227**:248-63.
26. Lerman YV, Lim K, Hyun YM et al. Sepsis lethality through exacerbated tissue infiltration and TLR-induced cytokine production by neutrophils is dependent on integrin alpha3beta1. *Blood* 2014.
27. Mantegazza AR, Zajac AL, Twelvetees A et al. TLR-dependent phagosome tubulation in dendritic cells promotes phagosome cross-talk to optimize MHC-II antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014.
28. Meana C, Pena L, Lorden G et al. Lipin-1 Integrates Lipid Synthesis with Proinflammatory Responses during TLR Activation in Macrophages. *J Immunol* 2014; **193**:4614-22.
29. Brown GD, Taylor PR, Reid DM et al. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med* 2002; **196**:407-12.
30. Yonekawa A, Saijo S, Hoshino Y et al. Dectin-2 is a direct receptor for mannose-capped lipoarabinomannan of mycobacteria. *Immunity* 2014; **41**:402-13.
31. Manoharan I, Hong Y, Suryawanshi A et al. TLR2-Dependent Activation of beta-Catenin Pathway in Dendritic Cells Induces Regulatory Responses and Attenuates Autoimmune Inflammation. *J Immunol* 2014; **193**:4203-13.
32. Vogelpoel LT, Hansen IS, Visser MW et al. FcgammaRIIa cross-talk with TLRs, IL-1R, and IFNgammaR selectively modulates cytokine production in human myeloid cells. *Immunobiology* 2014.
33. Brown J, Wang H, Hajishengallis GN et al. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J Dent Res* 2011; **90**:417-27.
34. Listwak SJ, Rathore P, Herkenham M. Minimal NF-kappaB activity in neurons. *Neuroscience* 2013; **250**:282-99.
35. Adler AS, Sinha S, Kawahara TL et al. Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF-kappaB activity. *Genes Dev* 2007; **21**:3244-57.
36. Cecon E, Fernandes PA, Pinato L et al. Daily variation of constitutively activated nuclear factor kappa B (NFkB) in rat pineal gland. *Chronobiol Int* 2010; **27**:52-67.
37. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002; **109 Suppl**:S81-96.
38. Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; **5**:392-401.
39. Herre J, Gordon S, Brown GD. Dectin-1 and its role in the recognition of beta-glucans by macrophages. *Mol Immunol* 2004; **40**:869-76.

Referências Bibliográficas

40. Karsten CM , Kohl J. The immunoglobulin, IgG Fc receptor and complement triangle in autoimmune diseases. *Immunobiology* 2012; **217**:1067-79.
41. He JQ, Wiesmann C , Van Lookeren Campagne M. A role of macrophage complement receptor CR1g in immune clearance and inflammation. *Mol Immunol* 2008; **45**:4041-7.
42. Park YM. CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Exp Mol Med* 2014; **46**:e99.
43. Shao HJ, Jeong JB, Kim KJ et al. Anti-inflammatory activity of mushroom-derived hispidin through blocking of NF-kappaB activation. *J Sci Food Agric* 2014.
44. Choi YH, Kim GY , Lee HH. Anti-inflammatory effects of cordycepin in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages through Toll-like receptor 4-mediated suppression of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB signaling pathways. *Drug Des Devel Ther* 2014; **8**:1941-53.
45. Lee JE, Cho SM, Park E et al. Anti-inflammatory effects of *Rubus coreanus* Miquel through inhibition of NF-kappaB and MAP Kinase. *Nutr Res Pract* 2014; **8**:501-8.
46. Seo KH, Park MJ, Ra JE et al. Saponarin from barley sprouts inhibits NF-kappaB and MAPK on LPS-induced RAW 264.7 cells. *Food Funct* 2014; **5**:3005-13.
47. Pawlak J, Singh J, Lea RW et al. Effect of melatonin on phagocytic activity and intracellular free calcium concentration in testicular macrophages from normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 2005; **275**:207-13.
48. Da Silveira Cruz-Machado S, Carvalho-Sousa CE, Tamura EK et al. TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFkB pathway. *J Pineal Res* 2010; **49**:183-92.
49. Carvalho-Sousa CE, Da Silveira Cruz-Machado S, Tamura EK et al. Molecular basis for defining the pineal gland and pinealocytes as targets for tumor necrosis factor. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2011; **2**:10.
50. Da Silveira Cruz-Machado S, Pinato L, Tamura EK et al. Gliapinealocyte network: the paracrine modulation of melatonin synthesis by tumor necrosis factor (TNF). *PLoS One* 2012; **7**:e40142.
51. Markus RP, Cecon E , Pires-Lapa MA. Immune-Pineal Axis: Nuclear Factor kappaB (NF-kB) Mediates the Shift in the Melatonin Source from Pinealocytes to Immune Competent Cells. *Int J Mol Sci* 2013; **14**:10979-97.
52. Simonneaux V , Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 2003; **55**:325-95.
53. Klein DC , Weller JL. Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science* 1970; **169**:1093-5.
54. Carrillo-Vico A, Calvo JR, Abreu P et al. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *Faseb J* 2004; **18**:537-9.
55. Martins E, Jr., Ferreira AC, Skorupa AL et al. Tryptophan consumption and indoleamines production by peritoneal cavity macrophages. *J Leukoc Biol* 2004; **75**:1116-21.

