CLAUDIA EMANUELE CARVALHO DE
SOUSA

Efeito da poluição atmosférica de São Paulo
sobre o Eixo Imune-Pineal

Effect of atmospheric pollution of São Paulo on
the Immune-Pineal Axis

São Paulo
2015

CLAUDIA EMANUELE CARVALHO DE
SOUSA

Efeito da poluição atmosférica de São Paulo
sobre o Eixo Imune-Pineal

Effect of atmospheric pollution of São Paulo on
the Immune-Pineal Axis

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

Orientadora: Regina
Pekelmann Markus

São Paulo
2015

Ficha Catalográfica

Carvalho-de-Sousa, Cláudia Emanuele.
Efeito da poluição atmosférica de São Paulo sobre o Eixo
Imune-
Pineal / Cláudia Emanuele Carvalho-de-Sousa ; orientadora
Regina
Pekelmann Markus. -- São Paulo, 2015.

175 f.

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

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

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).
Orientadora

À minha família

*Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la
como se os milagres não existissem. A segunda é vivê-la
como se tudo fosse milagre.*

Albert Einstein

Agradecimentos

Fico feliz em iniciar esta tese agradecendo as pessoas que me deram suporte para que este trabalho fosse realizado. Tive em minhas mãos um projeto desafiador, e foi contando com diversas colaborações e as ricas discussões que conseguimos concretizar este projeto.

Primeiramente agradeço ao suporte financeiro da FAPESP (2010/52304-5), que permitiu que este projeto fosse realizado e desfrutasse de experiências científicas únicas.

Agradeço igualmente a todos, não há ordem de importância, meramente um estilo. A Deus, sem a sua graça eu não seria nada. A minha amada família, meu pai Cláudio e minha mãe Cida pelo carinho e incentivo. Minhas irmãs que estão comigo sempre mesmo com toda essa distância, vocês me alegram todos os dias, Ticinha e Lina. Meu cunhado Eduardo, pela amizade verdadeira. Meus tios, primos, meu afilhado Lucas e primo Pedrinho por sempre estar comigo. E a todos meus amigos, que me ensinaram tanto, da escola até a pós-graduação. Em especial a Livia pelo apoio incondicional e companheirismo de todos os dias, amigas de toda vida Alana, Gabi, Sarah e Suzana.

Aos meus queridos colegas de laboratório com quem convivi grande parte do meu tempo. Agradeço a Eliana pela colaboração amiga e ao Eduardo Tamura por ser tão generoso no início da minha caminhada acadêmica, ao Sanseray pela franca amizade, colaboração e apoio desde meus primeiros dias de pós-graduação, a Leila, por me alegrar nos dias difíceis e me incentivar, Gabriela, por sua doçura e

apoio, Sandra pela parceria de sempre, Marco, por sua amizade e colaboração, Adriessa, pela amizade e cumplicidade, Luis por seu sorriso animador, Eugenia por me ouvir sempre, e Natali por nossa amizade inseparável. Flávia, Marina, Dai, Érika, Cá, Livia, Michele, Edu, Leticia, Priscila, Debora e Ray pelo aprendizado diário e paciência. Aos técnicos Edu Braga e Debora que sempre estiveram presentes e aos funcionários do IB.

A todos os colegas do laboratório de Imunoendocrinologia, em particular a Fernanda e Mari, obrigada pela disponibilidade e amizade. Aos colegas do laboratório de Poluição da FMUSP, pela colaboração, Mariana Veras, Mariangela Machione, Robson Seriani e Marco. Aos colegas do Instituto Weizmann pela boa acolhida e aprendizado, especial Karin e Anju pela generosidade.

Aos professores Paulo Saldiva, por acreditar neste projeto e propiciar seu desenvolvimento, Joilson, pela colaboração indispensável. Ao professor Tsvee Lapidot, pelas boas conversas e incentivo. A professora Zulma por seu cuidado, ao Professor Pedro, pela amizade e por participar de todas as etapas deste trabalho.

Finalmente à Professora Regina Markus, por acreditar em mim, por me motivar diariamente a viver desafios. Agradeço por tanto aprendizado e por discussões científicas valiosas. E ainda por ter permitido experimentar a fascinante Israel, nunca esquecerei este tempo, foi mesmo único! Foram 6 anos de momentos memoráveis no laboratório de Cronofarmacologia, obrigada por tudo!

Sumário

Lista de abreviaturas	10
I. Introdução	14
1. Caracterizando o Eixo Imune-Pineal	14
O conceito	14
A pineal.....	16
Aspectos Morfofuncionais.....	17
Regulação da produção de melatonina.....	19
Mecanismo de ação da melatonina	22
Pineal como alvo para mediadores	24
Bases moleculares do Eixo Imune-Pineal.....	28
Sinalização via NF- κ B	28
NF- κ B e a produção de melatonina.....	30
Melatonina e regulação da função imune.....	31
2. Poluição do ar	38
Caracterizando a poluição atmosférica.....	38
Poluição e inflamação.....	39
Mecanismos da resposta inflamatória.....	41
Diesel.....	43
Poluição atmosférica de São Paulo: utilizando o concentrador de partículas.....	44
Considerações finais:.....	46
II. Objetivos.....	47
Objetivos específicos.....	47
Produção noturna de melatonina.....	47
Via de transdução TLR/NF- κ B na pineal	47
Produção extrapineal de melatonina	48
Efeito da melatonina sobre a função de macrófagos	48
III. Material e Métodos	50
Animais.....	50
Exposição dos animais à poluição.....	50
Caracterização da exposição	51
Material particulado – Particulado do diesel.....	52
Drogas e Reagentes	54
Preparo de Drogas	55
Teste de Viabilidade Celular	56
Marcação de Anexina e Iodeto de propídio	56
HPLC	57
Dosagens de melatonina.....	58
Cultura de glândulas pineais.....	58
Macrófagos RAW 264.7.....	58
Macrófagos alveolares.....	59
Detecção de citocinas	60
Transcrição Gênica.....	60
Imunohistoquímica da glândula pineal	62
Extração de proteína nuclear.....	64
Ensaio de eletromobilidade por retardo em gel (EMSA).....	65
Ensaio de <i>supershift</i>	67

IV. Resultados	69
Exposição “ <i>in vivo</i> ” ao material particulado	69
Efeito da poluição do ar sobre a produção noturna de melatonina	69
Efeito do MP sobre a expressão da enzima AA-NAT	71
Efeito da exposição ao material particulado sobre a expressão de genes ativados por TLRs.	75
Material particulado aumenta imunorreatividade para microglia ..	82
Dosagem de mediadores inflamatórios no plasma	85
Estudos da função pineal “ <i>in vitro</i> ”	88
DEP reduz a síntese de melatonina induzida por noradrenalina através da sinalização da citocina TNF	90
Produção de melatonina por células imunocompetentes	93
Expressão dos receptores MT1 e MT2	93
Efeito do DEP sobre a viabilidade celular	94
DEP induz a translocação nuclear do NF- κ B em macrófagos de linhagem	98
DEP induz a expressão da enzima AA-NAT em macrófagos da linhagem RAW 264.7 e a produção de melatonina de maneira dependente da concentração	99
Efeito da melatonina sobre a viabilidade celular de macrófagos ..	105
Estudo com macrófagos pulmonares	110
Dosagem de mediadores inflamatórios em cultura de células pulmonares	113
Efeito da melatonina sobre a fagocitose de macrófagos alveolares	114
V. Discussão	118
VI. Conclusões	135
Resumo	136
Abstract	137
VII Referências Bibliográficas	138
Curriculum vitae	166

Lista de abreviaturas

5-HT	serotonina
5-HTP	5-hidroxitriptofano
AAAD	descarboxilase de aminoácidos aromáticos
AA-NAT	arilalquilamina N-acetiltransferase
AC	adenilil cyclase
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico
AP-1	proteína ativadora 1
ATP	adenosina trifosfato
BCG	bacilo Calmette-Guerin
CD14	<i>cluster differentiation 14</i>
COX	Ciclooxigenase
CRE	elemento responsivo a AMPc
CREB	proteína de ligação ao elemento responsivo a AMPc
DAMP	<i>danger-associated molecular pattern</i>
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol
DEP	<i>diesel exhausted particles</i>
EMSA	<i>eletromobility shift assay</i>
GABA	ácido gama-aminobutírico
GCS	gânglio cervical superior
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> , marcador de astrócitos
GR	receptor de glicocorticóide
HIOMT	hidroxindol-O-metiltransferase
HMGB-1	<i>high-mobility group Box 1</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
ICAM	<i>intercelular adhesion molecule</i>
IFN-γ	interferon gama
IKB	proteína inibitória <i>kappa</i> B
IKK	proteína quinase de I κ B
IL	interleucina
iNOS	sintase de óxido nítrico induzível
IP₃	inositol trifosfato
IRAK	<i>IL-1 receptor-associated kinase</i>
IRF3	<i>interferon regulatory factor 3</i>

LPS	lipopolissacarídeo
MAL	<i>MyD88-adaptor-like</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEL	Melatonina
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NA	noradrenalina
NAS	N-acetilserotonina
NEMO	modulador essencial de NF-KB
NF-KB	fator nuclear <i>kappa</i> B
NOR	noradrenalina
NSL	sequência de localização celular
NSQ	núcleos supraquiasmáticos
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	tampão fosfato-alcalino
PDTC	Pirrolidinaditiocarbamato
PKA	proteína quinase dependente de AMPc
PKC	proteína quinase dependente de cálcio
PLC	fosfolipase C
MP	material particulado
pM, nM, μM	picomolar, nanomolar e micromolar, respectivamente
PVN	núcleos paraventriculares
RHD	<i>Rel homology domain</i>
RIP1	<i>receptor-interacting protein 1</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SP1	<i>specificity protein 1</i>
TACE	<i>TNF alpha converting enzyme</i>
TAD	domínio de transativação
TAK1	<i>transforming growth factor-β-activated kinase</i>
TGF-β	fator de crescimento transformador beta
TIR	domínio <i>Toll-interleukin-1 receptor</i>
TIRAP	<i>TIR domain-containing adaptor protein</i>
TLR4	<i>toll 4 like receptor 4</i>
TNF	fator de necrose tumoral
TNFR	receptor de TNF
TPOH	triptofano hidroxilase

TRAF	<i>TNF receptor-associated factor</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β</i>
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
μm	micrômetro

INTRODUÇÃO

I. Introdução

1. *Caracterizando o Eixo Imune-Pineal*

O conceito

A resposta de defesa a um agente estressor é composta por reações sincronizadas entre os sistemas nervoso, endócrino, e imunológico que permitem a eliminação do agente e a recuperação do tecido ou organismo após a injúria. Nessa comunicação temporizada inter-sistêmica a produção de melatonina pela glândula pineal é considerada um mediador da interação neuro-imuno-endócrina (Quan & Banks, 2007), que pressupõe a existência de uma comunicação **recíproca** entre a glândula pineal e o sistema imunológico. Numerosos estudos reconhecem a melatonina como um **neuroimunomodulador** (Carrilo-Vico et al., 2014) e demonstram a correlação direta entre a síntese de melatonina e variações circadianas e sazonais do sistema imunológico (Nelson & Demas, 1997; Nelson & Drazen, 1999). De maneira recíproca sinais produzidos pela ativação de células imunocompetentes são percebidos pela glândula e como *feedback* regulam a síntese de melatonina.

A oscilação circadiana da produção da melatonina e os efeitos exercidos sobre a resposta imune inata, a coloca como uma molécula praticamente única em determinar **quando** permitir e resolver uma reposta de defesa (Swarlo-Konta et al., 2003; Markus et al., 2007). Nesse contexto, poderíamos pressupor que a resposta inflamatória

teria diferentes perfis entre o dia e a noite. De fato, a melatonina modula a reatividade de células endoteliais e reduz a migração de leucócitos à camada endotelial (Lotufo et al., 2001, Lotufo et al., 2006, Marcola et al., 2013). Quando o sistema imune é ativado por agentes infecciosos ou citocinas pró-inflamatórias a produção de melatonina circadiana é interrompida de maneira a facilitar a migração de leucócitos para os locais de lesão, permitindo a montagem da resposta inflamatória (revisto por Markus et al., 2007, 2011). Na periferia, células imunocompetentes ativadas passam a produzir melatonina que atua de maneira autócrina/parácrina. A síntese de melatonina por células imunocompetentes é um fenômeno **transiente** necessário para a resolução da resposta inflamatória. A redução de sinais pró-inflamatórios e a produção de glicocorticoides pela adrenal contribuiriam positivamente para o retorno da síntese de melatonina pela glândula pineal. Esta alternância controlada da fonte de produção de melatonina foi chamada de **Eixo-Imune Pineal** (figura 1) (Markus et al., 2007, Markus e Ferreira, 2011).

As bases experimentais e conceituais que permitiram a construção da proposta “Eixo Imune-Pineal” serão apresentadas a seguir. O presente trabalho se origina e gera novas evidências dentro desse conceito permitindo utilizar a poluição atmosférica como um modelo inflamatório ativador deste eixo

Figura 1. **O Eixo Imune-Pineal.** Em sujeitos saudáveis a melatonina noturna transduz a variação ambiental do ciclo claro/escuro regulando o sistema de defesa e reduzindo a transmigração de leucócitos para os tecidos-alvo. No início da resposta inflamatória PAMPs (*patogen associated molecular pattern*) e DAMPs (do inglês, *danger-associated molecular pattern*) como LPS e TNF, respectivamente, induzem a redução da síntese de melatonina pela pineal, favorecendo a migração de leucócitos, os quais começam a produzir melatonina localmente. PMN - polimorfonucleares; MN – mononucleares. A via biosintética para síntese de melatonina é conservada, e a regulação da produção de melatonina acontece principalmente através da indução/inibição da enzima chave AA-NAT. Nomeamos esta alternância entre a produção central, pela pineal, e periférica, por células imunocompetentes como Eixo Imune-Pineal (revisto por Markus et al., 2007).

A pineal

A glândula pineal é um órgão neuroendócrino situado na porção dorsal do tronco cerebral conectada ao sistema nervoso central por um pedúnculo ou *pineal stalk*, por onde a glândula recebe a inervação simpática e a vascularização (Møller e Baeres, 2002; revisto por Simonneaux e Ribelayga, 2003). Em roedores a pineal migra no sentido dorso-caudal e está situada centralmente no topo do cérebro

entre os hemisférios cerebrais e o cerebelo (Volrath, 1991, Møller e Baeres, 2002)

Aspectos Morfofuncionais

O entendimento da estreita interação entre os sistemas imunológico, nervoso e endócrino é relativamente recente, visto que o sistema nervoso central foi considerado protegido de células e substâncias circulantes devido à presença da barreira hematoencefálica. As células endoteliais dos vasos que irrigam o sistema nervoso central são interconectadas por junções fixas, impedindo a passagem de substâncias entre as mesmas (Duvernoy & Risold, 2007). No entanto, existem algumas regiões do sistema nervoso central onde a barreira endotelial é mais permissiva, permitindo a comunicação entre sangue e líquido (Quan & Banks, 2007). Estas regiões encefálicas são descritas em conjunto como órgãos circunventriculares (CVOs). São reconhecidas sete estruturas como CVOs: órgão subfornical, órgão vascular da lâmina terminal, eminência mediana, neurohipófise, órgão subcomissural, área postrema e a **glândula pineal** (Duvernoy & Risold, 2007).

A ausência de barreira hematoencefálica torna a glândula pineal um alvo direto para moléculas circulantes no sangue. Além dessa característica anatômico-funcional, podemos destacar a composição celular do parênquima pineal. A posição no encéfalo e a histologia da glândula sofrem variações ao longo da escala filogenética. O parênquima da pineal de mamíferos é constituído

majoritariamente por células secretoras de melatonina, os pinealócitos. Já em espécies de vertebrados não-mamíferos além de possuírem ação tipicamente endócrina os pinealócitos são células que participam de fotorrecepção e, portanto morfologicamente se distinguem por apresentarem processos e estruturas celulares para percepção de luz, muito semelhante às células da retina (Ekstro & Meissl, 2002).

Uma característica peculiar da glândula é a presença de células gliais, principalmente astrócitos e microglia (Møller et al, 1978, 1996). Astrócitos se localizam na região proximal do parênquima adjacente ao pedúnculo pineal, confirmado pela imunorreatividade positiva para proteína fibrilar associada à astrócitos (GFAP), enquanto a microglia se distribui de forma difusa e são identificadas por marcadores típicos para macrófagos como ED1(CD68), OX-42 ou IBA-1 (Tsai & McNulty, 1997, Carvalho-Sousa et al, 2011).

A glândula pineal possui alta vascularização e alto fluxo sanguíneo, ela recebe suporte por ramificações arteriolares proveniente de artérias coroidais (Reiter, 1981). A presença da microglia que é uma imunocompetente, a ausência de barreira hematoencefálica associado à alta irrigação da glândula permite que a glândula perceba e responda rapidamente a mediadores e moléculas que ativam a resposta inflamatória.

Regulação da produção de melatonina

A glândula pineal é a estrutura responsável em converter a informação fotoperiódica para os tecidos periféricos através da secreção do hormônio melatonina (Reiter, 1993). A melatonina é um sinal endógeno secretado exclusivamente na fase de escuro ambiental tanto em animais de hábito diurnos ou noturnos (Challet, 2007). A duração do pico noturno de melatonina marca o comprimento da noite e, portanto também é o sinal que informa a mudança de estações, particularmente importante em animais sazonais (Simmoneaux & Ribelayga, 2003).

A produção deste hormônio é controlada pelos núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo (NSQ) que oscilam com período de aproximadamente 24 horas. Os núcleos supraquiasmáticos são responsáveis pela variação diária da produção de melatonina gerando o ritmo e propagando a resposta à luz detectada pela retina (para revisão Moore, 1997; Kennaway & Wright, 2002). Fotorreceptores que expressam melanopsina presentes nas células ganglionares da retina projetam-se diretamente para os NSQ através do chamado trato retino-hipotalâmico (Provencio et al., 2000, Berson, 2003). Durante a fase de claro neurônios gabaérgicos que se projetam do NSQ ao núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) estão ativados, enquanto na fase de escuro os neurônios ativados são os glutamatérgicos. Esta alternância entre o neurotransmissor inibitório GABA e o excitatório glutamato faz com que na fase de escuro haja a ativação da via polissináptica responsável pela transmissão simpática. A inervação

simpática da glândula pineal origina-se no gânglio cervical superior (Teclemariam-Mesbah et al., 1999) e promove a liberação dos neurotransmissores noradrenalina (Wurtman et al., 1967) e ATP (Barbosa et al., 2000). A noradrenalina é o estímulo essencial para a ativação da via biosintética da melatonina (figura 2).

A síntese de melatonina inicia-se com a captação de triptofano da corrente sanguínea (figura 2) que é hidroxilado a 5-hidroxitriptofano pela enzima triptofano hidroxilase 1 (TPH1) e subsequentemente descarboxilado formando serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT). Esta é acetilada pela enzima **AA-NAT** à N-acetilserotonina e por final convertida em melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) pela enzima acetilserotonina metiltransferase (ASMT) também denominada hidroxindol-O-metiltransferase (**HIOMT**) (Simonneuax & Ribelayga, 2003). A conversão da serotonina em N-acetilserotonina é um passo chave na via biossintética da melatonina, uma vez que a enzima AA-NAT apresenta sua atividade regulada pelo ciclo claro/escuro (Klein & Weller, 1970). Esse ritmo é gerado através da cascata de sinalização adrenérgica na glândula que controla a expressão do gene da AA-NAT em roedores com níveis de transcrição 100-150 vezes maior durante a noite (Borjigin et al., 1995; Garidou et al., 2001, Roseboom et al., 1996;).