Referências Bibliográficas

56. Maldonado MD, Mora-Santos M, Naji L et al. Evidence of melatonin synthesis and release by mast cells. Possible modulatory role on inflammation. *Pharmacol Res* 2010; **62**:282-7.
57. Bertrand PP, Bertrand RL, Camello PJ et al. Simultaneous measurement of serotonin and melatonin from the intestine of old mice: the effects of daily melatonin supplementation. *J Pineal Res* 2010; **49**:23-34.
58. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T et al. Role of melatonin in upper gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol* 2007; **58 Suppl 6**:23-52.
59. Raikhlina NT, Kvetnoy IM. Melatonin and enterochromaffine cells. *Acta Histochem* 1976; **55**:19-24.
60. Abe M, Itoh MT, Miyata M et al. Detection of melatonin, its precursors and related enzyme activities in rabbit lens. *Exp Eye Res* 1999; **68**:255-62.
61. Coto-Montes AM, Rodriguez-Colunga MJ, Tolivia D et al. Immunocytochemical localization of melatonin in the hardyian gland of Syrian hamster. *Anat Rec* 1996; **245**:13-6.
62. Stefulj J, Hortner M, Ghosh M et al. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res* 2001; **30**:243-7.
63. Kvetnoy IM. Extrapineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system. *Histochem J* 1999; **31**:1-12.
64. Gomez-Corvera A, Cerrillo I, Molinero P et al. Evidence of immune system melatonin production by two pineal melatonin deficient mice, C57BL/6 and Swiss strains. *J Pineal Res* 2009; **47**:15-22.
65. Sagrillo-Fagundes L, Soliman A, Vaillancourt C. Maternal and placental melatonin: actions and implication for successful pregnancies. *Minerva Ginecol* 2014; **66**:251-66.
66. Sanchez-Hidalgo M, De La Lastra CA, Carrascosa-Salmoral MP et al. Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. *Exp Gerontol* 2009; **44**:328-34.
67. Tijmes M, Pedraza R, Valladares L. Melatonin in the rat testis: evidence for local synthesis. *Steroids* 1996; **61**:65-8.
68. Itoh MT, Ishizuka B, Kudo Y et al. Detection of melatonin and serotonin N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase activities in rat ovary. *Mol Cell Endocrinol* 1997; **136**:7-13.
69. Itoh MT, Ishizuka B, Kuribayashi Y et al. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. *Mol Hum Reprod* 1999; **5**:402-8.
70. Fischer TW, Sweatman TW, Semak I et al. Constitutive and UV-induced metabolism of melatonin in keratinocytes and cell-free systems. *FASEB J* 2006; **20**:1564-6.
71. Kalsbeek A, Palm IF, La Fleur SE et al. SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *J Biol Rhythms* 2006; **21**:458-69.
72. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Alvarez-Sanchez N et al. Melatonin: buffering the immune system. *Int J Mol Sci* 2013; **14**:8638-83.
73. Pontes GN, Cardoso EC, Carneiro-Sampaio MM et al. Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) - melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. *J Pineal Res* 2006; **41**:136-41.

Referências Bibliográficas

74. Dubocovich ML , Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 2005; **27**:101-10.
75. Hardeland R. Tasimelteon, a melatonin agonist for the treatment of insomnia and circadian rhythm sleep disorders. *Curr Opin Investig Drugs* 2009; **10**:691-701.
76. Hardeland R, Tan DX , Reiter RJ. Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. *J Pineal Res* 2009; **47**:109-26.
77. Roseboom PH , Klein DC. Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: primary role of a beta-adrenergic receptor/cyclic AMP mechanism. *Mol Pharmacol* 1995; **47**:439-49.
78. Hunt AE, Al-Ghoul WM, Gillette MU et al. Activation of MT(2) melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; **280**:C110-8.
79. Poirel VJ, Cailotto C, Streicher D et al. MT1 melatonin receptor mRNA tissular localization by PCR amplification. *Neuro Endocrinol Lett* 2003; **24**:33-8.
80. Johnson N, Jain G, Sandberg L et al. Modeling the effect of exogenous melatonin on the sleep-wake switch. *Biomed Sci Instrum* 2012; **48**:202-9.
81. Reiter RJ, King TS, Steinlechner S et al. Tryptophan administration inhibits nocturnal N-acetyltransferase activity and melatonin content in the rat pineal gland. Evidence that serotonin modulates melatonin production via a receptor-mediated mechanism. *Neuroendocrinology* 1990; **52**:291-6.
82. Franco DG , Markus RP. The cellular state determines the effect of melatonin on the survival of mixed cerebellar cell culture. *PLoS One* 2014; **9**:e106332.
83. Shin IS, Park JW, Shin NR et al. Melatonin reduces airway inflammation in ovalbumin-induced asthma. *Immunobiology* 2014.
84. Shokrzadeh M, Naghshvar F, Ahmadi A et al. The potential ameliorative effects of melatonin against cyclophosphamide-induced DNA damage in murine bone marrow cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014; **18**:605-11.
85. Slominski AT, Kleszczynski K, Semak I et al. Local Melatoninerigic System as the Protector of Skin Integrity. *Int J Mol Sci* 2014; **15**:17705-17732.
86. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Fernandez-Santos JM et al. Human lymphocyte-synthesized melatonin is involved in the regulation of the interleukin-2/interleukin-2 receptor system. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; **90**:992-1000.
87. Lardone PJ, Carrillo-Vico A, Naranjo MC et al. Melatonin synthesized by Jurkat human leukemic T cell line is implicated in IL-2 production. *J Cell Physiol* 2006; **206**:273-9.
88. Lardone PJ, Rubio A, Cerrillo I et al. Blocking of melatonin synthesis and MT(1) receptor impairs the activation of Jurkat T cells. *Cell Mol Life Sci* 2010; **67**:3163-72.
89. Maldonado MD, Garcia-Moreno H , Calvo JR. Melatonin protects mast cells against cytotoxicity mediated by chemical stimuli PMACI: possible clinical use. *J Neuroimmunol* 2013; **262**:62-5.

Referências Bibliográficas

90. Tamura EK, Fernandes PA, Marcola M et al. Long-lasting priming of endothelial cells by plasma melatonin levels. *PLoS One* 2010; **5**:e13958.
91. Hu ZP, Fang XL, Fang N et al. Melatonin ameliorates vascular endothelial dysfunction, inflammation, and atherosclerosis by suppressing the TLR4/NF-kappaB system in high-fat-fed rabbits. *J Pineal Res* 2013; **55**:388-98.
92. Jun Z, Li Z, Fang W et al. Melatonin decreases levels of S100beta and NFKappaB, increases levels of synaptophysin in a rat model of Alzheimer's disease. *Curr Aging Sci* 2013; **6**:142-9.
93. Permpoonputtana K, Govitrapong P. The anti-inflammatory effect of melatonin on methamphetamine-induced proinflammatory mediators in human neuroblastoma dopamine SH-SY5Y cell lines. *Neurotox Res* 2013; **23**:189-99.
94. Cristofanon S, Uguccioni F, Cerella C et al. Intracellular prooxidant activity of melatonin induces a survival pathway involving NF-kappaB activation. *Ann N Y Acad Sci* 2009; **1171**:472-8.
95. Hoffman BB. Catecholamines, Sympathomimetic Drugs, and Adrenergic Receptor Antagonists. In: Goodman & Gilman's – The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, 2001.
96. Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA et al. Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature* 2007; **449**:721-5.
97. Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA et al. Upregulation of phagocyte-derived catecholamines augments the acute inflammatory response. *PLoS One* 2009; **4**:e4414.
98. Bergquist J, Tarkowski A, Ekman R et al. Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**:12912-6.
99. Goodman LS, Hardman JG, Limbird LE et al. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. In, McGraw-Hill Medical Pub. Division, New York, 2001; pp. xxvii, 2148 p., [1] folded leaf of plate.
100. Guyton AC, Hall JE. Textbook of medical physiology. In, Elsevier Saunders, Philadelphia, 2006; pp. xxxv, 1116 p.
101. Bosmann M, Grailer JJ, Zhu K et al. Anti-inflammatory effects of beta2 adrenergic receptor agonists in experimental acute lung injury. *FASEB J* 2012; **26**:2137-44.
102. Ha YM, Ham SA, Kim YM et al. beta(1)-adrenergic receptor-mediated HO-1 induction, via PI3K and p38 MAPK, by isoproterenol in RAW 264.7 cells leads to inhibition of HMGB1 release in LPS-activated RAW 264.7 cells and increases in survival rate of CLP-induced septic mice. *Biochem Pharmacol* 2011; **82**:769-77.
103. Kobayashi Y, Mercado N, Miller-Larsson A et al. Increased corticosteroid sensitivity by a long acting beta2 agonist formoterol via beta2 adrenoceptor independent protein phosphatase 2A activation. *Pulm Pharmacol Ther* 2012; **25**:201-7.
104. Uzkeser H, Cadirci E, Halici Z et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of salbutamol on acute and chronic models of inflammation in rats: involvement of an antioxidant mechanism. *Mediators Inflamm* 2012; **2012**:438912.