A resposta adrenérgica e purinérgica na glândula através dos receptores pós-sinápticos dos tipos $\alpha 1$ e $\beta 1$ -adrenérgicos e purinérgicos P2Y1 (Ferreira et al., 1994, 2001) promove a ativação da via de transdução AMP cíclico-PKA que ativa a proteína quinase

dependente de AMP, a PKA. Esta enzima fosforila o fator de transcrição CREB (do inglês, *cyclic-AMP regulating element binding*). CREB fosforilado se liga ao elemento CRE (do inglês, *cAMP-responsive element*) do DNA no promotor do gene da AA-NAT promovendo a transcrição gênica. A fosforilação da AA-NAT induz a sua interação com a chaperona 14-3-3 (Ganguly et al., 2001, 2002) protegendo-a da degradação pelo proteassoma (Gastel et al., 1998; Ganguly et al., 2001).

Como a melatonina é lipossolúvel ela passa rapidamente para a corrente sanguínea e sofre rápida metabolização e sua concentração plasmática é rapidamente reduzida assim que se encerra a atividade pineal. No sistema microssomal hepático ocorrem duas reações, primeiro a melatonina é hidroxilada e depois é conjugada com sulfato ou glucoronato pelo citocromo p450 formando 6-sulfatoximelatonina (6-sMT), o seu principal metabólito (Bojkowski et al., 1987).

Figura 2. **Via de biossíntese da melatonina em ratos.** Na fase escura fibras pós-ganglionares simpáticas liberam noradrenalina (NA) ativando os receptores α e β adrenérgicos. A ativação dos receptores β_1 promove a ativação da adenilil ciclase (AC) que resulta em aumento dos níveis de AMPc, ativando a proteína PKA, que por sua vez fosforila o fator de transcrição CREB induzindo a transcrição da enzima AA-NAT. A ativação dos receptores α -adrenérgicos induz a ativação da proteína PKC, potenciando a atividade da enzima AC. A enzima PKA também tem o papel de fosforilar a AA-NAT pós tradução, e assim permite a ligação com a chaperona 14-3-3 e sua estabilização no citoplasma. A ativação da enzima AA-NAT é o fator chave para a síntese de melatonina, uma vez que a via só prossegue após sua tradução.

Mecanismo de ação da melatonina

Os mecanismos moleculares responsáveis pelos efeitos da melatonina envolvem quatro ações principais: **(1)** a ligação de alta afinidade com receptores de membrana acoplados a proteína G, MT1 e MT2 **(2)** ligação a receptores nucleares, **(3)** interação com proteínas intracelulares, e **(4)** interação independente de receptores. Em mamíferos são descritos 2 receptores de membrana, MT1 que foi

primeiramente conhecido como *Mella* e o MT2, codificado como *Mellb* (Reppert et al., 1994, 1995; Dubocovich, 1988; 1997). Ambos pertencem à família de receptores acoplados a proteína G (GPCRs), que contém sete domínios transmembrânicos (Dubocovich et al., 2003; Witt- Enderby et al., 2003). Ambos receptores sinalizam principalmente via proteína Gi (inibitória) que induz a redução do segundo mensageiro AMPc pela via AMPc-PKA-CREB ou podem também sinalizar por Gq modificando a atividade da fosfolipase C, induzindo aumento dos níveis de cálcio, inositol trifosfato (IP3) e consequente ativação da PKC.

Com baixa afinidade à melatonina e alta afinidade à NAS, os receptores denominados MT3 representam a interação com a enzima quinona redutase 2 (Nosjean et al., 2000, Vincent et al., 2010). Estes receptores medeiam a adesão de leucócitos à camada endotelial, participando do processo de inibição da migração de leucócitos que ocorre no período noturno em ratos (Lotufo et al., 2001).

A melatonina tem sítios de ligação com proteínas intracelulares, que inclui a calmodulina, calreticulina, proteínas microtubulares, e receptores nucleares (Benitez-King, 2006, Pandi-Perumal., 2008). A família de receptores nucleares tirosina-quinase (ROR) e família do ácido retinóico (RZR) foram identificadas como uma classe de receptores de melatonina envolvidos na sinalização nuclear com efeitos cronobióticos e sobre a função de leucócitos (Lardone et al., 2009).

Parte das ações antioxidantes da melatonina é mediada por mecanismos dependentes de receptor, mas também incluem ações que não dependem dessa interação constituindo da ligação direta a radicais livres (*scavenger*) e reações de transferência de elétrons na cadeia respiratória (Poeggeler et al., 2002).

Pineal como alvo para mediadores

A concepção de que a iluminação ambiental era o principal sinal modulador da produção de melatonina na glândula pineal perdurou até o começo da década de 1990 quando vários estudos demonstraram que moléculas endógenas, como hormônios, e moléculas secretadas por células imunes ativadas modulam a função da glândula pineal.

Parte importante desses achados foi obtida através de trabalhos do nosso grupo. Nossos estudos podem ser vistos em **dois grandes focos**: entender como a hora do dia determina mudanças no padrão de resposta inflamatória e como a pineal perceberia o estado de higidez do organismo

A glândula pineal de ratos expressa constitutivamente receptores e moléculas co-estimulatórias sinalizadoras da resposta inflamatória, tais como: receptores de citocinas, de glicocorticóides (GR), para padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e a dano ou perigo (DAMPs). Pinealócitos, astrócitos e microglia expressam o receptor para a citocina fator de necrose tumoral (TNF), TNFR1 (Carvalho-Sousa et al., 2011) e moléculas da membrana que

reconhecem LPS, CD14 (do inglês, *cluster differentiation*) 14 e o receptor Toll like 4 (TLR4) (da Silveira Machado Cruz et al., 2010, 2012). A pineal transcreve constitutivamente RNAm para todos os receptores Toll like exceto o TLR5 e para os receptores de citocinas IL6 e IL1 α bem como para genes que transduzem sinais via receptores inflamatórios e para fatores de transcrição da via NF- κ B e MAPK (da Silveira Cruz Machado, 2015). Estes genes foram confirmados por expressão das proteínas TLR2, TLR6, e para todos os cinco membros da família do fator de transcrição kappa B (NF- κ B) (p50, p52, RELA, RelB, c-Rel), e aos adaptadores e efetores da sinalização de TLRs (BC13, IKK1, IKK2, I κ B α , TRAF1, TRAF6, TIRAP, IRAK, caspase 8 e MEK7) (da Silveira Cruz-Machado, 2015).

Além de reconhecer importantes ligantes da resposta imune inata, a função pineal é diretamente regulada por citocinas e outros fatores inflamatórios. O primeiro estudo que mostrou que a glândula pineal é afetada durante um processo inflamatório surgiu de experimentos em que se avaliava o ritmo da lesão granulomatosa induzida por injeção de BCG na pata de camundongos. A variação diária do volume do edema, que era menor durante a fase de escuro do que de claro, foi abolida por pinealectomia e restaurada pela reposição de melatonina, indicando que a melatonina produzida pela pineal era a responsável pelo ritmo diário da lesão (Lopes et al. 1997). Também foi verificado que a adrenalectomia abolia o ritmo diário da lesão (Lopes et al., 2001). O interessante destes experimentos é que a adrenalectomia também abolia o ritmo de excreção de 6-

sulfatoximelatonina, sugerindo pela primeira vez que glicocorticoides estariam controlando a função pineal. Posteriormente foi mostrado que a pineal tem uma alta densidade de receptores de glicocorticoides (GR) que medeiam tanto a potenciação (Ferreira et al., 2005, Fernandes et al., 2009) quanto a inibição (Troani et al., 1988) da síntese de melatonina (Fernandes, 2009).

Mediadores do sistema imunológico também controlam a função pineal. A citocina interleucina 1 beta (IL-1 β) é produzida constitutivamente pela glândula pineal, e aumentada após tratamento *in vitro* com noradrenalina, INF γ e LPS (Tsai & McNulty, 1999). A noradrenalina também induz o aumento do RNAm da interleucina 6 (IL-6) e do fator de crescimento beta (TGF- β) (Tsai et al., 2001a). O efeito dessas citocinas sobre a atividade da glândula foi avaliado através da análise do conteúdo ou síntese de melatonina ou de seus precursores. Foi observado que o INF γ pode induzir tanto o aumento quanto a redução da melatonina em cultura de pineal, dependendo das concentrações de INF- γ e da concentração de noradrenalina utilizada (Withyachumnarnkul et al. 1990b). Os fatores estimulares de colônias granulocitárias (GM-CSF e G-CSF), citocinas secretadas por células imunocompetentes ativadas também regulam produção de melatonina *in vivo* e *in vitro* na pineal de ratos (Zylińska et al., 1995).

No contexto do **Eixo Imune-Pineal**, podemos prever que fatores ou moléculas secretadas na fase de montagem da resposta promovem efeitos negativos sobre a produção de melatonina. O TNF

inibe transientemente a transcrição do gene que codifica a enzima AA-NAT como também a produção do precursor da melatonina, (N-acetilserotonina) em glândulas pineais de ratos em cultura (Fernandes et al., 2006). O estudo *in vivo* com um modelo de inflamação em humanos também mostrou a mesma relação. Mulheres com mastite, um processo inflamatório não infeccioso, apresentam altos níveis de TNF que correlacionam com a supressão do ritmo de melatonina (Pontes et al., 2006). No mesmo contexto de uma resposta pró-inflamatória, a injeção intravenosa de LPS promove a redução dos níveis plasmáticos de melatonina em ratos (Tamura et al., 2010) e inibição da produção de N-acetilserotonina e melatonina induzida por noradrenalina em pineais em cultura (da Silveira Cruz-Machado et al., 2010). Observou-se ainda que em quadros de infecção generalizada, caracterizada por altos níveis de TNF há supressão do ritmo de melatonina (Mundigler et al., 2002). Também foi avaliada a participação da microglia na resposta da pineal a essas citocinas. IL-1 β , TNF e INF- γ modulam o conteúdo de 5-HT em culturas de glândulas pineais de rato (Tsai et al., 2001). Na presença de LPS, a produção de TNF pela microglia da glândula pineal também foi descrita por regular a produção de melatonina em pinealócitos via receptores desta citocina (Carvalho-Sousa et al., 2011; da Silveira Cruz-Machado et al., 2012).

Bases moleculares do Eixo Imune-Pineal

O fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) é um fator de transcrição que controla a expressão de genes específicos e regula diversas funções fisiológicas. O papel mais importante e evolutivamente conservado do NF- κ B é como mediador chave do sistema imunológico e de respostas inflamatórias (Vallabhapurapu & Karin, 2009). Mas também participa de forma importante em processos celulares como adesão, diferenciação, proliferação, e proteção contra apoptose (Carrillo- Vico et al., 2005, Radogna et al., 2008). Nesse sentido, sabe-se que em condições patológicas como câncer, artrite, e inflamação crônica há anormalidade na ativação deste fator (Ben-Neriah & Karin, 2011)

No contexto do **Eixo Imune-Pineal**, observamos que o fator de transcrição NF- κ B é o mediador ou efetor central que permite a sincronização entre a ativação da resposta do sistema imunológico e a mudança das fontes de melatonina da glândula pineal para células imunocompetentes. Vemos que o controle da translocação nuclear de dímeros distintos do NF- κ B é o mecanismo principal para regulação da produção de melatonina pela pineal ou por macrófagos ativados frente ao estímulo pró-inflamatório.

Sinalização via NF- κ B

O NF- κ B é expresso em praticamente todos os tipos celulares e compreende uma família de proteínas que compartilham uma sequência de aminoácidos denominada domínio de homologia Rel (RHD, do inglês, *Rel homology domain*). O nome em particularse deve

a descoberta inicial como regulador do gene que codifica a cadeia leve *kappa* da imunoglobulina de linfócitos B que atua regulando a transcrição gênica no núcleo celular (Sean & Baltimore, 1986).

A família Rel inclui cinco genes *Nfkb1*, *Nfkb2*, *Rela*, *Relb* e *C-rel*, os quais transcrevem 7 proteínas: p105 ou sua forma clivada, p50 (codificada pelo gene *Nfkb1*), p65 (*RelA*), p100 ou sua forma clivada em p52 (*Nfkb2*), RelB (*Relb*) e c-Rel (*Rel*). Em células não-estimuladas essas proteínas estão sempre associadas sob a forma de homodímeros ou heterodímeros, sequestradas no citoplasma através da interação com as proteínas inibitórias κ B ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ e $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$, BCL3, $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$, $\text{I}\kappa\text{B}\gamma$ ou as proteínas precursoras p100 e p105 (Karin & Neriaah, 2000). A interação com as proteínas $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ mascara a sequência de localização nuclear (NSL, do inglês, *nuclear localization signals*) impedindo a translocação ao núcleo (Hayden & Ghosh, 2004). Essas proteínas inibitórias possuem em comum repetições múltiplas de anquirinas que fazem a ligação com os dímeros do NF- κ B (Hatada et al. 1992).

A indução da ativação dos dímeros de NF- κ B pela via canônica envolve a fosforilação dessas proteínas inibitórias $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ em resíduos de serina críticos por IKKS, que consistem de um complexo trimérico de quinases que compreende as subunidades catalíticas $\text{IKK}\alpha$, $\text{IKK}\beta$ e a subunidade $\text{IKK}\gamma$ também conhecida como NEMO (do inglês, *NF- κ B essential modulator*) (Kanarek & Ben-Neriaah, 2012). Após sofrerem fosforilação as $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ são ubiquinadas e degradadas pelo proteassoma 26S, o que permite a translocação dos dímeros NF- κ B.

A ausência da interação com as I κ Bs permite a translocação dos dímeros ao núcleo e o controle sobre a transcrição gênica. A composição do dímero determina o padrão de regulação induzido por um determinado estímulo. As proteínas RelA, c-Rel e RelB possuem o domínio de transativação C-terminal (TAD, do inglês, *transactivation domain*) necessário para transcrição gênica, por isso são consideradas as subunidades ativadoras de expressão gênica. Já as subunidades p52 e p50 não têm o domínio TAD e por isso são por definição repressoras da transcrição gênica quando não há a presença de uma proteína que possui TAD acoplada a estas (Hayden & Gosh, 2014). Por isso a ligação dos homodímeros dessas subunidades, a exemplo de p50/p50, aos sítios *kappa* B leva a repressão da expressão gênica. Essas subunidades dependem da interação com outros fatores para regular positivamente a transcrição (Hayden & Ghosh, 2008).

NF- κ B e a produção de melatonina

O NF- κ B é constitutivamente expresso na glândula pineal (Cecon et al., 2010; Ferreira et al., 2005; Fernandes et al., 2006, 2009; da Silveira Cruz-Machado, 2010; Carvalho-Sousa et al., 2011). A ativação da glândula pineal por citocinas pró-inflamatórias e PAMPs induz a translocação nuclear do fator de transcrição NF- κ B e inibe a transcrição do gene da AA-NAT, com subsequente inibição da produção de melatonina (da Silveira-Cruz Machado et al 2010, Fernandes et al., 2006, Tamura et al., 2010). Por outro lado, quando o NF- κ B é ativado em células imunocompetentes como macrófagos,

monócitos, células polimorfonucleares do colostro ou microglia há a indução da transcrição do gene *Aanat* e a produção de melatonina (Muxel et al., 2012, Pires-Lapa et al., 2013, Pinato et al., 2015). Recentemente, demonstrou-se que isto é devido à interação de dímeros de NF- κ B com sequências κ B localizadas no promotor e primeiro intron do gene que codifica a enzima AA-NAT (Muxel et al., 2012). Deste modo, a alternância entre a produção pineal e extra-pineal de melatonina cumpriria um papel duplo: no início, a supressão da produção noturna de melatonina pela pineal facilitaria a migração de neutrófilos e monócitos para o local da lesão e, na sequência, a produção de melatonina por células imunocompetentes ativadas, tais como macrófagos, participaria do processo de recuperação (revisto por Markus et al., 2013). A volta da função pineal para o estado normal, característico de indivíduos hígidos não é um processo passivo. A ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) que leva a um aumento tônico na quantidade de glicocorticoide circulante resulta em uma inibição da via de sinalização NF- κ B na pineal e uma volta para a produção de melatonina noturna.

Melatonina e regulação da função imune

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) originalmente descrita como hormônio da glândula pineal (Lerner et al., 1958) é o principal hormônio sincronizador dos ritmos diários e sazonais em vertebrados através da liberação **noturna** no sangue. É uma molécula

altamente **ubíqua**, presente entre organismos filogenicamente distantes como plantas, bactérias e humanos e funcionalmente muito **versátil**, com propriedade e efeitos antioxidantes, imunomoduladora e oncostática (Hardeland & Poeggeler, 2003).

Em vertebrados, a melatonina acumula funções de defesa com função de marcação do escuro (Hardeland & Fuhrberg, 2006; Tan et al., 2010). Os primeiros relatos dos efeitos imunomodulatórios da melatonina foram descritos em experimentos nos quais os pesquisadores observavam redução da capacidade imunológica após a cirurgia de remoção da glândula pineal (Csaba and Barath, 1975). Já os efeitos diretos da ação da melatonina foram comprovados quando se demonstrou que a melatonina revertia a imunossupressão induzida por antagonista de receptor β -adrenérgico – que suprimia a síntese de melatonina (Maestroni et al., 1986). Nesse sentido, confirmou-se posteriormente que os principais órgãos linfóides e células imunocompetentes expressam os receptores específicos para melatonina (Calvo et al., 1995, Carrilo-Vico et al., 2003, Garcia-Perganeda et al., 1999, Lopez-Gonzalez, 1993, Rafii-El-Idrissi et al., 1995).

Com o desenvolvimento de anticorpos específicos para a melatonina comprovou-se a existência de fontes extrapineais de melatonina em vários órgãos revelando não ser um hormônio exclusivo da glândula pineal. Em mamíferos, a melatonina é produzida por diversas estruturas, já foi demonstrada no trato gastrointestinal (Bubenik, 2002), na retina (Zmijewski et al., 2009),

células epidérmicas (Slominski et al., 1996, 2002), na medula óssea (Conti, 2006) e células imunocompetentes (Carrilo-Vico et al., 2004; Pontes et al., 2006, 2007, Pires-Lapa, 2013). A produção extrapineal pode ocorrer de maneira rítmica (retina) ou constitutiva (demais tecidos).

Atualmente a produção de melatonina por células do sistema imunológico é melhor compreendida e também reconhecida como importante fonte de melatonina extrapineal. A melatonina ou enzimas da via biosintética, que são conservadas (AA-NAT e ASMT/HIOMT), já foram detectadas em vários tecidos, órgãos, e células imunes como timo de rato e humano (Naranjo et al., 2007), medula óssea (Tan et al., 1999, Conti et al., 2000), baço, leucócitos, (Gomez-Corvera et al., 2009), células humanas mononucleares e polimorfonucleares do colostro (Pontes e al., 2006, Pires-Lapa et al., 2013), macrófagos de linhagem murina (Muxel et al., 2012), mastócitos (Maldonado et al., 2010), células gliais (Pinato et al., 2014) e macrófagos do peritônio (Martins et al., 2004).

A maior parte da literatura tem se concentrado em elucidar os mecanismos e os efeitos da melatonina em linfócitos e relativamente poucos estudos abordam a função da melatonina em células da imunidade inata a citar: monócitos, macrófagos, microglia, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastócitos e células NK (figura 3) (Calvo et al., 2013). Células da imunidade inata integram a primeira linha de defesa contra microorganismos sendo responsáveis

por destruí-los rapidamente e alertar o organismo para responder de forma eficiente.