Referências Bibliográficas

105. Kizaki T, Shirato K, Sakurai T et al. Beta2-adrenergic receptor regulate Toll-like receptor 4-induced late-phase NF-kappaB activation. *Mol Immunol* 2009; **46**:1195-203.
106. Herve J, Dubreil L, Tardif V et al. beta2-Adrenoreceptor agonist inhibits antigen cross-presentation by dendritic cells. *J Immunol* 2013; **190**:3163-71.
107. Bernard AC, Fitzpatrick EA, Maley ME et al. Beta adrenoceptor regulation of macrophage arginase activity. *Surgery* 2000; **127**:412-8.
108. Kondo H, Takeuchi S, Togari A. beta-Adrenergic signaling stimulates osteoclastogenesis via reactive oxygen species. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013; **304**:E507-15.
109. Zhou J, Yan J, Liang H et al. Epinephrine Enhances the Response of Macrophages under LPS Stimulation. *Biomed Res Int* 2014; **2014**:254686.
110. Ferreira ZS, Fernandes PA, Duma D et al. Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. *J Pineal Res* 2005; **38**:182-8.
111. Grailer JJ, Canning BA, Kalbitz M et al. Critical role for the NLRP3 inflammasome during acute lung injury. *J Immunol* 2014; **192**:5974-83.
112. Grailer JJ, Haggadone MD, Sarma JV et al. Induction of M2 Regulatory Macrophages through the beta-Adrenergic Receptor with Protection during Endotoxemia and Acute Lung Injury. *J Innate Immun* 2014.
113. Markus RP, Ferreira ZS, Fernandes PA et al. The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *Neuroimmunomodulation* 2007; **14**:126-33.
114. Shi C. beta2-agonists for the prevention of exercise-induced asthma. *Am J Nurs* 2014; **114**:23.
115. Liang SQ, Chen XL, Deng JM et al. Beta-2 adrenergic receptor (ADRB2) gene polymorphisms and the risk of asthma: a meta-analysis of case-control studies. *PLoS One* 2014; **9**:e104488.
116. Walker JK, Defea KA. Role for beta-arrestin in mediating paradoxical beta2AR and PAR2 signaling in asthma. *Curr Opin Pharmacol* 2014; **16**:142-7.
117. Gastel JA, Roseboom PH, Rinaldi PA et al. Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science* 1998; **279**:1358-60.
118. Roseboom PH, Coon SL, Baler R et al. Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology* 1996; **137**:3033-45.
119. Ganguly S, Gastel JA, Weller JL et al. Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**:8083-8.
120. Klein DC, Ganguly S, Coon S et al. 14-3-3 Proteins and photoneuroendocrine transduction: role in controlling the daily rhythm in melatonin. *Biochem Soc Trans* 2002; **30**:365-73.
121. Goodman LS, Hardman JG, Limbird LE et al. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. In, McGraw-Hill, New York, 2001; pp. xxvii, 2148 p.
122. Tan KS, Nackley AG, Satterfield K et al. Beta2 adrenergic receptor activation stimulates pro-inflammatory cytokine production in