Figura 3. **Resumo de ações da melatonina em células da imunidade inata.** Adaptado de Calvo e col. (2013).

Em especial, nesta tese optamos como alvo de investigação os estudos da produção de melatonina e seus efeitos sobre a função de **macrófagos alveolares**. No ambiente pulmonar o macrófago tem o papel de manutenção da vigilância contra microrganismos e partículas, como a poluição, sendo responsável por eliminar patógenos e modular a resposta inflamatória (Hussel & Bell, 2014).

Os macrófagos pertencem ao sistema mononuclear fagocitário que consiste em células especializadas e com função primária a fagocitose (Mosser & Edwards, 2008). Os macrófagos estão

virtualmente em todos os tecidos, e se diferenciam de células periféricas mononucleares, que migram em condições de hígidez ou em resposta a um estímulo inflamatório (Dey et al., 2015). Também é aceito que existe a proliferação local nos tecidos residentes a partir de células precursoras formadora de colônia que pode originar macrófagos maduros. O melhor exemplo é a proliferação da microglia no sistema nervoso central (Casano & Peri, 2015).

Vale ressaltar ainda, que existe uma classificação segundo o fenótipo do macrófago que é polarizado pelo microambiente para exercer funções específicas. A categorização clássica utilizava uma escala linear, em que M1, macrófagos ativados representa um extremo e M2, macrófagos ativados alternativos o outro (Mosser & Edwards, 2008). O M1 tem característica de alta atividade microbicida e promove respostas Th1 mediadas por IL-12 enquanto macrófagos M2 suportam funções Th2 associadas, desempenhando papel na resolução da inflamação (Martinez et al., 2008). Essa classificação tem sido rapidamente estendida de modo a aceitar que existem outros tipos de macrófagos além desses dois extremos típicos. A principal preocupação é admitir que a população M2 ainda se distingue em alguns subtipos com diferenças importantes em sua fisiologia e bioquímica. Neste sentido, propôs-se a divisão em 3 funções: defesa, reparo, e imunoregulação, gerando, portanto populações que, em analogia, formariam um espectro com diferentes características fenotípicas (Mosser & Edwards, 2008).

Os macrófagos reconhecem sinais de perigo ou dano através de receptores TLRs, de reconhecimento de padrões (PPRs) e receptor de interleucina 1(IL-1R), os quais sinalizam através da molécula adaptadora MyD88 (do inglês, *myeloid differentiation primary-response gene 88*).

PAMPS e DAMPS induzem a produção de melatonina em células mononucleares do sangue, mononucleares do colostro, mastócitos, macrófagos peritoneais e de linhagem murina (Pontes et al., 2006, Muxel et al., 2012, Pires-Lapa et al., 2013). Como já foi abordado anteriormente, dados de nosso grupo demonstraram que a síntese de melatonina em células imunocompetentes é alcançada através da ativação do fator NF- κ B (para revisão, Markus et al., 2013). A enzima AA-NAT que converte serotonina em N-acetilserotonina possui sítios *kappa* B que são diretamente regulados por este fator (Muxel et al., 2012).

A melatonina secretada localmente tem um papel autócrino importante aumentando a capacidade fagocítica de macrófagos (Pawlek et al., 2005, Muxel et al., 2012, Pires-Lapa et al., 2013). Esse efeito é perdido quando o receptor de melatonina MT2 é bloqueado (Pires-Lapa et al., 2013). De outra forma, é preciso destacar que em altas concentrações (micro- ou milimolar) a melatonina exerce efeitos anti-inflamatórios, via inibição da via NF- κ B (Xia et al., 2012). Macrófagos ativados produzem citocinas como INF, IL1, IL-12 e TNF, mediadores como o NO e prostaglandinas. A melatonina induz redução significativa de TNF em macrófagos humanos e de

camundongo (Lissoni et al., 1994), e de macrófagos RAW 264.7 via ativação de TLR3 (Huang et al., 2008) bem como via TLR4 inibindo TNF, IL-1 beta, IL-6, IL-8 e IL-10 (Xia et al., 2012). A melatonina também reduz a ativação da enzima induzível de óxido nítrico (iNOS) e consequentemente a produção de NO em macrófagos RAW 264.7 (Mayo et al., 2005).

Um dos mecanismos mais investigados e relevantes da ação da melatonina na resposta imune inata envolve suas propriedades **antioxidantes**. Esses efeitos podem ser vistos em altas concentrações de melatonina e, geralmente obtidas através de administração exógena, as quais incluem ação direta como “scavenger” de radicais livres (Poeggeler et al., 2002) ou através da ligação com receptores promovendo o aumento da atividade de enzimas antioxidantes (para revisão Luchetti et al., 2010), resultando em um efeito protetor contra danos oxidativos em tecidos alvo. A propriedade antioxidante da melatonina considerada a função mais primitiva da molécula e, por ser evolutivamente vantajosa, foi conservada por proteger organismos simples contra os danos da oxidação (Hardeland & Fuhrberg, 2006; Tan et al., 2010).

2. *Poluição do ar*

Caracterizando a poluição atmosférica

O material particulado (MP) consiste em um conjunto de poluentes que compõe uma mistura heterogênea de partículas suspensas na atmosfera, que variam em tamanho, composição e origem. Por sua complexidade essas partículas são classificadas convencionalmente pela massa, uma vez que essa propriedade pode predizer o transporte e remoção de partículas do ar, sua deposição no sistema respiratório e associação com a composição química e sua fonte (OMS, 2003).

O tamanho do particulado varia de nanômetros a micrômetros. Usualmente esse material é classificado em três categorias (Brook et al., 2004): partículas ultrafinas ($PM_{0.1}$), finas ($PM_{2.5}$) e grossas (PM_{10}) cujos diâmetros aerodinâmicos são, menores do que $0,1\ \mu m$, $2,5\ \mu m$ e $10\ \mu m$, respectivamente.

Uma importante consideração em relação ao tamanho das partículas suspensas no ar é seu alcance no organismo. As partículas grossas penetram principalmente nas vias aéreas superiores, isto é na árvore traqueo-bronquial, enquanto as partículas finas podem chegar até os alvéolos. Mais recentemente têm-se dado atenção considerável às partículas ultrafinas, visto que representam a maior parte do MP. Elas atingem os alvéolos em altas concentrações e podem passar para

o sistema circulatório (Nemmar et al., 2001; Risom et al., 2005, Wichmann & Peters, 2000).

Em geral as partículas consideradas finas, $MP_{2,5}$, têm origem principalmente da combustão de materiais fósseis enquanto as partículas grossas, MP_{10} , derivam de fontes naturais como solo e os chamados bioaerosóis (que podem conter endotoxinas de bactérias, grãos de pólen, esporos fúngicos, etc) (Brook et al., 2004). Poucos autores referem-se às partículas ultrafinas, e sua origem é derivada do processo de combustão, o que inclui a poluição veicular. Estas partículas têm vida curta, pois podem se aglomerar formando partículas maiores ou mesmo sofrer processo de coalescência.

Poluição e inflamação

O papel da inflamação na patogênese de doenças pulmonares causada por partículas de poluição é bem elucidado, sendo que mais recentemente tem sido investigado e demonstrado a geração de respostas inflamatórias além do tecido pulmonar (Block & Calderón-Garciduenas, 2009). A inalação de partículas ultrafinas induz aumento de histamina no lavado brônquio-alveolar e no plasma (Vermylen et al., 2005). A injeção endovenosa de $MP_{0,1}$ promove aumento do número de leucócitos e aumento da concentração plasmática de fator TNF, interleucina (IL) IL-6 e leucotrieno B₄, sugerindo o desencadeamento de uma resposta inflamatória sistêmica (Nemmar et al., 2009). As partículas podem além de induzir ativação da resposta imune inata, passar as barreiras de proteção pulmonar e

até mesmo hematoencefálica (BBB, do inglês *Blood-Brain Barrier*) e produzir respostas locais e sistêmicas através de efeitos diretos (Block & Calderón-Garciduenas, 2009).

Estudos com partículas (5 e 100 nm) de carbono e prata marcadas radioativamente demonstraram que essas são translocadas para a circulação e são detectadas já em 5 minutos após inalação ou por instilação (Nemmar et al., 2001a, b; Takenaka et al., 2001). Além disso, tem sido demonstrado que as pequenas frações de nanopartículas inaladas podem chegar ao cérebro (Elder et al., 2006; Oberdorster et al., 2004). Um mecanismo possível é alcançar o cérebro através do epitélio nasal olfativo translocando ao longo do nervo olfativo ou diretamente por deposição sobre os espaços alveolares e cruzar a barreira epitelial do pulmão e a barreira hematoencefálica (Oberdorster et al., 2004, Peters et al., 2006) e, portanto, também estar **acessível** a glândula pineal.

Partículas ultrafinas induzem respostas pró-inflamatórias no tecido cerebral. A administração intratraqueal de DEP em ratos induz aumento dos níveis de TNF tanto no soro como em todo o cérebro (Levesque et al., 2011). Van Berlo e colaboradores (2010) mostram que uma única exposição ao material particulado do diesel induz mudanças de expressão gênica no cérebro de ratos como a expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) e citocromo P450 1A1 (CYP1A1), de forma mais pronunciada na hipófise. Em camundongos a exposição ao material particulado fino/ultrafino por duas semanas induz ao

aumento significativo de TNF, IL-1 α , e do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) no cérebro (Campbell et al., 2005).

Mecanismos da resposta inflamatória

O mecanismo de ação pelo qual o MP induz respostas inflamatórias envolve vias moleculares usadas por PAMPS e DAMPS desencadeando a ativação da resposta imune inata e adaptativa (Miyata & van Eeden, 2011) (figura 4). TLRs são os principais sensores da resposta imune inata, receptores de membrana celular intracelulares que reconhecem padrões moleculares específicos expressos por patógenos (Medzников, 2001). Recentemente, acumulam-se evidências que demonstram que TLRs não são apenas ativados por PAMPS, mas moléculas endógenas liberadas durante lesão tecidual (Kawai & Akira, 2006; Park et al., 2004; Vollmar et al., 2010; Lee et al., 2013) e também por moléculas exógenas como as partículas ambientais, colocando um papel importante desses receptores na resposta inflamatória induzida pelo material particulado do ar (Miyata & van Eeden, 2011).

A família de receptores TLR em roedores é formada por 13 subtipos. Cada um dos subtipos tem seletividade para alguns PAMPs, por exemplo, fungos e parasitas reconhecem TLR2, enquanto TLR4 reconhece o lipopolissacarídeo (LPS) da membrana celular de bactérias gram-negativas, e TLR5 reconhece a flagelina do flagelo das mesmas bactérias (Kawai & Akira, 2006). Em adição aos receptores de

membrana, existem receptores intracelulares (TLR3, TLR7, TLR9 e TLR13) que reconhecem ácidos nucleicos de vírus, bactérias e padrões moleculares liberados de células mortas (Takeda & Akira, 2004). De maneira comum os estudos envolvendo TLRs e o material particulado demonstraram uma participação essencial de TLR2 e TLR4 na mediação dos efeitos inflamatórios do MP (Soukup et al., 2001; Becker et al., 2004, 2005; Shoenfelt et al., 2009; Kampfrath et al., 2011; Zhao et al., 2012; Lucas & Maes, 2013). A produção de citocinas induzidas por partículas (MP_{2.5-10}) é dependente da ativação de receptores TLR2/4 em células epiteliais das vias respiratórias humanas (Becker et al., 2004), em macrófagos (Becker et al., 2005; Shoenfelt et al., 2009) e em células de Kupffer (Tan et al., 2009). Ambas as respostas inflamatórias são dependentes da expressão da via de sinalização mediada pelo adaptador intracelular MyD88 (figura4), compartilhado pelos receptores TLR2 e TLR4. As partículas de poluição também são conhecidas por regular a expressão destes receptores, induzindo *dowregulation* da sinalização de TLR2 / 4 (Becker et al., 2005), sugerindo que estes receptores podem ser explorados como potenciais marcadores de poluição ambiental nessas células (Williams et al., 2007).

Figura 4. **Mecanismos de sinalização do material particulado do ar.** Partículas não associadas a algum material biológico são fagocitadas por reconhecimento independente de opsonização e capazes de ativar receptores do tipo *scavenger*, aquelas que contêm são opsonizadas por opsoninase endocitadas por vias envolvendo receptor Fc e receptor de complemento CR3. A via Myd88 é ativada pelo reconhecimento de TLR4 podendo também ser ativada por estresse oxidativo induzindo ativação da via de transcrição NF-κB e AP-1.

Diesel

O material particulado derivado da combustão do diesel (**DEP** – do inglês, *diesel exhaust particles*) consiste de partículas finas (<2.5 µm) e inclui também uma grande quantidade de partículas ultrafinas (< 0.1 µm). Essas partículas são basicamente compostas de um centro de carbono elementar (80%) adsorvidos de compostos orgânicos, principalmente hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) (Hiura et al., 1999, Penning et al., 1999, Li et al., 2002) e de sulfatos, nitratos, metais, em menor proporção (Fe, Ni, Cr, Cu, Cd, Pb

e V) e outros elementos. Todos componentes são considerados potencialmente tóxicos (Costa & Dreher, 1997, Adamson et al., 2000, Gavett et al., 2003, Pierdominici et al., 2014).

Devido ao pequeno tamanho das partículas, o DEP é inalável, podendo alcançar os alvéolos e translocar para a circulação. Em especial as partículas ultrafinas após a deposição nos pulmões, podem escapar da vigilância de macrófagos alveolares e ganhar acesso ao interstício pulmonar e assim atingir a circulação via órgãos linfoides ou atravessar a barreira endotelial (Oberdorster et al., 2002).

A exposição ao diesel prejudica a função imunológica, aumenta a susceptibilidade alérgica, gera inflamação pulmonar e sistêmica, e aumenta a responsividade de vias aéreas (Nemmar et al., 2003, 2007, 2009, Maier et al., 2008; Ema et al., 2013, Wichmann, 2007; Gerlofs-Nijland et al., 2010, Sawyer et al., 2010).

Poluição atmosférica de São Paulo: utilizando o concentrador de partículas

Os estudos que utilizam partículas artificiais ou através da recuperação de partículas ambientais por meio da coleta de filtros pouco representam sobre a complexidade do meio atmosférico, neste último caso, alterando as propriedades químicas e físicas do material particulado (Martins, 2010). Com o propósito de superar as limitações metodológicas sobre os estudos de poluição ambiental e a saúde foi desenvolvido o sistema de concentração de partículas que simula condições reais da atmosfera local com modelos de inalação. O

concentrador de partículas (CPA) foi desenvolvido pela Escola de Saúde Pública da Universidade de Harvard e adquirido e montado pelo Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LPAE) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP). Neste sistema, utilizado no presente trabalho, os animais são mantidos em câmaras durante o período experimental circulando livremente e respirando espontaneamente, dessa forma minimizando a manipulação e limitações de ensaios com sedação e intubação traqueal.

A estrutura do concentrador é formada por impactadores virtuais montados em série. O ar de São Paulo é captado, esses impactadores aceleram o fluxo de ar dirindo-o para uma passagem estreita enquanto é aplicado perpendicularmente um vácuo de alta intensidade que resulta na remoção de partículas ultrafinas de baixa densidade e de ar, o material particulado fino passa pelo sistema de concentração e segue para a câmara de exposição (Sioutas et al., 1995). Dessa forma, os animais respiram o mesmo ar da atmosfera de São Paulo, mas com material particulado concentrado, permitindo estudos sobre o efeito agudo da poluição em poucas horas.

Considerações finais:

Diferentes evidências tomadas em conjunto indicam que além de gerar injúria localmente, nos pulmões, os poluentes podem também alterar outros órgãos, inclusive aqueles situados no SNC, como a glândula pineal. Nesse contexto, o material particulado surge como um novo agente ambiental capaz de ativar o **Eixo Imune-Pineal**. A glândula pineal pode ser apontada como um alvo notável para estas partículas, uma vez que fica fora da barreira hematoencefálica e é capaz de reconhecer diversos mediadores inflamatórios que alteram a produção de melatonina. Ainda, é importante mencionar que a pineal expressa os receptores que, potencialmente, reconhecem o material particulado, assim como receptores para citocinas pró-inflamatórias que são induzidas pela exposição ao ar poluído. Nesse trabalho, buscamos entender se o material particulado da atmosfera poluída da cidade o ar de São Paulo é capaz de alterar a função da glândula pineal e, assim como uma resposta da ativação do *Eixo Imune-Pineal*, reduzir a melatonina plasmática noturna. Macrófagos alveolares são essenciais para a remoção de partículas inaladas e micróbios nas vias aéreas inferiores (Hiraiwa e Van Eeden, 2013, Hussell & Bell, 2014). Nossa pergunta também foi determinar se as células que interagem diretamente com o material particulado do ar produzem melatonina em resposta a poluição e o efeito dessa indolamina na função de macrófagos.

II. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi aumentar as bases experimentais para o entendimento de que a melatonina é regulada tanto na pineal como em células imunocompetentes a responder a diversos estímulos de injúria através de **mecanismos comuns** de sinalização envolvendo principalmente os receptores TLR e o fator de transcrição NF- κ B. Neste projeto pretendemos avaliar se o **material particulado**, o principal componente pró-inflamatório do ar poluído altera a produção de melatonina pela pineal e induz a produção extra-pineal.

Objetivos específicos

Produção noturna de melatonina

Avaliar a concentração plasmática noturna de melatonina e seu ritmo através da quantificação deste hormônio no plasma. Analisar a expressão da enzima chave da síntese de melatonina, AA-NAT, na forma nativa e fosforilada em glândulas pineais.

Via de transdução TLR/NF- κ B na pineal

Como caracterização da resposta imune inata na glândula iremos avaliar a ativação do fator NF- κ B, determinaremos a expressão de vários genes e proteínas envolvidos na resposta inflamatória, dentre eles os receptores da família *Toll-like*, de citocinas, IL-6 e TNF e

seus receptores e a via de transdução de sinal ativada por estes receptores.

Produção extrapineal de melatonina

Avaliar a produção extra-pineal periférica de melatonina, em macrófagos alveolares e de linhagem (RAW 264.7). Analisar a expressão da enzima chave da síntese de melatonina, AA-NAT na forma nativa e fosforilada.

Efeito da melatonina sobre a função de macrófagos

Avaliar o efeito da melatonina sobre a capacidade fagocítica de macrófagos e sua ação sobre a viabilidade celular.

MATERIAL E MÉTODOS

III. Material e Métodos

Animais

Para todos os experimentos descritos nesta tese foram utilizados ratos machos adultos (2-3 meses) da linhagem Wistar provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências-USP. O ciclo claro-escuro empregado foi de 12h claro/12h escuro, luz acesa às 07h00. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais Vertebrados em Experimentação do IB-USP (Processo 117/2010).

Exposição dos animais à poluição

Para a avaliação dos efeitos da exposição ao material particulado sobre a função pineal os animais experimentais foram expostos ao material particulado concentrado (MP) do ar de São Paulo com o auxílio de um concentrador de partículas ambientais (CPA), localizado na FM-USP. O CPA é um equipamento que foi desenvolvido pela Escola de Saúde Pública de Harvard– EUA e utiliza a tecnologia de impactadores virtuais, com o propósito de concentrar em uma hora aproximadamente 24 vezes as partículas ambientais inferiores a 2,5 micrômetros de diâmetro sem modificá-las química ou fisicamente (Sioutas et al., 1995, 1997). Sendo assim, a concentração do ar variou em função da qualidade do ar do dia do experimento, e por isso

definimos nossa exposição por tempo de exposição. O ar, então carregando uma concentração determinada de partículas, alimenta uma câmara onde animais estão alojados. Ao mesmo tempo animais controle são mantidos sob as mesmas condições de pressão, fluxo, temperatura e umidade relativa em outra câmara, disposta paralelamente é alimentada com ar filtrado para exposição. Em ambas as câmaras os animais são alojados em gaiolas apropriadas e estão livres para respirar naturalmente.

Caracterização da exposição

A caracterização da exposição foi feita a partir de filtros de amostragem equipados em impactadores tipo *Harvard* (Air Diagnostics, Harrison, ME) que foram conectados a cada uma das câmaras. Embora o CPA possua um monitor em tempo real da concentração de partículas, confirmamos gravimetricamente estas concentrações. Utilizando os mesmos filtros, uma análise qualitativa elementar (Na, Al, Si, P, S, K, Ca, Ti, V, Fe, Ni, Cu, Zn and Pb) foi realizada com auxílio de um espectrofotômetro de fluorescência de raio X (Shimadzu EDX 700).

Figura 5. Protocolo experimental. Ratos machos foram divididos em 3 grupos: naïve, controle (2, 4 e 6h) e poluído (1, 2, 4 e 6h). O grupo naïve não recebeu tratamento, animais controle e poluído entraram nas câmaras de exposição, o primeiro recebe ar limpo e o segundo inala o material particulado proveniente do ar da cidade de São Paulo. Todos os animais entram na câmara no mesmo horário (ZT12) e foram sacrificados no ZT 18. Diferentes tempos de exposição foram realizados, 1, 2, 4 e 6h antes do ZT 18. Para cada tempo de exposição à poluição tem-se um grupo controle referente ao horário. *Zeitgeber time* – ZT zero corresponde ao momento do ascender das luzes. A barra cinza representa a fase escura do dia.

Material particulado – Particulado do diesel

O material particulado utilizado para os estudos *in vitro* é derivado da combustão do óleo diesel coletado por meio de um dispositivo colocado nos escapamentos de ônibus de transporte público de São Paulo (Laks et al., 2008, ver composição tabelas 1 e 2) cedido pelo Laboratório de Poluição Atmosférica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A solução estoque de DEP foi preparada ressuspedendo 1,28 mg do DEP em 1 mL de tampão fosfato-salino estéril (PBS) pH 7,4 com a seguinte concentração (mM):

NaCL 137; KCl 2,7; Na₂HPO₄ 2,0; H₂O 8,1; KH₂PO₄. Esta solução foi homogeneizada em vórtex por 1 minuto e banho de ultrassom por 40 minutos (T -14, Thornton Impetch Eletrônica Ltda, SP, Brasil). Utilizamos a solução sempre imediatamente após a diluição.

Tabela 1. Metais presentes nas partículas de diesel (DEP, ppm).
(Segundo Laks et al., 2008)

METAIS	DEP
Níquel (Ni)	0.181 ± 0.037
Enxofre (S)	0.626 ± 0.416
Ferro (Fe)	74,55 ± 2.266
Vanádio (V)	0.037 ± 0.013
Chumbo (Pb)	0.05 ± 0.047
Cadmio (Cd)	0.029 ± 0.008
Cromo (Cr)	0.161 ± 0.116
Cobre (Cu)	0.017 ± 0.001

Tabela 2. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs, ng/g) presentes nas partículas de diesel (Laks et al., 2008).

HAPs	DEP
Naftaleno	49,23
Acenaftileno	179,48
Fluoreno	683,94
Antraceno	94,73
Pireno	12838,27
Benzo(a)antraceno	1162,73
Benzo(b)fluoranteno	789,93
Benzo(c)fluoranteno	562,28
Benzopireno	1642,28

Drogas e Reagentes

As drogas e reagentes utilizados estão listados a seguir, de acordo com a procedência.

- Abcam (Cambridge, MA, EUA): anticorpos anti-IBA1 (AB 5076)
- Calbiochem (Darmstadt, Alemanha): NP-40;
- GE Healthcare Life Sciences (Buckinghamshire, Reino Unido): coluna microspin Sefadex G-25.
- Gibco BRL (Grand Island, NY, EUA): penicilina; estreptomicina; glutamina;
- Invitrogen Life Technology (USA): ditioneitol (DTT); fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF); anticorpo secundário anti-coelho conjugado ao fluoróforo FITC; T4 polinucleotídeo quinase.
- Merck (Brasil): acetate de sódio; ácido cítrico; ácido clorídrico; ácido perclórico; álcool etílico; EDTA (do inglês, *ethylenediaminetetracetic acid dissodium salt*); metanol; metabisulfito de sódio;
- Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Califórnia, EUA): anticorpos para as proteínas da via NF-KB p-50 (sc-114X); RelA (sc-109X); p52 (sc-298X); c-Rel (sc-70X); RelB (sc-226X); BCL-3 (sc-185X), NOS2 (sc-6511)
- Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EUA): 5-hidroxitriptamina; N-acetilserotonina; melatonina;

noradrenalina [(-) *arterenol hydrochloride*]; HEPES; meio de cultura BGJb; bisacrilamida (N, N'-methylenebisacrylamide); poli(dIdC), anti-AANAT (S0564), anti-rabbit FITC ().

- Perkin Elmer (Boston, MA, EUA): Easy Tides Adenosine 5'-triphosphate, [γ - ^{32}P].
- Promega (Madison, MA, EUA): Oligonucleotídeo consenso para NF-KB (5'-AGTTG AGGGGACTTTCCCAGGC-3'); AP-1 (5'-CGTTGATGAGTCAGCCGG AA-3').

Preparo de Drogas

Os padrões de N-Acetilserotonina e melatonina para cromatografia foram preparados em solução estoque na concentração de 1 mM em 0,1M de ácido clorídrico acrescido de 0,02% de metabissulfito de sódio e 0,02% EDTA dissódico. Os estoques permaneceram congelados a -80°C até o uso e por período inferior a 60 dias. No momento do uso, os padrões foram diluídos em ácido perclórico 0,1 M acrescido de 0,02% de metabissulfito de sódio e 0,02% de EDTA dissódico.

As soluções estoque de noradrenalina foram preparadas em ácido clorídrico 0,01 M, diluídas no momento do uso em solução aquosa de ácido ascórbico (50 mg/L).

O inibidor CLI-095, também conhecido como TAK-242 foi solubilizado em DMSO (100%) (1mg/mL) e posteriormente diluído em meio de cultura até a concentração de uso. Luzindole foi diluído em etanol (100%) (10^{-2} M) e posteriormente em meio de cultura.

Teste de Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste colorimétrico de MTT. Células RAW 264.7 foram semeadas na densidade 2×10^5 células/poço em placas de 96 poços tratadas ou não com DEP nas concentrações 1, 4, 16, 32, 64, 128, 256 e 512 $\mu\text{g/mL}$ durante 6, 12 e 24 horas. Após este período as células foram incubadas com MTT (0,5 mg/mL) por 4h a 37°C , e a seguir foi adicionado dimetilsulfóxido (DMSO) por 30 minutos sob agitação constante. O DMSO permite a solubilização do *formazan*, composto que é quantificado por fluorometria. As placas foram lidas em espectrofotômetro de microplacas (Spectramax 250, Molecular Devices, CA, EUA) a 540 nm. A viabilidade celular foi definida de acordo com o percentual de densidade óptica de cada grupo em relação ao grupo controle. Células mortas não convertem MTT em *formazan*.

Marcação de Anexina e Iodeto de propídio

Para avaliar o tipo de morte celular induzido pelo material particulado do diesel marcamos as células com iodeto de propídio e Anexina V. Os marcadores Anexina V e iodeto são regularmente combinados para distinguir padrões diferentes de morte celular. A marcação com Anexina V é usada para determinar quantitativamente a porcentagem de células dentro de uma população que podem ativamente sofrer apoptose e o Iodeto de Propídio (PI) é um marcador nuclear utilizado para distinguir células apoptóticas de células necróticas. Após os tratamentos as células foram removidas por

raspagem e centrifugadas (1500 RPM) por 5 minutos (10^7 cel/mL). Foram ressuspendidas em PBS contendo azida sódica (0.1%) e soro fetal bovino (2%). Após centrifugação foram incubadas com PI (1 μ g/mL, Life Technologies) e Anexina (1:20, Life Technologies) por 30 min (4 °C). Após a marcação foram lavadas com PBS e levadas ao citômetro de imagem para leitura (FlowSight, Amnis) dentro de até 2 horas.

HPLC

A concentração melatonina no meio de pineais estimuladas por noradrenalina foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando-se um sistema de detecção eletroquímico (Ferreira et al, 1994). Resumidamente, 20 μ L da solução final de cada amostra foi injetada no sistema cromatográfico Shimadzu (Kyoto, Japan), o qual foi isocraticamente operado. A fase móvel era composta por 0,1 M de acetato de sódio, 0,1 M de ácido cítrico, 0,15 de mM EDTA, e 30 % de metanol (pH 3,7). A taxa de fluxo da fase móvel era de 0,5 mL/min através de uma coluna de fase reversa Resolve C18 de 5- μ m (150 X 3,9 mm i.d., Waters). O potencial do detector foi ajustado para +0,90 V (eletrodo de referência Ag/AgCl).

Dosagens de melatonina

O conteúdo de melatonina foi quantificado em sobrenadante das células RAW 264.7, de macrófagos alveolares (2×10^6 , 300 μ L, placas de 24 poços) e no plasma noturno através de ensaio imunoenzimático (Melatonin, ELISA, IBL, Hamburg, Alemanha) de acordo com instruções do fabricante.

Cultura de glândulas pineais

A cultura de glândulas pineais foi realizada segundo protocolo descrito por Ferreira e colaboradores (1994). As pineais foram retiradas e imersas em meio BGJb a 4°C. Posteriormente foram cultivadas em placas de 24 poços, uma glândula por poço, contendo meio de cultura BGJb (enriquecido com 1% glutamina; 1% estreptomicina) e mantidas à temperatura de 37° C em atmosfera com 95% de saturação de O₂ e 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada 24 horas de cultura, e antes da estimulação com as drogas *in vitro*. Após a estimulação, as glândulas e o meio de cultura foram armazenadas em freezer a -80°C.

Macrófagos RAW 264.7

Foram utilizadas células da linhagem imortalizada de macrófagos murinos RAW 264.7 cedidas pelo Prof. João Gustavo Amarante Mendes (Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo). O modelo de expressão da proteína repórter DsRed2 ligada a sequências do promotor gene da *Aa-nat* foi desenvolvido a

partir dessas células com protocolo descrito por Muxel e colaboradores (2012). As células foram cultivadas em meio RPMI (Life Technologies, USA) suplementado com antibiótico (100 U/mL) e soro fetal bovino (10%). Os experimentos foram sempre realizados até a oitava passagem celular. A concentração cultivada de células e a quantidade de meio utilizada variou conforme o protocolo de ensaio.

Macrófagos alveolares

Os macrófagos alveolares foram obtidos por lavado broncoalveolar em ratos com PBS gelado (mM: 137 NaCl, 2.7 KCl, 8.1 Na₂HPO₄ 2 H₂O, KH₂PO₄, pH 7.4) e centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos. Após essa etapa, as células foram ressuspensas em meio de cultura (RPMI 1640 CULTILAB) suplementado com soro fetal bovino a 10% e antibióticos: penicilina (100U/mL), estreptomicina (100µg/mL), em seguida, as células foram contadas em Câmara de *Neubauer*, colocando-se a suspensão de células e o corante azul *tripan*. Após a contagem, as células foram ressuspensas em meio de cultura e plaqueadas. Para adesão, as células foram mantidas por 2 horas a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e após esse período, o meio trocado e as células não aderentes descartadas, com proporção de macrófagos final em torno de 95%. As células foram mantidas em cultura por 18 horas até os tratamentos experimentais.

Detecção de citocinas

A detecção das citocinas foi realizada através de ensaio Multiplex (*Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel*, RECYTMAG-65, Merck Millipore). A placa foi lida no aparelho Magpix e analisada através do software Analyst (Millipore).

Transcrição Gênica

Extração de RNA

Estes experimentos foram realizados em glândulas pineais de ratos eutanasiados na fase de escuro no ZT18. A extração de RNA foi realizada utilizando-se o reagente TRIzol®, conforme instruções do fabricante (Invitrogen, EUA). De forma resumida, as glândulas foram homogeneizadas em 100 µL de TRIzol® com auxílio de um homogeneizador e pistilo para tubo plástico de 1,5 mL de volume. Em seguida, o homogenato foi acrescido de 900 µL de TRIzol® e o RNA foi isolado em outro tubo pela adição de clorofórmio e centrifugação (12000 g, 15 min, 4°C). A precipitação do RNA foi realizada por isopropanol seguida de nova centrifugação (12000 g, 15 min, 4°C). Em seguida, o *pellet* de RNA foi lavado por duas vezes com etanol 75% seguido de centrifugação (7500 g, 5 min, 4°C). Após a remoção do etanol a amostra foi solubilizada em água de injeção estéril (Baker, Brasil). A quantificação do RNA foi realizada no espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 de acordo com as instruções do equipamento e, em seguida, a amostra foi tratada com DNase de acordo com as

recomendações do fabricante (Invitrogen) e seguiu-se a realização da síntese de cDNA através do protocolo da Super Script III de acordo com as recomendações do fabricante (Invitrogen).

A expressão gênica dos componentes da maquinaria de sinalização dos TLRs foi determinada por kit comercial de arranjo de PCR em tempo real “*Rat Toll-Like receptor signaling pathway*” (CAT: PARN-018A, Qiagen, Frederick, MD, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Os estudos com estes arranjos de PCR em tempo real foram realizados com 3 *pools* por ponto analisado. Cada *pool* continha 3 amostras de cDNA diferentes. Em cada placa de PCR fornecido no arranjo havia 96 poços referentes a 84 genes relevantes na sinalização dos TLRs, cinco genes de referência (*housekeeping* genes: *Rplp1*, *Rpl13a*, *Hprt1*, *Ldha* e *Actb*), e controles em cada placa para a determinação de contaminação com DNA genômico, qualidade de RNA e desempenho da corrida de qPCR em cada ensaio. Neste ponto é importante ressaltar que esta ferramenta se mostrou efetiva em análises que realizamos para determinar a reprodutibilidade entre placas utilizando um mesmo *pool* de cDNAs. Além disso, os resultados foram aprovados pelos controles providos em cada ensaio. Quando observado que alguma corrida não foi aprovada nos controles do kit, novo ensaio foi realizado utilizando-se outras amostras.

Optamos por normalizar os dados pelo *housekeeping* gene *Hprt1* (*Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*), que foi o que apresentou menor variação entre as amostras. A análise estatística dos dados foi

feita por análise de variância de uma via seguida de teste Newman-Keuls comparando os diferentes grupos.

Normalizamos os dados pelo método *Delta-Delta CT* ($\Delta\Delta Ct$, *delta-delta cycle threshold*). O Ct se refere ao número de ciclos necessários para detectar a amplificação gênica. Para o cálculo primeiramente se obtém a diferença entre o Ct dos genes de interesse e o Ct do gene normalizador (*Hprt1*). Em seguida, se obtém um segundo delta que é a diferença entre os delta-Ct das amostras dos grupos experimentais e amostras controle- grupo que recebeu ar filtrado. Por fim, através da formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, são gerados os valores que indicam a variação da expressão entre os grupos poluídos e grupo controle (*fold-change*)

Imunohistoquímica da glândula pineal

Cada pineal foi removida do crânio e fixada em paraformoldeído 4% por 24 horas a 4 °C seguido pela crioproteção em solução de sacarose 30% em tampão fosfato-salino (PBS) a 4°C por 18h adicionais. As pineais foram então incluídas em meio para congelamento (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Torrence, CA, EUA), rapidamente congeladas em gelo seco e estocadas a -80 °C. Os cortes foram realizados em criostato com espessura de 20 µm. Os cortes foram inicialmente lavados em PBS (3X 10 min) seguido por incubação com solução de bloqueio (2% de albumina e 0,3% de Triton X em PBS) a temperatura ambiente por 60 min. Foi então realizada a incubação com os anticorpos primários: produzido em coelho anti-AA-

NAT (1:1300, Sigma), monoclonal produzido em camundongo anti-IBA-1 (1:100, Abcam) por 48 h a 4°C. Após esta etapa, os cortes foram novamente lavados em PBS (30 min), seguindo-se incubação dos anticorpos secundários fluorescentes apropriados: anti-coelho conjugado ao FITC (1:200, Sigma-Aldrich) e anti-camundongo conjugado ao Cy3 (1:200, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) por 90 min em temperatura ambiente. O núcleo foi marcado com DAPI (30 µM, 5 min, Invitrogen) diluído em PBS e incubado em temperatura ambiente.

Os controles negativos foram realizados com a omissão do anticorpo primário e incubação dos cortes com o anticorpo secundário correspondente. A marcação foi observada por microscopia confocal (Zeiss, LSM510, Baden-Wurttemberg, Alemanha) sendo utilizado o laser HeNe 543 para excitação do fluoróforo Cy3 no comprimento de onda de 590 nm e filtro de emissão em 560 nm. Para a excitação do fluoróforo FITC utilizou-se laser argônio no comprimento de onda de 488 nm e filtro de emissão em 505. O laser enterprise foi utilizado para excitação do marcador DAPI no comprimento de onda de 364 nm e a emissão verificada com filtro de 435-485 nm.

Extração de proteína nuclear

Após cultivo ou exposição *in vivo* dos animais, as glândulas pineais foram armazenadas em freezer -80° C e depois processadas para extração de proteínas conforme protocolo proposto por Ferreira e colaboradores (2005). Cada glândula pineal separadamente foi homogeneizada em 100 µL de tampão de lise (HEPES, PH 7,5, 10 mM; KCl 10 mM; EDTA 0,1 mM; glicerol 10%, DTT, 1 mM, PMSF, 0,1 mM) com utilização de um homogenizador e pistilo de 1,5 mL. Em seguida, foi adicionado 12,5 µL do detergente NP-40 (10%), as amostras foram agitadas rapidamente com auxílio do vortex e incubadas em gelo por 15 min. Após esse período as amostras foram centrifugadas (12000 g, 1 min, 4 °C) e o sobrenadante, correspondente a fração citoplasmática do extrato, descartado o *pellet* resultante foi então lavado com 50 µL do tampão de lise e centrifugado (12000 g, 1 min, 4 °C) sendo o sobrenadante novamente descartado. O pellet nuclear formado foi ressuspenso em 20 µL do tampão de extrato nuclear (HEPES, pH 7,5, 10 mM; KCl 5 M; EDTA 1 mM; glicerol 10%, DTT 1 mM, PMSF 0,1 mM) ficando 15 min em gelo sob agitação. Após centrifugação (20.000 g, 5 min, 4 °C) o sobrenadante (extrato nuclear) foi aliquotado e estocado a -20 °C até o ensaio. A quantificação da concentração de proteína dos extratos foi realizada a 280 nm através do espectrofotômetro ND-1000 (Nanodrop, Wilmington, DE, EUA).

Ensaio de eletromobilidade por retardo em gel (EMSA)

Utilizamos o EMSA para determinar o acúmulo nuclear do fator NF- κ B. O ensaio consiste na reação de ligação de proteínas do extrato nuclear com a sequência consenso específica para o fator de transcrição NF- κ B marcada com o radioisótopo ^{32}P .