Referências Bibliográficas

- macrophages via PKA- and NF-kappaB-independent mechanisms. *Cell Signal* 2007; **19**:251-60.
123. Chiarella SE, Soberanes S, Urich D et al. beta(2)-Adrenergic agonists augment air pollution-induced IL-6 release and thrombosis. *J Clin Invest* 2014; **124**:2935-46.
124. Nichols HL, Saffeddine M, Theriot BS et al. beta-Arrestin-2 mediates the proinflammatory effects of proteinase-activated receptor-2 in the airway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; **109**:16660-5.
125. Walker JK, Fong AM, Lawson BL et al. Beta-arrestin-2 regulates the development of allergic asthma. *J Clin Invest* 2003; **112**:566-74.
126. Hollingsworth JW, Theriot BS, Li Z et al. Both hematopoietic-derived and non-hematopoietic-derived {beta}-arrestin-2 regulates murine allergic airway disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010; **43**:269-75.
127. Coon SL, Weller JL, Korf HW et al. cAmp regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT, EC 2.3.1.87): a new cell line (1E7) provides evidence of intracellular AANAT activation. *J Biol Chem* 2001; **276**:24097-107.
128. Diler E, Schwarz M, Nickels R et al. Influence of external calcium and thapsigargin on the uptake of polystyrene beads by the macrophage-like cell lines U937 and MH-S. *BMC Pharmacol Toxicol* 2014; **15**:16.
129. Kim JY, Sohn JH, Choi JM et al. Alveolar macrophages play a key role in cockroach-induced allergic inflammation via TNF-alpha pathway. *PLoS One* 2012; **7**:e47971.
130. Liu CF, Drocourt D, Puzo G et al. Innate immune response of alveolar macrophage to house dust mite allergen is mediated through TLR2/-4 co-activation. *PLoS One* 2013; **8**:e75983.
131. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009; **27**:519-50.
132. Koga MM, Bizzarro B, Sa-Nunes A et al. Activation of PAF-receptor induces regulatory dendritic cells through PGE2 and IL-10. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2013; **89**:319-26.
133. He D, Kou X, Luo Q et al. Enhanced M1/M2 Macrophage Ratio Promotes Orthodontic Root Resorption. *J Dent Res* 2014.
134. Martinez FO , Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 2014; **6**:13.
135. Scott JA , Grasmann H. Arginine Metabolism in Asthma. *Immunol Allergy Clin North Am* 2014; **34**:767-775.
136. Lewandowicz AM , Pawliczak R. [Arginine metabolism in bronchial asthma]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2007; **61**:156-66.
137. Lardone PJ, Carrillo-Vico A, Molinero P et al. A novel interplay between membrane and nuclear melatonin receptors in human lymphocytes: significance in IL-2 production. *Cell Mol Life Sci* 2009; **66**:516-25.
138. Tamura EK, Silva CL , Markus RP. Melatonin inhibits endothelial nitric oxide production in vitro. *J Pineal Res* 2006; **41**:267-74.

Súmula Curricular

Marco Antonio Pires Camilo Lapa

1 - Formação

- 2003 – 2007: Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Seropédica/RJ
- 2008 – 2010: Mestre em Fisiologia, Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo
- 2010 – Atual: Doutorado em Fisiologia, Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo

2 - Histórico profissional

Cursos de curta duração

- IV Curso de Inverno (2007): Tópicos em Fisiologia Comparativa. (Carga horária: 120h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Estágio de curta duração

- *University of Michigan* (Ann Arbor, MI, EUA). Estágio pelo Programa Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE-CAPES), realizado de fevereiro a julho de 2014. No laboratório do Professor

Dr. Peter A. Ward, no *Department of Pathology*, da *Medical School*
UMICH.

Prêmios

- **2011** - Travel Award in recognition of outstanding research in the field of melatonin, FASEB Summer Research Conference, Snowmass Village, CO, EUA.

Participação em congressos

- FASEB Science Research Conference - Melatonin Biology: Actions & Therapeutics. Niagara Falls, NY, EUA, 2013.
- FASEB Summer Research Conference - Melatonin Receptors: Actions and Therapeutics. Snowmass Village, CO, EUA, 2011.
- XXVI Reunião Anual da FeSBE. Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2011.
- 42º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2010.
- 41º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2009
- 40º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. Águas de Lindóia, SP, São Paulo, 2008.
- 39º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2007.