Para os ensaios foi utilizado 6 μg de proteína do extrato nuclear de pineais. Seguiu-se incubação deste extrato, com tampão de ensaio (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl_2 1 mM, NaCl 50 mM, DTT 0,5 mM, EDTA 0,5 mM, poli(dIdC) 1 μg e glicerol 4%) por 20 min em temperatura ambiente. Na sequência, as amostras foram incubadas por 30 min em temperatura ambiente com 40000 cpm de sonda de oligonucleotídeo dupla-fita correspondente ao consenso para NF- κ B (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3', Promega, Madison, WI, EUA) marcado com radioisótopo. A marcação da sonda foi realizada pela incubação do oligonucleotídeo consenso para NF- κ B com 1 μL de [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP (atividade específica 3000 Ci/mmol) na presença da enzima T4 polinucleotídeo quinase (10 U). Esta enzima substitui os fósforos do oligonucleotídeo por fósforo radioativo e o que não é incorporado é removido por coluna sefadex G-25 (GE Healthcare Life Sciences). Em seguida, foi adicionado 2 μL de tampão de corrida (Tris-HCl 250 mM pH 7,5, glicerol 4%, azul de bromofenol 0,2%). Os complexos proteína-DNA foram analisados em gel de poliacrilamida não-desnaturante, 6% de acrilamida: bisacrilamida (37,5: 1) por eletroforese (150V, 1h 30min) em tampão 0,25 x de Tris-borato/EDTA

(TBE). Finalizada a corrida, o gel foi seco a vácuo, exposto ao filme BIOMAX-MS (Kodak, Rochester, NY, EUA) em cassete apropriado por 48 h a -80°C . Seguiu-se revelação por imersão do filme em solução reveladora por 5 min (Kodak, Rochester, NY, EUA) e em solução fixadora por 10 min (Kodak, Rochester, NY, EUA). As autoradiografias foram quantificadas através do programa Image J. A especificidade da sonda de NF- κ B foi testificada através do ensaio de competição. Neste ensaio uma sonda fria (não-marcada) de NF- κ B e AP-1 são incubados juntos com a sonda marcada. Apenas a sonda para NF- κ B, é capaz de deslocar a marcação no gel, reduzindo a formação dos complexos, portanto específica (figura 6).

Figura 6. **Especificidade do NF- κ B validada pelo ensaio de competição.** O ensaio foi realizado com um pool de 4 extratos nucleares de glândulas provenientes de animais não tratados durante o dia e à noite. Os oligonucleotídeos de NF- κ B ou AP-1 não marcados foram utilizados 10X, 30X, 100X e 300X em excesso. Apenas a sequência NF- κ B não marcada é capaz de reduzir a marcação com a sonda de mesma sequência marcada mostrando sua especificidade.

Ensaio de *supershift*

As subunidades de NF- κ B presentes em extratos nucleares de glândulas pineais foram identificadas através do ensaio de EMSA. Foram utilizados 6 μ g de proteína de um *pool* de 4 extratos de cada grupo experimental. Neste ensaio foram adicionados 2 μ g/mL anticorpos específicos para subunidades de NF- κ B: Rel A, p50, p52, c-Rel, RelB, e Bcl3 por 45 minutos antes da incubação dos extratos com a sonda consenso para NF- κ B - 32 P. As demais etapas que se seguem foram realizadas conforme o protocolo de EMSA descrito anteriormente.

RESULTADOS

IV. Resultados

Exposição “*in vivo*” ao material particulado

Efeito da poluição do ar sobre a produção noturna de melatonina

Em estudo do laboratório foi demonstrado que a injeção intravenosa de LPS 2 horas antes do ZT18, isto é, 6 horas após o apagar das luzes (ver esquema, figura 5), induz uma inibição significativa na concentração de melatonina plasmática noturna (Tamura et al., 2010). Para avaliar o efeito do material particulado sobre a produção de melatonina pela glândula pineal optamos em seguir o mesmo racional desenvolvido, em que fixamos o tempo de eutanásia dos animais no ZT18 e expomos os animais uma, duas, 4 e 6 horas antes.

Para isso utilizamos três grupos experimentais: 1) **naïve**, ratos transportados para a sala em que estão as câmaras experimentais, mas que ficam alojados nas gaiolas de origem; **controle**, ratos expostos à câmara contendo ar filtrado; **poluído**, ratos colocados em câmara para inalar material particulado concentrado proveniente do ar da cidade de São Paulo. Os animais entram na câmara em ZT12 e são mortos em ZT18. O horário de injeção do ar poluído ou filtrado foi iniciado após o apagar das luzes no ZT12, ZT14 e ZT16. Desta forma, os animais foram expostos às 2h, 4h ou 6h de poluição durante a fase de escuro ambiental. Estes experimentos foram repetidos duas (ZT14)

ou três vezes (ZT12 e ZT 16) em dias diferentes. Para análise dos dados obtidos em diferentes dias, a normalização foi feita considerando-se como 100% o valor médio do grupo naïve de cada dia. A concentração média de melatonina plasmática encontrada nos animais do grupo naïve foi de $95,3 \pm 8,2$ pg/mL. Observamos que não há diferença significativa na concentração de melatonina entre os animais controle nos diferentes horários e também quando comparamos aos animais naïve (figura 7). A concentração de melatonina plasmática foi significativamente reduzida após 4 e 6 horas de exposição ao material particulado quando comparado ao grupo controle e naïve (respectivamente, controle $93,6 \pm 9$ %, poluído $59,9 \pm 4,8$ % e controle $93,8 \pm 7,5$ %, poluído $60,7 \pm 4$), mas não quando expostos por 2 horas, (figura 7).

Figura 7. **Efeito do material particulado sobre produção noturna de melatonina.** A concentração de melatonina plasmática dos grupos: naïve, controle (quadrados) e poluído (círculos) foi determinada por ELISA (pg/mL). Os valores encontrados foram normalizados em porcentagem tendo como 100% o grupo naïve para cada bloco de horários ($95,3 \pm 8,2$ pg/mL). Os dados estão expressos como a média $\pm$ e.p.m. * $p < 0,05$ vs grupo controle. N= 8-16 animais. N = 8 experimentos independentes.

Efeito do MP sobre a expressão da enzima AA-NAT

A AA-NAT é a enzima chave para síntese noturna de melatonina, responsável pelo ritmo circadiano de sua produção. Em ratos é transcrita apenas na fase de escuro. Para avaliar o efeito inibitório do material particulado na via biossintética da melatonina analisamos a expressão da AA-NAT através da imunomarcagem em cortes de pineais. Para marcação da AA-NAT utilizamos o anticorpo primário específico seguido do secundário fluorescente (em verde, FITC). É possível verificar na figura 8 a imunorreatividade positiva para AA-NAT nos grupos naïve e controle, e a redução no grupo poluído (4 e 6h).

Figura 8. **O MP induz a redução da imunorreatividade para AA-NAT em glândulas pineais de rato.** Imagens representativas do ensaio de imunohistoquímica para AA-NAT (marcada em verde) em cortes congelados de glândulas pineais (20 μ m). **A)** Imagem representativa da imunorreatividade positiva do grupo naïve noite, e negativa para animal eutanasiado no ZT 6, considerado aqui naïve dia. **B)** Imagens representativas de cortes de animais que receberam o ar poluído ou ar filtrado nos diferentes tempos testados demonstrando a redução da imunorreatividade para AA-NAT nos tempos de 4 e 6h de exposição ao MP. Barra = 100 μ m.

Nosso segundo objetivo foi verificar se a poluição do ar é capaz de regular a atividade do fator NF- κ B na pineal. Para avaliar o acúmulo nuclear do NF- κ B nas glândulas pineais utilizamos o Ensaio de Eletromobilidade em Gel (EMSA). A sonda específica para NF- κ B o revelou dois complexos (C1 e C2) (figura 9) nos extratos nucleares da pineal. Detectamos o aumento nuclear do NF- κ B já nos primeiros 30 minutos de exposição dos animais ao material particulado. Esse

aumento é mantido até duas horas quando comparado ao grupo controle correspondente e após 6 horas de exposição se torna próximo ao nível de acúmulo do grupo naíve.

Figura 9. **Efeito do material particulado sobre a translocação nuclear do fator NF-κB.** **A)** Para cada tempo (30-360 min) está representado a autorradiografia do EMSA e **B)** análise densitométrica gráfica (direita) obtida pelo analisador de gel do programa Image J, referente aos complexos 1 e 2 (C1 e C2) do grupo controle, poluído e naíve. Cada ponto foi obtido a partir de um pool de 3-4 glândulas. * $p < 0.05$ vs controle. N= 3 experimentos independentes.

A translocação das subunidades envolvidas do NF-κB foi verificada pelo ensaio de *supershift* no qual um pool de extratos nucleares foi incubado anticorpos específicos para subunidades do NF-κB: p50, Rel A, p52, c-Rel, Rel B e Bcl-3. Quando é adicionado um anticorpo com a proteína de interesse forma-se um complexo maior

que promove um retardo adicional na migração dos extratos no gel o que nomeamos de *shift*, sendo neste caso um supershift. Apenas o complexo C1 sofreu *shift*, portanto, não foi possível identificar C2 (Figura 10). Analisamos os extratos de glândulas de animais expostos 30 minutos e o controle deste tempo. Observamos que em extratos nucleares de animais controle há retardo para p50, mas não para os outros anticorpos testados. Já nos animais do grupo poluído além do retardo verificado com anticorpo para p50 também observamos para subunidade Rel A do NF- κ B. A incubação com anticorpo anti-p50 promove o deslocamento de praticamente todo o complexo, enquanto que Rel A promove um deslocamento parcial de C1. É possível ainda visualizar que essas bandas aparecem mais fortes no grupo poluído, já que nestes animais há aumento do acúmulo nuclear no tempo analisado.

Figura 10. **Efeito do material particulado sobre a translocação de subunidades do NF- κ B de glândulas pineais de rato.** Autoradiografia representativa do ensaio de *supershift* para subunidades p50, RelA, p52, RelB, c-Rel, Bcl-3 de glândulas pineais de animais controle e expostos ao MP por 30 minutos. Cada ponto foi obtido a partir de um pool de 3-4 glândulas.

Efeito da exposição ao material particulado sobre a expressão de genes ativados por TLRs.

A ativação de receptores TLR2, TLR6, TLR4 e TNFR-1 promove um aumento rápido do conteúdo nuclear do NF- κ B e bloqueio da síntese de melatonina induzida por noradrenalina em glândulas pineais de rato cultivadas (Fernandes et al., 2006, Carvalho-Sousa et al, 2011, da Silveira Cruz Machado et al, 2012, da Silveira Cruz Machado, 2015). Observamos que há uma redução importante da melatonina plasmática nos animais que receberam o ar poluído ao mesmo passo que há um aumento no acúmulo nuclear do NF- κ B nas pineais. Nesse mesmo sentido, sabemos que o material particulado pode sinalizar via receptores de PAMPs e DAMPS. Para entender os mecanismos responsáveis pela regulação da síntese da melatonina avaliamos a via de sinalização da família de **receptores TLRs**. Nosso objetivo foi entender por quais mecanismos essas partículas agem e quais proteínas estão envolvidas na transdução desse sinal. Analisamos **84** genes neste arranjo de qPCR relacionados com a transdução de sinal mediada via TLR: *Toll-like receptor*, 8 genes de receptores da família **TLRs** (*Tlr1*, *Tlr2*, *Tlr3*, *Tlr4*, *Tlr5*, *Tlr6*, *Tlr7*, *Tlr9*); 38 genes de adaptadores ou efetores que participam da via intracelular de sinalização via TLRs (*Btk*, *Casp8*, *Cebpb*, *Cd14*, *Cd180*, *Cd80*, *Cd86*, *Clec4e*, *Chuk*, *Eif2ak2*, *Fadd*, *Fos*, *Hras*, *Ikbkb*, *Irak1*, *Irak2*, *Irf1*, *Irf3*, *Jun*, *Kcnh8*, *Ly96*, *Mal*, *Myd88*, *Nr2c2*, *Ppara*, *Peli1*, *Pglyrp1*, *Ripk2*, *Rnf138*, *Sarm1*, *Tbk1*, *Ticam2*, *Tnip2*, *Tollip*, *Tradd*, *Traf6*, *Ube2n*, *Ube2v1*), 8 genes de membros da família **NF- κ B** (*Nfkb1*,

Nfkbia, *Nfkbib*, *Nfkbil1*, *Nfrkb*, *Rel*, *Rela*, e *Nfkb2*), 8 genes de membros família das **MAPKs** (*Map2k3*, *Map2k4*, *Map3k1*, *Map3k7*, *Map4k4*, *Mapk8*, *Mapk8ip3*, *Mapk9*), 19 genes de **citocinas** (*Ccl2*, *Csf2*, *Csf3*, *Cxcl10*, *Hmgb1*, *Hspa1a*, *Hspd1*, *Il1a*, *Il1b*, *Il2*, *Il6*, *Il10*, *Il12a*, *Ifna1*, *Ifnb*, *Ifng*, *Lta*, *Ptgs2* e *Tnf*) e três genes de receptores de citocinas (*Il1r1*, *Il6r* e *Tnfrsf1a*).

Do total de genes avaliados, apenas **5** não estavam constitutivamente expressos (*Ifna1*, *Ifnb*, *Ifng*, *Il6* e *Tlr5*) em nenhum dos grupos experimentais. Os genes *Il1a* e *Tnf* não são expressos nos animais que receberam ar filtrado, mas passam a ser detectados nas pineais de animais expostos ao ar poluído. A tabela 2 mostra a expressão relativa dos 79 genes expressos na pineal de ratos expostos por 1 e 6 horas ao material particulado. Os genes com *fold-change* menor que 1 indicam uma regulação negativa, em azul (*dowregulation*) enquanto valores maiores que 2 indicam uma expressão positiva, em vermelho (*upregulation*). De 79 genes expressos **38** genes foram regulados de maneira significativa ($p < 0,05$) nos grupos que receberam ar poluído. Desses 38, **37** foram regulados positivamente após **1 hora** de exposição e apenas **9** ainda apresentavam expressão significativamente diferente do controle no grupo exposto por **6 horas**. Na figura 11 é possível visualizar o perfil de variação relativa entre os dois grupos. A representação de Volcano ajuda a identificar claramente as variações de expressão gênica entre os grupos. Esse gráfico combina o valor “p” estatístico com o *fold*

regulation possibilitando identificar os genes com baixa e alta expressão que são estatisticamente significativos.

Em 1 hora de exposição vários genes são regulados positivamente, principalmente aqueles associados à ativação ou regulação do NF- κ B e regulados por este fator, como as citocinas, IL-1 α e beta, TNF, PG2. Já após as 6 horas de exposição ao ar poluído essa resposta é controlada, reduzindo a expressão gênica induzida pelo material particulado.

Figura 11. **Representação gráfica de Volcano da expressão relativa dos genes associados à via TLR.** No eixo X é representado o valor de p ($\log_2$) e no eixo Y ($\log_{10}$) os valores de expressão relativa (*fold change*) para 1 e 6 horas de exposição ao material particulado.

Na figura 12 estão representadas famílias de genes associadas diretamente à sinalização TLR em relação ao tempo de exposição ao MP: receptores TLR e adaptadores, proteínas da família Rel e efetores, e citocinas e alguns receptores. A expressão dos genes da família NF- κ B, *Rel*, *Rel A*, *Nfkb2*, *Nfrkb*, *Nfkb1a*, *Nfkb1*, *Nfkb1b* e *NFkbil1* tem expressão aumentada em 1 hora com redução após as 6 horas de exposição. Em relação aos efetores da via NF- κ B segue-se esse mesmo

perfil de aumento para todos com exceção ao gene *Caspase 8*. Os receptores TLR também sofrem *upregulation* em 1 hora de ar poluído (*Tlr1*, *Tlr2*, *Tlr3*, *Tlr4*, *Tlr6*, *Tlr7*, *Tlr9*), sendo que o *Tlr5* não é expresso em nenhum dos tempos, e dentro dos que expressam o receptor *Tlr7* não sofreu variação. Os adaptadores também tem sua expressão aumentada em 1 hora, *Ticam 2*, *Irak1*, *Irak 2*, *Peli1*, *Traf6*, *Mal*, *Myd88*, *CD14*, *Ly6* e *Rnf138*.

A expressão dos genes que codificam citocinas apresenta uma variação temporal ao longo da exposição ao ar poluído. Os genes das citocinas, *Tnf*, *Il1b*, *Ptgs2*, *Hmgb1*, *Lta*, *Il1a*, *Il12a* e *Il2* tem máxima expressão após uma hora de exposição, enquanto *Il10*, *Cxcl10* e *Cxcl12* após 6 horas. As citocinas *Csf2* e *Csf3* não se alteram. A expressão de todos dos demais genes do painel está apresentada na tabela 3.

Figura 12. **Expressão dos genes de adaptadores e efetores da via de transcrição NF-κB, receptores e adaptadores TLR, citocinas e seus receptores.** Os resultados estão apresentados como média $\pm$ e.p.m da razão da expressão relativa. Os experimentos foram realizados com pools de quatro amostras de cDNA por experimento. N= 2 experimentos independentes (8 glândulas).

Tabela 3 – Expressão relativa de genes associados à via de sinalização de receptores do tipo *Toll like* (TLR) em glândulas pineais de animais expostos por 1 ou 6 horas ao material particulado.

Gene		Expressão relativa (média ± epm)	
		1 h	6 h
Símbolo	Nome	<i>Fold Change</i>	<i>Fold Change</i>
Btk	<i>Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase</i>	4,25 ± 0,84 *	3,68*
Casp8	<i>Caspase 8</i>	1,02 ± 0,04	1,7 ± 0,31
Ccl2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i>	4,18 ± 0,91	5,34 ± 1,11
Cd14	<i>CD14 molecule</i>	7,05 ± 1,47*	2,43 ± 0,90
Cd80	<i>Cd80 molecule</i>	4,86 ± 1,28	2,63 ± 1,08
Cd86	<i>CD86 molecule</i>	2,88 ± 1,526	2,06 ± 0,683
Cebpb	<i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta</i>	4,89 ± 1,00	1,87 ± 0,607
Chuk	<i>Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase</i>	6,41 ± 1,16*	2,84 ± 0,787
Clec4e	<i>C-type lectin domain family 4, member e</i>	3,73 ± 0,24*	1,09 ± 0,477
Csf2	<i>Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)</i>	0,95 ± 0,16	0,96 ± 0,060
Csf3	<i>Colony stimulating factor 3 (granulocyte)</i>	1,34 ± 0,01	1,35 ± 0,08
Cxcl10	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 10</i>	5,41 ± 1,18	8,04 ± 1,6*
Fadd	<i>Fas (TNFRSF6)-associated via death domain</i>	5,67 ± 0,31*	3,07 ± 1,25
Fos	<i>FBJ osteosarcoma oncogene</i>	1,34 ± 0,14	2,19 ± 0,81
Hmgb1	<i>High mobility group box 1</i>	4,59 ± 0,83*	4,22 ± 0,30*
Hras	<i>Harvey rat sarcoma virus oncogene</i>	5,17 ± 1,33	2,35 ± 0,51
Hspa1a	<i>Heat shock 70kD protein 1A</i>	5,37 ± 0,61*	2,66 ± 0,94
Hspd1	<i>Heat shock protein 1 (chaperonin)</i>	5,63 ± 0,60	3,44 ± 1,31
Ikbkb	<i>Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta</i>	4,83 ± 0,63*	2,25 ± 0,71
Il10	<i>Interleukin 10</i>	1,32 ± 0,01*	5,56 ± 0,01*
Il12a	<i>Interleukin 12a</i>	5,94 ± 1,37*	3,34 ± 1,38
Il1a	<i>Interleukin 1 alpha</i>	3,77 ± 0,09*	1,49 ± 0,61
Il1b	<i>Interleukin 1 beta</i>	8,75 ± 0,69*	4,11 ± 1,1
Il1r1	<i>Interleukin 1 receptor, type I</i>	6,94 ± 1,7*	2,47 ± 2,69
Il2	<i>Interleukin 2</i>	5,93 ± 1,04*	5,02 ± 0,33*
Il6r	<i>Interleukin 6 receptor</i>	4,46 ± 1,31	2,11 ± 0,6
Irak1	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 1</i>	5,98 ± 1,19*	2,54 ± 0,6
Irak2	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 2</i>	7,97 ± 1,5*	2,31 ± 0,72
Irf1	<i>Interferon regulatory factor 1</i>	4,820 ± 0,95	2,5 ± 0,76
Irf3	<i>Interferon regulatory factor 3</i>	4,56 ± 0,42*	2,04 ± 0,44
Jun	<i>Jun proto-oncogene</i>	3,45 ± 0,74	2,36 ± 0,42

Kcnh8	Potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 8	5 ± 3,93	3,71 ± 1,79
Tbk1	TANK-binding kinase 1	4,2 ± 0,39*	2,6 ± 0,27*
Tlr7	Toll-like receptor 7	1,39 ± 0,16	2,12 ± 0,51
Lta	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)	4,09 ± 0,59	2,36 ± 1,07
Cd180	CD180 molecule	6,65 ± 0,46	6,330 ± 4,98
Ly96	Lymphocyte antigen 96	5,33 ± 0,77*	1,8 ± 0,46
Mal	Mal, T-cell differentiation protein	7,6 ± 0,44*	3,09 ± 1,11
Map2k3	Mitogen activated protein kinase kinase 3	4,64 ± 0,7*	2,07 ± 0,69
Map2k4	Mitogen activated protein kinase kinase 4	5,6 ± 1,31	2,84 ± 1,07
Map3k1	Mitogen activated protein kinase kinase kinase 1	5,02 ± 0,99	2,7 ± 0,73
Map3k7	Mitogen activated protein kinase kinase kinase 7	4,33 ± 1,05	2,81 ± 0,54
Map4k4	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4	4,43 ± 0,03*	2,74 ± 0,9
Mapk8	Mitogen-activated protein kinase 8	4,86 ± 0,26*	3,36 ± 1,95*
Mapk8ip3	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3	5,82 ± 1,74	2,13 ± 0,55
Mapk9	Mitogen-activated protein kinase 9	6,11 ± 0,94*	2,54 ± 0,89
Myd88	Myeloid differentiation primary response gene 88	5,68 ± 1,09*	2,68 ± 0,63
Nfkb1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	6,24 ± 2,29	2,95 ± 0,77
Nfkbia	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	4,69 ± 0,61*	2,63 ± 0,54
Nfkbiib	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta	4,96 ± 0,24	2,17 ± 1,14
Nfkbi1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 1	4,81 ± 0,76	2,33 ± 0,86
Nfrkb	Nuclear factor related to kappa B binding protein	5,31 ± 1,36	2,55 ± 0,76
Nr2c2	Nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2	5,36 ± 1,45	2,43 ± 0,72
Peli1	Pellino 1	5,52 ± 2,2	2,32 ± 0,25
Pglyrp1	Peptidoglycan recognition protein 1	3,97 ± 1,02	2,24 ± 0,52
Ppara	Peroxisome proliferator activated receptor alpha	4,39 ± 0,88	1,8 ± 0,52
Eif2ak2	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	5,07 ± 0,98	3,07 ± 0,97
Ptgs2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	3,87 ± 0,56*	1,94 ± 0,5
Rel	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian)	4,59 ± 0,94*	3,68 ± 0,17*
Rela	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	5,1 ± 1,04*	2,38 ± 0,75

Nfkb2	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2, p49/p100</i>	5,04 ± 0,81*	2,46 ± 0,66
Ripk2	<i>Receptor-interacting serine-threonine kinase 2</i>	5,1 ± 0,87*	2,7 ± 0,78
Rnf138	<i>Ring finger protein 138</i>	5,05 ± 1,71	2,49 ± 0,8
Sarm1	<i>Sterile alpha and TIR motif containing 1</i>	4,72 ± 1,59	1,92 ± 0,43
Ticam2	<i>Toll-like receptor adaptor molecule 2</i>	3,31 ± 0,76	2,07 ± 0,53
Tlr1	<i>Toll-like receptor 1</i>	5,43 ± 1,82	3,06 ± 0,18
Tlr2	<i>Toll-like receptor 2</i>	4,03 ± 1,43*	2,31 ± 1,24*
Tlr3	<i>Toll-like receptor 3</i>	4,91 ± 0,59*	2,26 ± 0,87
Tlr4	<i>Toll-like receptor 4</i>	5,03 ± 0,82*	2,42 ± 0,01
Tlr6	<i>Toll-like receptor 6</i>	3,94 ± 0,65	1,98 ± 0,62
Tlr9	<i>Toll-like receptor 9</i>	3,43 ± 0,58	2,33 ± 0,69
Tnf	<i>Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)</i>	2,71 ± 0,07*	1,72 ± 0,27
Tnfrsf1a	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a</i>	6,77 ± 1,56*	2,3 ± 0,79
Tnip2	<i>TNFAIP3 interacting protein 2</i>	5,08 ± 0,05	2,63 ± 1,56
Tollip	<i>Toll interacting protein</i>	5,37 ± 1,12	2,34 ± 1,02
Tradd	<i>TNFRSF1A-associated via death domain</i>	4,82 ± 1,03	2,09 ± 0,52
Traf6	<i>Tnf receptor-associated factor 6</i>	4,7 ± 1,07*	2,34 ± 0,56
Ube2n	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2N (UBC13 homolog, yeast)</i>	5,84 ± 0,78*	3,04 ± 0,68
Ube2v1	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1</i>	4,099 ± 0,75	1,27 ± 0,52

Material particulado aumenta imunorreatividade para microglia

Além dos pinealócitos, células secretoras de melatonina, astrócitos e a microglia compreendem uma população importante de células da pineal (Borregon et al., 1993). A microglia em particular sintetiza e secreta diferentes citocinas ou age mediando os efeitos de citocinas circulantes aos pinealócitos. Os macrófagos/ microglia da pineal são identificados por co-expressarem as moléculas ED-1/OX-1/OX42/IBA-1 (Jiang-Shieh et al., 2003). A resposta da microglia a fatores de injúria pode levar a modificação da morfologia das células bem como regular a expressão das moléculas de reconhecimento.

Para analisar se o material particulado causa ativação da microglia da pineal verificamos a marcação para proteína IBA-1 em cortes de pineais pela técnica de imunohistoquímica. Em animais expostos ao ar filtrado vemos uma marcação difusa do IBA-1 (1: 100) que reflete a distribuição regular das células microgliais entre os pinealócitos dentro do parênquima. A exposição ao material particulado aumenta a imunorreatividade para o IBA-1 no parênquima da pineal (figura 13). É possível reconhecer a ativação pelo aumento da marcação em vermelho (figura 13 A). Em azul são visualizados os núcleos de células da pineal com o marcador de DNA, DAPI. A fluorescência total por área foi analisada através do programa Image J e mostrou-se significativa nas pineais de ratos expostos ao material particulado por 2 horas (figura 13B).

A)

B)

Figura 13. **O material particulado induz a ativação da microglia da pineal.** **A)** Imagens representativas da imunohistoquímica em seções de pineais (20 µm) marcadas com IBA-1 (marcador de microglia, em vermelho) e DAPI (marcador nuclear, em azul). **B)** Quantificação da fluorescência absoluta para IBA-1 sobre a área em cortes de pineais de animais expostos ao ar filtrado ou ar poluído. * $p < 0.05$ vs ar filtrado. 3 glândulas por grupo (8 cortes/glândula). N = 2 experimentos diferentes. Barra = 20 µm. e 100 µm.

Dosagem de mediadores inflamatórios no plasma

Demonstramos que o ar poluído altera a função pineal causando a redução da produção noturna de melatonina e a redução da expressão da enzima chave da via biosintética. De acordo com o conceito do Eixo Imune-Pineal essa supressão ocorre de maneira transiente induzida por moléculas que sinalizam de injúria, como o próprio material particulado ou mediadores inflamatórios produzidos no início da resposta.

Para verificar se o ar poluído gera uma resposta inflamatória sistêmica analisamos a presença de diferentes citocinas plasmáticas através de ensaio Multiplex. Como já descrito anteriormente utilizamos neste estudo três grupos experimentais: **não expostos à câmara experimental (naïve)**, ratos transportados para a sala em que estão as câmaras experimentais; **controle**, ratos expostos à câmara contendo ar filtrado; **poluído**, ratos colocados em câmara para inalar material particulado concentrado do ar de São Paulo. Os animais foram expostos por 30 min, 1, 4 ou 6 horas de poluição e eutanasiados sempre no mesmo horário (ZT 18 – luz apagadas às 18h00).

As citocinas IL-12, GM-CSF e G-CSF não foram detectadas em nenhum dos grupos testados, enquanto MCP-1 e IL-2 estavam presentes nos controles e não foram alteradas pela exposição à poluição (figura 14).

Um segundo grupo de citocinas formado por IL-1 α , IFN- γ e IL-4 apresentou um aumento significativo em animais expostos à poluição por 30 minutos, que deixa de ser observado quando os animais são mantidos nas câmaras de poluição por 1, 4 ou 6 horas (fig. 14). Os dados obtidos para IL-1 α e IFN- γ em animais submetidos à poluição por 1, 4 e 6 horas mostram uma tendência de redução abaixo do basal. No entanto estes dados não apresentaram diferença significantes com o basal quer por ANOVA (considerando todos os grupos), ou apenas os grupos naïve e controle, o que fortemente indica que a concentração plasmática destas citocinas retorna aos níveis basais mesmo na presença do agente estressor.

Um segundo padrão de resposta foi observado para IL-6 e TNF. No caso de TNF estamos mencionando apenas tendências, mas no caso de IL-6 foi detectado um aumento que atingiu um pico após 1 hora de exposição ao ar poluído. Houve um retorno para níveis basais após 4 horas e com 6 horas de poluição a concentração plasmática de IL-6 voltou a ser significativamente maior que o observado nos animais controle. Como estes dados foram obtidos a partir de 4 a 8 animais testados em dois dias diferentes, teremos que fazer mais uma exposição para completar o estudo estatístico.

Os resultados com IL-1 β e IL-10 também apresentam um perfil comum ao longo do tempo de exposição. O pico destas citocinas ocorre após 4 horas de exposição. Em todos os demais tempos avaliados não há diferença significativa com os animais controle.

Figura 14. **O material particulado induz a ativação de resposta inflamatória sistêmica.** Concentração plasmática de citocinas em ratos expostos por 30 min, 1h, 4h e 6h (barras azuis) ou não à poluição, grupo naíve (barra branca) e controle (ar filtrado, barra cinza). Níveis de IL-1 β , IL-1 α , INF, IL-6, IL-10, IL-4, TNF, e IL-12p70 (pg/mL). * $p < 0.05$ vs. controle e naíve testado por ANOVA seguido de Newman-Keuls. Os dados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. N = 4-8 animais.

Estudos da função pineal “*in vitro*”

Considerando que material particulado induz uma resposta inflamatória e que a via de sinalização principal desta resposta é a ativação de NF- κ B, fator de transcrição que regula a expressão da enzima AA-NAT, estes experimentos visam avaliar se material particulado tem um efeito direto sobre a glândula pineal.

Nossa primeira pergunta foi verificar se DEP induz a translocação nuclear de NF- κ B. Pineais de ratos mantidas em cultura por 48 horas foram estimuladas com DEP (32 μ g/ml) por tempos variáveis (5 a 60 minutos). Seguindo os padrões de EMSA do laboratório observamos dois complexos proteicos (C1 e C2) nos extratos nucleares que interagiram com a sonda de nucleotídeos para NF- κ B (Cecon et al., 2010).

Na figura 15 mostramos que DEP induz um aumento significativo da translocação nuclear dos dois complexos formados, C1 e C2, em 5 minutos de estimulação com o DEP (figura 15, A). Esse efeito é transiente, observamos uma redução em 10 minutos seguidos de um novo pico em 15 minutos e assim também observamos para 30 e 60 minutos (figura 15).

Figura 15. **Decurso temporal da translocação do NF-κB induzida pelo DEP em glândulas pineais em cultura.** **A)** Imagem representativa do EMSA mostrando o acúmulo nuclear do NF-κB em pineais estimuladas com DEP 128 µg/mL (5, 10, 15, 30 e 60 minutos). **B)** Quantificação densitométrica do NF-κB de pineais tratadas com DEP. Os valores são apresentados como média ± e.p.m de 6-9 glândulas por ponto. N= 2 experimentos independentes.

A análise das subunidades de NF-κB presentes em pineais de ratos expostos ao ar poluído revela que existe a translocação de dois dímeros, p50/p50, que possui efeito inibitório sobre a transcrição da enzima chave da produção de melatonina, AA-NAT, e o dímero p50/RelA, que é ativador de transcrição. Sabemos que a síntese da citocina pró-inflamatória TNF é induzida pela ativação do NF-κB na pineal (Da Silveira-Cruz Machado et al., 2012) e tem efeito inibitório sobre a via biosintética da melatonina (Fernandes et al., 2006). Sendo assim investigamos se:

- 1- a ativação do NF- κ B pelo DEP induz a síntese de TNF pela pineal
- 2- o material particulado do diesel inibe diretamente a síntese de melatonina induzida por noradrenalina *in vitro*
- 3- a produção de TNF é essencial para inibição da produção de melatonina *in vitro*
- 4- o efeito do diesel é mediado pelo receptor TLR4

DEP reduz a síntese de melatonina induzida por noradrenalina
através da sinalização da citocina TNF

Para avaliar se glândulas pineais de rato em cultura produzem a citocina TNF após incubação com DEP utilizamos a técnica imunoenzimática ELISA, por meio de conjunto diagnóstico comercial (Rat TNF ELISA KIT, eBioscience, San Diego, EUA). O conteúdo da citocina foi dosado no meio de cultura em que as glândulas foram mantidas. Nestes experimentos, glândulas pineais de rato em cultura por 48 horas foram estimuladas com DEP (32 μ g/mL) por tempos crescentes de 1 a 4 horas (figura 16). DEP (32 e 128 μ g/mL) induz aumento da concentração de TNF de maneira dependente de tempo, sendo a produção máxima observada após 60 minutos de incubação.

Para avaliar o efeito do TNF sobre a produção de melatonina glândulas cultivadas por 48 horas foram pré-incubadas (1h) com um inibidor do receptor de TNF do subtipo TNFR1 (SPD-304, 5 e 50 μ M) antes de serem estimuladas por 5 horas com noradrenalina 10 nM. O inibidor de TNFR1 foi mantido no meio durante toda a estimulação

com noradrenalina. DEP bloqueia de forma significativa a produção de melatonina induzida por noradrenalina, e a incubação com inibidor SDP-304 reverte este efeito (50 Mm, figura 17A). A relevância da sinalização TLR4 no efeito inibitório do DEP sobre a síntese de melatonina foi avaliado utilizando-se um antagonista do receptor TLR4, TAK-242. A incubação apenas com inibidor não altera o conteúdo de melatonina no meio. O DEP induz a diminuição da síntese de melatonina, mas o bloqueio do receptor TLR4 é capaz de prevenir essa inibição (figura 17 B). Dessa forma observamos que o material particulado regula negativamente a síntese de melatonina em pineais em cultura. Este efeito mostrou ser dependente da produção de TNF pela pineal via sinalização TLR4 (figura 17 C).

Figura 16. **DEP induz a síntese de TNF em cultura de glândula pineal.** Decurso temporal da produção de TNF (ng/mL) induzida pelo DEP (32 e 128 µg/mL, 1-4 horas). * $p < 0.05$ vs tempo 0. N= 4-12 glândulas

Figura 17. **Efeito do particulado do diesel sobre a síntese de melatonina induzida por noradrenalina.** Glândulas pineais foram cultivadas (48h) e estimuladas nas últimas 5 horas com noradrenalina NOR (10 nM, 5 h, 37°C; 95% O₂, 5% CO₂). **A)** Efeito do inibidor do receptor de TNF sobre a produção de melatonina. As pineais foram incubadas ou não com inibidor do receptor TNFR1 SPD-304 (5 ou 50 μM) e foram estimuladas ou não com material particulado do diesel e então estimuladas com noradrenalina (Os valores são apresentados como média ± e.p.m de 3-12 glândulas por ponto. * $p < 0.05$ vs NOR # $p < 0.05$ vs NOR+DEP. **B)** Efeito do inibidor do receptor TLR4 sobre a produção de melatonina induzida por noradrenalina. Glândulas pineais expostas ou não ao inibidor do receptor TLR4 TAK 242 (1 ou 10 μM) foram estimuladas ou não com material particulado do diesel e então estimuladas com noradrenalina. **C)** Representação esquemática do efeito do DEP sobre a produção de melatonina. A interação com receptor TLR4 é essencial para indução de TNF que por sua vez é o mediador que inibe diretamente a síntese de melatonina. Os valores são apresentados como média ± e.p.m de 3-6 glândulas por ponto. * $p < 0.05$ vs NOR # $p < 0.05$ vs NOR+DEP.

Produção de melatonina por células imunocompetentes

Expressão dos receptores MT1 e MT2

Dados do grupo demonstram que a linhagem de macrófagos RAW 264.7 produz melatonina quando exposta ao LPS ou Zymosan (Muxel et al., 2012, Pires-Lapa et al., 2013). Os efeitos diretos observados da melatonina sobre a capacidade dessas células em fagocitar partículas de zymosan do meio é dependente da ligação com receptor MT2. Ao mesmo tempo a literatura descreve uma expressão ampla dos receptores de melatonina em órgãos linfoides e células da imunidade inata e adquirida. Neste trabalho avaliamos a expressão dos receptores MT1 e MT2 em macrófagos não estimulados. A expressão dos receptores de melatonina MT1 e MT2 foi verificada por imunocitoquímica e a especificidade de cada anticorpo foi testada através de incubação com peptídeo bloqueador para cada receptor. Observamos que as células RAW 264.7 têm imunorreatividade positiva para os dois receptores MT1 e MT2 (figura 18). Quando as células são pré-incubadas com o peptídeo a fluorescência para os receptores não é detectada, revelando a especificidade dos anticorpos primários.

Figura 18. **Expressão dos receptores de melatonina MT1 e MT2 em macrófagos RAW 264.7.** Imagens representativas da imunocitoquímica mostrando a expressão dos receptores MT1 e MT2 (em verde) em macrófagos cultivados. À direita é mostrado a imunorreatividade negativa para os receptores quando as células são pré-incubadas com os peptídeos bloqueadores específicos. Em azul são representados os núcleos (DAPI). Escala 7,5 µm.

Efeito do DEP sobre a viabilidade celular

O estresse oxidativo é gerado quando existe um desbalanço entre a produção de ROS (do inglês, *reactive oxygen species*) e a disponibilidade de mecanismos de defesa antioxidante (Mates et al., 2008). A indução de estresse oxidativo é um processo característico da exposição ao material particulado e considerado o principal mecanismo responsável pela citotoxicidade induzida pelas partículas de

diesel. O DEP gera um excesso de espécies de radicais livres que tem alta reatividade química levando a peroxidação lipídica, oxidação massiva de proteínas e degradação. Consequentemente essas partículas tem alto potencial de levar a morte celular assim como induzir a carcinogênese.