3 - Lista dos resultados de pesquisa

ARTIGOS COMPLETOS

Pires-Lapa, M.A.; Tamura, E.K.; Salustiano, E.M.A.; Markus, R.P.
Melatonin synthesis in human colostrum mononuclear cells enhances dectin-1-mediated phagocytosis by mononuclear cells. ***Journal of Pineal Research***, 55(3):240-6, **2013**.

Markus, R.P.; Cecon, E.; **Pires-Lapa, M.A.** Immune-Pineal Axis: Nuclear factor kappa B (NF- κ B) mediates the shift in the melatonin source from pinealocytes to immune competent cells. ***International Journal of Molecular Sciences*** (Online), v.14, p.10979 - 10997, **2013**.

Muxel, S.M.; **Pires-Lapa, M.A.**; Monteiro, A.W.A.; Cecon, E.; Tamura, E.K.; Floeter-Winter, L.M.; Markus, R.P. NF- κ B Drives the Synthesis of Melatonin in RAW 264.7 Macrophages by Inducing the Transcription of the Arylalkylamine-N-Acetyltransferase (AA-NAT) Gene. ***Plos One***, v.7, p.e52010, **2012**.

Polo, P.A.; Mecawi, A.S.; **Pires-Lapa, M.A.**; Côrtes, W.S.; Reis, L.C.
Study of GABA-A receptors on the sleep-like behavior in Coturnix

japonica (Temminck Schlegel, 1849) (Galliformes: Aves). ***Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology***, v.195, p.247 - 252, **2009**.

Resumos apresentados em congressos:

1. Adrenergic stimulus induces AA-NAT activation in RAW 264.7 macrophages. FASEB Science Research Conference - Melatonin Biology: Actions & Therapeutics, 2013.

2. Activation of NF κ B pathway induces the synthesis of melatonin by macrophages. FASEB Summer Research Conference - Melatonin Receptors: Actions and Therapeutics, 2011.

3. Participation of Nuclear Factor Kappa B (NF κ B) in LPS-induced melatonin synthesis in RAW macrophages. XXVI Reunião Anual da FeSBE, 2011.

4. The c-rel subunit from nuclear factor kappa B (NF κ B) family may play a differential role in peripheral melatonin synthesis. 42º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2010.

5. Molecular characterization of NF κ B signaling in human colostrated mononuclear phagocytes – functional effect on peripheral melatonin

synthesis. 41º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2009.

6. Modulação da produção de melatonina por células mononucleares do colostro humano pela via do NFkB. 40º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2008.

4 - Lista de financiamento à pesquisa

Bolsista doutorado: Regulação adrenérgica da síntese de melatonina em macrófagos RAW 264.7. (Bolsa CAPES/Cota institucional).

5 - Lista de orientação em andamento

Nada a declarar.

6 - Indicadores quantitativos

- 1) Publicações em periódicos com seletiva política editorial: 4
- 2) Resumos em congressos: 6

7 - Link para a página myresearcherID (isi) ou mycitations (google scholar).

Google Scholar - <http://scholar.google.com.br/citations?user=o5aGK-AAAAAJ&hl=pt-BR>

8 - Outras informações

1 - Artigos em preparação para submissão: I) *Adrenergic regulation of melatonin synthesis in RAW 264.7 macrophages* (será submetido para o *British Journal of Pharmacology*); II) *Melatonin role in the anti-inflammatory response induced by β_2 -adrenoceptors in experimental acute lung injury* (a ser submetido para o *Journal of Innate Immunity*); III) *The Immune-Pineal axis: the basis for coordinating the chronobiotic and the protector effects of melatonin* (revisão em preparo).

2 - Representante discente junto a CCP (Comissão de Coordenação da Pós-Graduação), do Dept. de Fisiologia Geral, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), 2010.

OF.CEUA/IB/025/2014

São Paulo, 30 de setembro 2014

Prezada Senhora,

Dirijo-me a V.Sa. para informar que a Comissão de Ética no Uso de Animais do IB (CEUA), em reunião realizada no dia 29 de setembro de 2014, **APROVOU** a inclusão de protocolo experimental adicional ao **Protocolo 125/2011**, referente ao Projeto "Modulação da atividade de células imunocompetentes por catecolaminas e melatonina", de sua responsabilidade (Colaborador: Marco Antonio Pires Camilo Lapa).

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

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

Atenciosamente,

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

Ilma. Sra.

Prof. Dra. REGINA PEKELMANN MARKUS

Departamento de Fisiologia - IB