Nossa primeira pergunta foi verificar o potencial tóxico do material particulado do diesel. Determinamos a viabilidade celular através da atividade mitocondrial pelo ensaio colorimétrico do MTT. A redução desta atividade indica morte celular, enquanto o seu aumento sugere proliferação. As células incubadas com DEP (1 – 512 $\mu\text{g/ml}$) por 6 a 24 horas apresentaram uma redução da atividade da succinato desidrogenase a partir de 12 horas de incubação apenas com a maior concentração 512 $\mu\text{g/ml}$ de DEP (figura 19). Em tempos menores não houve alteração para nenhuma das concentrações testadas. No tempo de 12 horas a redução da atividade da succinato desidrogenase foi dependente da concentração, enquanto em tempos maiores, concentrações menores já levavam ao efeito máximo.

Figura 19. **Teste de Viabilidade Celular (MTT)**. Células RAW 264.7 foram incubadas em diferentes concentrações de DEP (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 OU 512 µg/mL) por diferentes períodos de tempo, 6 horas (círculo azul), 12 horas (quadrado laranja) e 24 horas (triângulo vermelho). Os dados estão expressos como a média ± e.p.m (controle = 100%). *p < 0.05 vs. controle. N=4 experimentos independentes.

Efeito do material particulado do diesel sobre o promotor e primeiro intron do gene da AA-NAT

Para avaliar o efeito do DEP sobre a ativação do promotor do gene que codifica a enzima AA-NAT verificamos a expressão da proteína fluorescente DsRed2 em células RAW 264.7 transfectadas com pDsRed2-1-aa-nat-kB2. Nestas células existem dois sítios de ligação *kappa* B.(figura 20 A). Os macrófagos foram estimulados com DEP (32 a 128 µg/mL) por 10 minutos. Os controles foram obtidos adicionando-se apenas veículo. O material particulado do diesel induz um aumento significativo (p<0,001) da intensidade de fluorescência absoluta da proteína repórter DsRed2 na concentração de 128 µg/mL

(figura 20 B). Para confirmar se a indução da expressão da proteína DsRed2 é mediada pelo fator NF- κ B, as células foram pré-incubadas com PDTC (25 μ M, 30 min), que bloqueia a ativação do NF- κ B (Xia et al., 1998) (figura 20, C) O bloqueio da via NF- κ B inibe completamente o efeito indutor do DEP sobre a ativação do promotor do gene *Aa-nat* (figura 20, D).

Figura 20 Ativação do promotor do gene da *Aa-nat* mediada por elementos κ B. **A)** Imagens representativas obtidas por microscopia confocal das células RAW 264.7 transfetadas com pDsRed2-1-aa-nat-kB-2. A fluorescência vermelha indica a expressão da proteína repórter. **B)** Quantificação da intensidade de fluorescência da proteína repórter das células RAW 264.7 transfetadas com pDsRed2-1-aa-nat-kB-2 estimuladas com DEP 0, 32, 64, 128 μ g/mL. **C)** A indução da expressão da proteína repórter é inibida por PDTC (25 μ M, 30 min). Os dados estão expressos como média $\pm$ e.p.m; DEP 128 μ g/mL. N= 3 experimentos independentes

DEP induz a translocação nuclear do NF- κ B em macrófagos de linhagem

Para avaliar o efeito do material particulado sobre a ativação do NF- κ B em macrófagos utilizamos o ensaio de eletromobilidade em gel (EMSA). Este ensaio revela quanto do NF- κ B é translocado para o núcleo das células. Utilizamos a concentração de 128 μ g/mL de DEP e testamos diferentes tempos de estimulação (5, 10, 15, 30 e 60 minutos). Após o tratamento, extraímos apenas o conteúdo nuclear de proteínas e incubamos com oligonucleotídeo para NF- κ B marcado com 32 P. Observamos a formação de dois complexos, que denominamos C1 e C2 (figura 21, A). A quantificação densitométrica realizada através do programa Image J demonstra que o material particulado do DEP promove um aumento rápido na translocação nuclear do complexo 1 do NF- κ B. Este aumento é detectado em 5 minutos e decai já em 10 minutos, permanecendo mais baixo que os valores basais. (figura 21, B). Para o complexo 2 não observamos diferenças entre os tempos analisados.

Figura 21. **Decurso temporal da translocação do NF-κB induzida pelo DEP em células RAW 264.7.** A) Imagem representativa do EMSA mostrando o acúmulo nuclear do NF-κB em células RAW 264.7 estimuladas com DEP 128 µg/mL (5, 10, 15, 30 ou 60 minutos). B) Quantificação densitométrica do NF-κB de células RAW 264.7 tratadas com DEP. Os valores são apresentados como média ± e.p.m. N= 3 experimentos independentes.

DEP induz a expressão da enzima AA-NAT em macrófagos da linhagem RAW 264.7 e a produção de melatonina de maneira dependente da concentração

Para avaliar a expressão da enzima AA-NAT os macrófagos foram cultivados em placas próprias para análise microscópica e estimulados ou não com DEP na concentração de 128 µg/mL (1- 6 horas). A expressão de AA-NAT na forma nativa e fosforilada nas células RAW 264.7 (2×10^5) foi avaliada por imunocitoquímica e sua análise feita por microscopia Confocal. Para a marcação da AA-NAT foi utilizado anticorpo primário específico seguido do secundário fluorescente (em verde, FITC) e a quantificação da fluorescência foi

realizada pelo programa Image J. Observamos que o DEP induz um aumento da imunorreatividade para AA-NAT em cerca de 10 vezes após 1 hora (figura 22) de estimulação e da forma fosforilada (figura 23) em cerca de 4 vezes após 30 minutos. Para forma total este já foi o efeito máximo registrado, podendo o pico ocorrer em tempos inferiores, o decaimento da resposta já se inicia a partir de 1 hora. A fosforilação da AANAT se inicia e termina de forma mais rápida (figura 23).

Figura 23. **Expressão de AA-NAT fosforilada induzida pelo DEP em macrófagos alveolares.** **A)** Imagens representativas de imunofluorescência para AA-NAT (marcação verde) em macrófagos estimulados ou não com DEP (128 $\mu\text{g/mL}$, 10-90 min). Em vermelho a marcação para o núcleo com iodeto de propídio. **B)** Quantificação da fluorescência relativa da imunorreatividade para AA-NAT em células estimuladas ou não com DEP * $p < 0.05$ vs controle. N= 2 experimentos independentes.

Os macrófagos estimulados com DEP produzem melatonina. Nestes experimentos utilizamos um número maior de células em cada poço para permitir a quantificação da indolamina. Diferentes concentrações de DEP (16 – 512 $\mu\text{g/mL}$) foram incubadas por 6 horas em poços contendo 2×10^6 células e o conteúdo de melatonina no meio de cultura foi determinado por ensaio de ELISA. A estimulação dos macrófagos promove aumento de melatonina de maneira dependente da concentração (figura 23C). Os dados foram ajustados

segundo uma curva sigmóide com inclinação variável, utilizando o programa GraphPad® 5.0. O coeficiente de Hill foi de 5,15 e a EC50 foi de 85,16 µg/ml, com limites de confiança variando entre 43,56 e 166,70.

DEP induz a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em macrófagos da linhagem RAW 264.7

A ativação do NF-κB induz a transcrição de diversos genes, particularmente aqueles envolvidos com a resposta imune inata e inflamatória. Vários mediadores da resposta inflamatória, como citocinas, moléculas de adesão, a enzima iNOS, a ciclooxigenase 2 (COX2), e a própria proteína inibitória IκB produzida como um mecanismo regulador da resposta, são regulados pelo fator NF-κB (Wan & Lenardo, 2010). A iNOS é a isoforma de sintase de NO que depende de transcrição induzida por moléculas pró- inflamatórias clássicas, como o LPS e a citocina TNF. Neste trabalho, avaliamos a expressão de iNOS como outra referência a um marcador (*output*) clássico da ativação de NF-κB na resposta inflamatória. As células foram cultivadas em placas específicas para visualização microscópica e incubadas com veículo ou DEP (128 µg/mL) por 1, 2, 3, 4 ou 6 horas. A quantificação da fluorescência realizada através do programa Image J mostra um aumento significativo transiente ($p < 0.001$) da fluorescência para iNOS após 1 e 2 horas de estimulação com DEP, cujos valores retornam aos níveis do controle após 3 horas de estimulação (figura 24).

O material particulado pode sinalizar através de receptores que reconhecem PAMPs. Os trabalhos apontam a participação dos receptores TLR4 e TLR2 no reconhecimento dessas partículas. Testamos se o efeito estimulatório do DEP sobre a expressão da iNOS é dependente da ativação desse receptor. Para isso pré-incubamos as células com inibidor do receptor TLR4 (TAK-242, 1h). Observamos o efeito inibitório do TAK 242do sobre a imunorreatividade para iNOS induzida pelo material particulado do diesel (128 $\mu\text{g/mL}$, 1h) (figura 24, C).

Figura 24. **Expressão de iNOS induzida por DEP em células RAW 264.7.**

A) Imagens representativas de imunocitoquímica mostrando a marcação para iNOS (em vermelho) em macrófagos estimulados ou não com DEP (128 $\mu\text{g/mL}$, 1h). Em azul, são representados os núcleos marcados com DAPI. **B)** Quantificação da intensidade de fluorescência para iNOS em macrófagos incubados com DEP (128 $\mu\text{g/mL}$, 1-6 horas). **C)** Quantificação da intensidade de fluorescência para iNOS em macrófagos pré-incubados com inibidor do receptor TLR4 (TAK 242, 1h) e estimulados com DEP (128 $\mu\text{g/mL}$, 1h) Os dados estão apresentados como porcentagem normalizada em relação ao grupo controle (100%). * $p < 0.001$ vs. PBS. N= 3 experimentos independentes. Barra = 20 μm .

Efeito da melatonina sobre a viabilidade celular de macrófagos

Observamos que os macrófagos incubados por 24 tem redução significativa da atividade mitocondrial. Como o aumento intracelular de ROS é o principal fator dos efeitos deletérios do DEP avaliamos se a melatonina é capaz de reverter os danos da exposição ao diesel. As células RAW 264.7 foram pré-incubadas ou não com melatonina (0,1 a 100 nM) e cultivadas por 24 horas na presença de DEP (2-512 $\mu\text{g/mL}$). Como observamos anteriormente, a estimulação com DEP reduz a viabilidade celular de maneira dependente da concentração de particulado. Quando as células são tratadas com a melatonina há redução da perda de viabilidade induzida pelo DEP de maneira concentração dependente (figura 25).

Figura 25. **Efeito da melatonina sobre a viabilidade de macrófagos expostos ao DEP (MTT).** Células RAW 264.7 foram incubadas em diferentes concentrações de DEP (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 e 512 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas e a viabilidade avaliada pelo ensaio colorimétrico de MTT. Os dados estão expressos como a média $\pm$ e.p.m (controle = 100%). N=3.

A melatonina é descrita na literatura como agente citoprotetor e pró -sobrevivência por mecanismos dependentes ou não de receptores de membrana. Vimos que a incubação com a melatonina diretamente aumenta a sobrevivência de células expostas ao DEP (figura 25). A partir desse resultado, nosso interesse foi avaliar a relevância da produção de melatonina endógena na resposta ao material particulado do diesel. Para isso pré-tratamos as células com o antagonista dos receptores de melatonina e o bloqueador de NF- κ B antes da estimulação com DEP. O luzindol é um antagonista dos receptores de melatonina com afinidade 25 vezes maior para o subtipo MT2 do que o receptor MT1 (Dubocovich et al., 1998). O bloqueador PDTC age reduzindo a migração dos dímeros de NF- κ B ao núcleo. Como a produção de melatonina induzida pelo DEP assim como agentes infecciosos como LPS e dependente da ativação do NF- κ B testamos no trabalho como o bloqueio desta via afeta a sobrevivência dos macrófagos. Testamos o efeito do luzindole como do bloqueio do NF- κ B sobre o ensaio de viabilidade do MTT (Figura 26) e através da quantificação de marcadores específicos por citometria de fluxo, o iodeto de propídio e Anexina que são indicadores de morte celular (figura 27).

Figura 26. **Efeito do antagonista dos receptores MT1 e MT2 e bloqueador do NF- κ B sobre a viabilidade (MTT) de macrófagos expostos ao DEP.** Células RAW 264.7 foram incubadas em diferentes concentrações de DEP (128, 256 e 512 μ g/mL) por diferentes 24 horas. **A)** Os macrófagos foram incubados 1 hora antes do DEP com antagonista para MT1/MT2 (0,01 – 10 μ M, Luzindole). **B)** As células foram pré-incubadas (30 min) com inibidor da via NF- κ B PDTC (25 μ M). * p < 0.05 vs. controle (PBS) # p < 0.05 vs DEP. Os dados estão expressos como a média $\pm$ e.p.m (controle = 100%). N=2 experimentos independentes.

Observamos que o bloqueio dos receptores de melatonina reduz a viabilidade de forma dependente da concentração de Luzindole e de material particulado ao que células são expostas (Figura, 26A). Quanto maior a quantidade de partículas mais pronunciado é o efeito do antagonista sobre a viabilidade celular. O efeito concentração resposta do Luzindole é consistente quando utilizamos a maior concentração do DEP (512 μ g/mL). Nessa concentração de DEP o bloqueio da sinalização de melatonina com a menor concentração de luzindole é capaz de reduzir cerca de 50% a viabilidade celular chegando a menos de 20% com a maior concentração (10^{-5} M).

Quando analisamos o efeito do bloqueio do NF- κ B verificamos o mesmo perfil de resposta. PDTC (25 μ M, 30 min) sozinho não altera a

viabilidade, mas quando as células são estimuladas com DEP observamos uma redução significativa para as três concentrações testadas (de 100% para, 47 %, 128 µg/mL, 22 %, 256 µg/mL, 19 %, 512 µg/mL).

Os marcadores Anexina V e iodeto de propídio foram combinados para distinguir padrões diferentes de morte celular. A marcação com Anexina V é destinada à detecção de apoptose porque detecta a quantidade de fosfatidilserina (PS) exposta na superfície da membrana no início da apoptose (Cornelissen et al., 2002). O iodeto de propídio (PI) é um marcador nuclear utilizado para distinguir células apoptóticas de células necróticas. O PI é uma molécula que se intercala com DNA, desde que a membrana celular esteja permeável (Fried et al., 1976). Em células intactas o PI não é passível de penetrar devido ao alto peso molecular, mas quando há perda de viabilidade nos estágios finais de apoptose ou provavelmente necrose há alteração da permeabilidade e o PI é capaz de entrar marcando então as células não viáveis. Portanto a combinação dos dois marcadores pode indicar células viáveis (Anexina -/PI -), células no início do apoptose (Anexina +) e células necróticas ou tardiamente apoptóticas (Anexina +/PI +) (Rieger et al., 2011).

Figura 27. **Caracterização da morte celular induzida pelo material particulado do diesel: Efeito do antagonista de MT1 e MT2 e do bloqueador do NF- κ B sobre a viabilidade de macrófagos expostos ao DEP.** Células RAW 264.7 foram incubadas com DEP (128 μ g/mL) por 24 horas e estimulados ou não com antagonista para os receptores MT1 e MT2 (1 μ M, luzindole, 1h) ou pré-incubadas (30 min) com o inibidor da via NF- κ B PDTC (25 μ M). As células foram incubadas com dois marcadores: ANEXINA V-FITC e iodeto de propídio-PE. **A)** Gráfico de pontos mostrando as populações de células marcadas para PI e Anexina V. **B)** Imagem representativa das fotografias de células detectadas pelo citômetro positivas para PI. **C)** Quantificação da % de células necróticas nos diferentes tratamentos. *p < 0.05 vs. controle # p < 0.05 vs DEP. Os dados estão expressos como a média $\pm$ e.p.m N=2 experimentos independentes.

Observamos que sem nenhuma estimulação maior parte da população de células é viável (24 horas de cultura, ou seja, negativas para PI e Anexina). A incubação com DEP (128 μ g/mL) induz ao aumento do número de células positivas para PI (25,5 %). Como vimos para o ensaio de atividade mitocondrial (MTT) a incubação prévia com luzindole (1 μ M, 1h) ou PDTC (25 μ M, 30 min) reduz drasticamente a

viabilidade, aumentando o número de células necróticas, 48,37 % e 92, 83%, respectivamente (figura 27).

Estudo com macrófagos pulmonares

Os experimentos conduzidos com a linhagem RAW 264.7 levantaram dados consistentes de que o material particulado do diesel induz a transcrição da enzima AA-NAT através da ativação do fator NF- κ B. A expressão dessa enzima resulta na síntese de melatonina de forma dependente da concentração de DEP. Nossa pergunta foi entender se o mesmo mecanismo existe em macrófagos primários, e, determinar se essas células pulmonares, que interagem diretamente com o material particulado do ar, produzem melatonina e o efeito dessa indolamina sobre a função fagocitária. Primeiramente confirmamos que o DEP induz a ativação do fator NF- κ B. Os macrófagos foram obtidos por lavado broncoalveolar e cultivados em placas específicas para visualização microscópica (1×10^5 células/poço). As células foram marcadas com anticorpo primário para subunidade Rel A (diluição, 1:200) seguido do secundário (FITC; 1:200). O núcleo foi marcado com iodeto de propídio, e a sobreposição das marcações indica localização nuclear. Os efeitos do DEP (128 μ g/mL) foram observados aos 5, 15, 30, 45 e 60 minutos.

DEP induziu um aumento transiente da translocação nuclear de Rel A. Aos 5 minutos não foi observada diferença em relação ao tempo zero. O pico de marcação sobreposta RelA/núcleo foi aos 15

minutos (figura 28). Aos 60 minutos observamos uma marcação majoritariamente citoplasmática.

Figura 28. **Efeito do DEP sobre a marcação da proteína Rel A.** Imagens representativas obtidas por microscopia da imunofluorescência para proteína Rel A (em verde) em macrófagos estimulados ou não com DEP (128 µg/mL, 5-60 minutos). Em vermelho verifica-se a marcação para o núcleo com iodeto de propídio. Barra = 20 µm.

Determinamos a expressão de AA-NAT por imunocitoquímica e a produção de melatonina pela incubação de macrófagos alveolares obtidos a partir de ratos normais incubados ou não com material particulado do diesel. Realizamos culturas primárias dessas células (1×10^6 células/poço) através de lavado broncoalveolar e testamos diferentes concentrações de DEP (32 – 512 µg/ml). A Figura 29A mostra que macrófagos incubados com PBS expressam baixo

conteúdo de fluorescência. No entanto, como essas culturas apresentam uma quantidade detectável de melatonina, tomamos a fluorescência observada na PBS, como o nível basal. DEP induziu aumento na expressão de AA-NAT (figura 29 A, B) e um aumento na síntese de melatonina de maneira dependente da concentração (Fig. 29, C). Os dados foram ajustados segundo uma curva sigmóide com inclinação variável, utilizando o programa GraphPad® 5. O determinando um valor de EC50 de 138,8, com limites de confiança ($p < 0.05$) variando entre 71,7 e 268,3 $\mu\text{g/ml}$. Portanto, concluiu-se que a DEP, tal como foi previamente observado com LPS, leva à síntese de melatonina por macrófagos periféricos.

Figura 29. **Expressão de AA-NAT e a produção de melatonina induzida pelo DEP em macrófagos alveolares.** **A)** Imagens representativas de imunofluorescência para AA-NAT (marcação verde) em macrófagos estimulados ou não com DEP (128 µg/mL, 5-240 min). Em vermelho verifica-se a marcação para o núcleo com iodeto de propídio (PI). **B)** Quantificação da fluorescência relativa da imunorreatividade para AA-NAT em células estimuladas ou não com DEP (128 µg/mL, 5-240 min). **C)** Curva concentração resposta (32-512 µg/mL, 6 h) do material particulado sobre a produção de melatonina em cultura de macrófagos alveolares (1×10^6 /poço). $p < 0.01$ vs. PBS (barra cinza). N= 4 experimentos independentes. Barra= 20 µm.

Dosagem de mediadores inflamatórios em cultura de células pulmonares

Analizamos a concentração das citocinas G-CSF, GM-CSF, IL-1a, IL-1b, IL-4, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IFN-γ, MCP-1 e TNF no mesmo meio usado para dosagem de melatonina das células incubadas com material particulado (DEP, 32-512 µg/mL, 6 h). Todas as citocinas analisadas foram detectadas pelo ensaio multiplex (Milliplex, Millipore) tanto em macrófagos estimulados ou não com diesel. Interessante

observar que o DEP ao invés de gerar uma resposta de aumento da produção de citocinas ele ainda reduz o conteúdo basal desses mediadores no meio. Observamos uma redução significativa do conteúdo de TNF, MCP-1, IL-1b, IL-1a e IL-6 de maneira dependente da concentração de DEP de cultura (figura 30).

Figura 30. **Efeito do material do material particulado do diesel sobre a produção de citocinas pelo macrófago alveolar.** Macrófagos alveolares foram cultivados por 18h então estimulados ou não com diesel (DEP, 32-512 µg/mL, 6 h). A concentração das citocinas G-CSF, GM-CSF, IL-1a, IL-1b, IL-4, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IFN-γ, MCP-1 e TNF foi quantificada por ensaio multiplex (RECYTOMAG, Millipore). N= 3 experimentos diferentes.

Efeito da melatonina sobre a fagocitose de macrófagos alveolares

Os macrófagos alveolares são descritos como fagócitos primários do sistema imune inato e tem a função de proteger os espaços de trocas gasosas de alérgenos, agentes infecciosos e partículas que escapam de mecanismos de defesa do trato

respiratório. Através da **fagocitose** os macrófagos conseguem eliminar os potenciais agentes que chegam aos pulmões diariamente.

Macrófagos de colostro estimulados com zimosan (Pires-Lapa et al., 2013), macrófagos testiculares (Pawak et al., 2005) e peritoniais (Kanchev et al., 2006) têm sua capacidade fagocítica aumentada quando estimulados com melatonina. Investigamos se a melatonina pode contribuir para a remoção das partículas de diesel pelos macrófagos alveolares aumentando a quantidade de partículas internalizadas. Os macrófagos alveolares fagocitam o DEP (128 ug /mL) aumentando as partículas em seu interior ao longo do tempo de incubação. Quando pré-incubados com melatonina os macrófagos fagocitam mais partículas do DEP do que macrófagos submetidos apenas ao veículo ao longo do tempo (figura 31 C).

Figura 31. **A melatonina aumenta a fagocitose do DEP em macrófagos alveolares.** **A)** Imagens representativas obtidas por microscopia confocal indicando macrófagos alveolares com partículas de DEP (128 $\mu\text{g/mL}$) internalizadas (0-360 minutos). A melatonina (1 nM) foi incubada 30 minutos antes da estimulação com DEP (128 $\mu\text{g/mL}$, 15-360 minutos). **B)** Imagens representativas obtidas por microscopia confocal indicando o efeito potenciador da melatonina sobre a fagocitose. **C)** Quantificação de partículas de DEP fagocitadas pelos macrófagos ao longo do tempo (15-360 minutos) feita com a ferramenta de threshold do programa Image J. * $p < 0.01$ vs. grupo veículo. N= 3 experimentos independentes.

Discussão

V. Discussão

Os resultados deste trabalho permitiram demonstrar que o material particulado do ar é percebido pela glândula pineal como um sinal inflamatório, levando a redução da síntese do hormônio do escuro, a melatonina, corroborando a hipótese do **Eixo Imune-Pineal**. Em outras palavras, aqui levantamos um possível mecanismo para a compreensão de como a poluição atmosférica pode interferir na organização temporal do organismo. Por outro lado, é bem descrito na literatura que a melatonina possui diferentes ações além de seu papel regulador dos ritmos circadianos. Nesse contexto, a melatonina assume diferentes ações biológicas e é produzida por células e tecidos periféricos regulando a sua atividade. **Macrófagos alveolares**, as principais células de defesa pulmonar produzem melatonina em resposta à exposição ao material particulado do diesel. A melatonina age potencializando a fagocitose, reduzindo os danos celulares gerados pelo diesel e regulando a produção de citocinas. De forma geral, entendemos que a poluição do ar gera uma resposta imune inata capaz de alterar a função pineal e promover a síntese de melatonina por células de defesa. Portanto, o material particulado pode ser considerado um fator ambiental capaz de ativar o Eixo Imune-Pineal.

A poluição do ar é o principal fator ambiental inflamatório capaz de ativar vias inflamatórias localmente, nos pulmões, ou de forma sistêmica (Brook et al., 2008, Mills et al., 2009). Em diversos modelos de exposição ao MP, quer seja por instilação nasal ou traqueal ou por

inalação, as partículas de poluição induzem a produção de mediadores pró-inflamatórios em leucócitos de lavado brônquio-alveolar e em células epiteliais das vias respiratórias (Li et al., 1996, 2002; Becker et al., 2003; Fujii et al., 2001) o que também é mimetizado em linhagens de células imunocompetentes (Osornio-Vargas et al., 2003). No modelo adotado neste estudo, a exposição por inalação do material particulado também induz a produção de citocinas no plasma decorrente de uma resposta inflamatória. Os estudos com material particulado, que consideram as respostas agudas de exposição, obtidos após 2 horas (Van Berlo et al., 2010), 6 ou 20 horas (Levesque et al., 2011), em 24 horas (Nemmar et al., 2009), 15 dias (Campbell et al., 2005), 4 semanas (Gerlofs-Nijland et al., 2010) e em 5 semanas de episódio agudo de poluição (van Eeden et al., 2001) revelam a ativação do NF- κ B, indução de citocinas pró-inflamatórias no plasma, tais como TNF, IL-6, IL-1 β , GM-CSF, a expressão da iNOS e COX2 e ativação da microglia. Além disso, pequenas frações de nanopartículas inaladas são capazes de atingir o cérebro (van Eeden et al., 2006; Oberdorster et al., 2004).

A resposta imunológica inata se inicia com a detecção de patógenos ou potenciais moléculas de injúria através de receptores de reconhecimento especializados em células de defesa e também vários tipos celulares. Hoje são identificados 10 membros da família TLR (TLR1-TLR10) que tem papel essencial na resposta a PAMPs e DAMPs (Hayden & Gosh, 2004). Os TLRs ativam a fase efetora da resposta imune inata principalmente via fator de transcrição NF- κ B. Em

relação ao mecanismo de reconhecimento do MP, vários estudos demonstram que o particulado sinaliza através de receptores utilizados por padrões moleculares associados a patógenos e a dano particularmente o receptor TLR4 e TLR2, (Soukup et al., 2001, Becker et al., 2002, Hollingsworth et al., 2004, Williams et al., Becker et al., 2005, Shoenfelt et al., 2009, Kampfrath et al., 2011, Zhao et al., 2012, Lucas & Maes, 2013).

A glândula pineal de rato expressa constitutivamente moléculas de reconhecimento de injúria, incluindo receptores de citocinas, de glicocorticoides e, **PAMPs** e **DAMPs**. Pinealócitos, astrócitos e células microgliais expressam o receptor para citocina TNF, TNFR1 (Carvalho-Sousa et al., 2011) e moléculas de membrana que reconhecem LPS, CD14 e TLR4 (Silveira Machado Cruz et al., 2010). A pineal expressa RNAm para todos os demais TLRs, exceto o *Tlr5*, e genes que codificam a via de transdução do NF- κ B e MAPK (da Silveira Cruz-Machado, 2015, da Silveira Cruz-Machado, 2015).

Sabendo que a pineal expressa os receptores TLR, que são reconhecidos como possíveis alvos de sinalização do material particulado, investigamos a **expressão** dos genes envolvidos na transdução da via, a **atividade** do fator NF- κ B, fator de transcrição chave na indução da resposta inflamatória e regulador da função pineal, e a **relevância** da interação em particular com TLR4 no efeito do material particulado diesel.

Observamos tanto ***in vivo*** quanto ***in vitro*** que o material particulado induz aumento da atividade do NF- κ B na pineal. Um

ponto importante a ser considerado é que as subunidades do NF- κ B determinam o perfil de regulação da expressão gênica (Gosh & Hayden, 2011). As proteínas c-Rel, Rel A e Rel B possuem domínio de transativação (TAD) e, portanto, são ativadoras da expressão gênica, enquanto as subunidades p50 e p52 não possuem esse domínio e, por definição, são proteínas repressoras da transcrição gênica. O NF- κ B se liga a sequências de nucleotídeos específicas no promotor e primeiro íntron do gene que codifica a AA-NAT. Estas regiões também são presentes para a ligação de dímeros do NF- κ B, que podem levar a uma repressão ou a ativação da sua transcrição (Muxel et al., 2012). Observamos um aumento de p50/p50 em pineais de ratos expostos ao ar poluído sugerindo que esse dímero possa estar relacionado à inibição do gene da *Aa-nat*, enquanto o dímero p50/RelA, possui atividade transcricional e pode estar implicado em efeitos pró-inflamatórios na pineal como aumento da expressão da iNOS (Carvalho-Sousa et al, 2011) ou a produção de TNF (da Silveira Cruz-Machado et al., 2012) e outros mediadores inflamatórios.

Sabemos que o estímulo com a citocina pró-inflamatória TNF, LPS, Pam3CSK4 e Zymozan em glândulas pineais em cultura induz a translocação nuclear do dímero do NF- κ B p50/p50 que não tem o domínio de transativação, e p50/RelA, que tem o TAD, levando à **inibição** da síntese de melatonina (Carvalho-Sousa et al., 2011, Silveira Cruz-Machado et al., 2010, 2012, 2015). Portanto, a nossa expectativa era de que em glândulas pineais estimuladas com particulado do diesel ou nas pineais de animais expostos a

translocação nuclear de p50/p50 e p50/RelA resultasse na inibição da melatonina e a indução da síntese de TNF.

Os resultados confirmam a nossa hipótese mostrando de forma inédita que a poluição do ar prejudica a transdução hormonal de variação de iluminação diária. Observamos que a inalação do ar poluído causa a **redução** significativa da expressão da enzima chave da via biosintética de melatonina, **AA-NAT** e a concentração desta indolamina no sangue.

Classicamente o controle da função pineal era considerado exclusivamente dependente da ativação simpática gerada pela sinalização da condição de claro-escuro (Klein e Weller, 1970). Agora, sabemos que em condições de injúria, a produção de melatonina pode ser regulada, tanto levando a inibição quanto sua potenciação. Essa resposta dependerá da integração de sinais endógenos e de moléculas que sinalizam respostas inflamatórias. A regulação da ativação do fator NF- κ B pode ser um dos principais mecanismos de resposta da pineal frente a um estímulo inflamatório. Neste trabalho, mostramos que o material particulado gera uma resposta inflamatória sistêmica e na glândula pineal, culminando com a ativação do fator NF- κ B e consequentemente a redução da melatonina noturna.

Como pressupomos no Eixo-Imune Pineal, moléculas que são secretadas no início da resposta inflamatória por células imunes ativadas, como TNF ou agentes pró-inflamatórios infecciosos como Zymozan e LPS, e não infecciosos, como o material particulado do ar, sinalizam através do NF- κ B para uma redução de melatonina. Essa

inibição ou diminuição da via biosintética de melatonina é vista como necessária ao processo de montagem da resposta inflamatória uma vez que os níveis noturnos de melatonina no sangue são capazes de reduzir a aderência de leucócitos à camada endotelial e migração para os tecidos alvo (Lotufo et al., 2007).

A citocina TNF suprime a via biosintética de melatonina reduzindo tanto o conteúdo como o precursor, N-acetilserotonina como a melatonina no meio de pineais estimuladas com noradrenalina (Fernandes et al., 2006). Em condições nas quais há altos níveis de TNF percebe-se uma correlação inversa com a concentração plasmática de melatonina. Mulheres com mastite perdem o ritmo de melatonina na circulação enquanto a inflamação é detectável (Pontes et al., 2006). Há uma redução importante ou até mesmo abolição do ritmo de melatonina em pacientes com sepse (Mundigler et al., 2002), em parturientes que desenvolveram mastite (Pontes e al., 2006), ou mulheres que passaram pela cirurgia cesariana (Pontes et al., 2007), pacientes com infarto do miocárdio (Dominguez-Rodrigues et al., 2004). Em ratos injetados com LPS, há uma redução transiente de melatonina após 2 horas da injeção (iv) quando acontece o pico de TNF no plasma (Tamura et al., 2010).

Por outro lado, o aumento da translocação nuclear do dímero do NF- κ B p50/Rel A na glândula pineal é responsável por **ativar** a expressão de vários genes relacionados à montagem da resposta inflamatória. A ativação do NF- κ B via **p50/Rel A** nos indica ser o principal mecanismo na resposta inflamatória da pineal à exposição

ao material particulado. Vale ressaltar que esse efeito positivo do NF- κ B sobre a expressão gênica também converge para uma resposta inibitória da função pineal.

A indução da sinalização TLR via moléculas intracelulares, como Myd88 e TRIF, controla a ativação de vários genes, incluindo citocinas pró-inflamatórias e marcadores celulares. Para avaliar de forma integral os programas ativados por TLRs na pineal quantificamos o perfil de expressão gênica através de um arranjo comercial de PCR em tempo real para via dos receptores *Toll-like*. Avaliamos a expressão de 84 genes que incluem os receptores TLR: *Cd180*, *Tlr1*, *Tlr2*, *Tlr3*, *Tlr4*, *Tlr5*, *Tlr6*, *Tlr7*, *Tlr9*, e adaptadores *Ticam 2*, *Irak 2*, *Pelil1*, *Traf6*, *Irak1*, *Myd88*, *Cd14*, *Mal*, *Rnf138*, *Ly96* proteínas de sinalização NF- κ B *Btk*, *Casp8*, *Chuk (Ikka)*, *Fadd*, *Ikbkb*, *Irak1*, *Irak2*, *Irf3*, *Map3k1*, *Map3k7*, *Map4k4*, *Nfkb1*, *Nfkb2*, *Nfkbia (Ikba/Mad3)*, *Nfkbib*, *Nfkbil1*, *Nfrkb*, *Ppara*, *Rel*, *Rela*, *Tnip2 (Tnfaip3)*, *Tradd*, *Ube2n*, *Ube2v1*, citocinas e seus receptores *Ccl2 (Mcp-1)*, *Csf3 (GCSF)*, *Il1A*, *Il1b*, *Il1r1*, *Il6*, *Il6r*, *Irak1*, *Irak2*, *Rela*, *Tnf*, *Tnfrsf1a*, *Lta*, *Hmgb1* e *Ptgs2*.

Dos **84** genes analisados **79** foram detectados na glândula pineal. Observamos que a exposição ao material particulado causa uma resposta pró-inflamatória rápida que leva ao aumento de vários grupos de genes relacionados à montagem de um processo de defesa. Há um perfil comum de ativação desses genes após **1h de exposição** ao material particulado, regulando significativamente **38** genes,

particularmente relacionados à via de sinalização NF- κ B e aos adaptadores e proteínas que interagem com os receptores TLR.

Os receptores TLR inicialmente conhecidos por reconhecerem estruturas conservadas de patógenos (Medzhitov, 1997) hoje são considerados alvos para sinalização de várias moléculas, inclusive endógenas. O material particulado do ar é uma mistura complexa de componentes, e como já descrito, capaz de ativar vias de sinalização comuns a patógenos (Myata & Van Eeden, 2011). Há uma discussão crescente ainda sobre qual tipo de molécula presente nesta mistura heterogênea que é responsável por promover a ligação com os receptores TLR (Plummer et al., 2012). Mas de forma comum os estudos apontam os receptores **TLR2** e **TLR4** como sendo os receptores envolvidos na sinalização ao MP (Bengali et al., 2013). Esses trabalhos demonstram que o efeito pró-oxidativo e/ou inflamatório do material particulado de diferentes origens é perdido quando há um bloqueio desses dois receptores (Becker et al., 2005). Observamos que a pineal expressa constitutivamente os genes para todos os receptores TLR com exceção do receptor **TLR5**, e tem aumento significativo dos receptores **Tlr2**, **Tlr3** e **Tlr4** em 1 hora de exposição ao material particulado. Os genes **Myd88** e **Cd14** também são aumentados significativamente. A proteína Myd88 (*myeloid differentiation primary response gene*) é uma molécula que interage com o domínio TIR de todos os TLRs com exceção do TLR3 que utiliza o TRIF (McGettrick e O'Neill, 2010).

O fator NF- κ B está diretamente ligado à ativação dos receptores TLR, e, portanto, também está implicado na mediação da resposta à poluição. Assim como observamos um aumento da atividade deste fator tanto em pineais de animais expostos como diretamente estimuladas com DEP, detectamos um aumento importante de praticamente todos os genes que codificam as proteínas que compõem os dímeros do NF- κ B bem como das moléculas que sinalizam através dessa via. Dos **38 genes** que foram significativamente regulados pelo material particulado, **18** desses codificam as proteínas da família Rel ou participam da via NF- κ B. Verificamos um aumento significativo na expressão dos genes da família NF- κ B: *Rel*, *Rel A*, e *p100 (Nfkb2)*, do gene da proteína inibitória I κ B alpha (*Nfkb1a*), a quinase IKK α (*Chuk*) e a quinase IKK β (*Ikbkb*) após uma hora de exposição ao MP.

A expressão dos genes de mediadores inflamatórios mostrou um perfil diferente, com pico da expressão de citocinas pró-inflamatórias em 1 hora pós-exposição e outras, com ação anti-inflamatória ou regulatória após 6 horas pós-exposição. Verificamos um aumento significativo da expressão dos genes das citocinas TNF, IL-1 α , IL-1 β , IL-12, IL-2, e dos receptores para IL-6, IL-6R e IL-1, IL-1R. Já em 6 horas de exposição observamos o aumento significativo da interleucina IL-10. As quimiocinas MCP1 (*Ccl2*) e CXCL10 tem aumento em 1 hora, mas com máxima expressão em 6 horas.

A pineal é um órgão circunventricular e tem acesso às moléculas circulantes ao passo que o sistema nervoso é protegido devido a estruturas de oclusão de passagem de moléculas por uma

barreira endotelial, a barreira hemato-encefálica (Duvernoy & Risold, 2007). A poluição do ar é capaz de afetar o sistema nervoso central induzindo **neuroinflamação**, perda neuronal, **disfunção** da barreira hemato-encefálica, e **ativação da microglia** (Calderon-Garciduenas, L. et al. 2008a, b, Fonken et al., 2011, Hartz et al., 2008, Levesque et al., 2011, Bolton et al., 2012, Davis et al., 2013). Portanto, esperávamos que a exposição dos animais ao ar particulado gerasse uma resposta inflamatória na pineal. Levando-se em conta a ausência da barreira hemato-encefálica especulamos um efeito ainda mais imediato quando comparado às demais outras estruturas encefálicas. De fato, observamos um efeito **pró-inflamatório** da exposição à poluição do ar sobre a função da glândula pineal. Há um aumento rápido (30 min) da atividade do NF- κ B na pineal e consequentemente verificamos a regulação de vários genes regulados por este fator na **primeira hora** de exposição. Em estudos com modelos semelhantes com material particulado concentrado do ar viu-se que há um aumento de marcadores inflamatórios no tecido cerebral de camundongos, como aumento da translocação do NF- κ B, do conteúdo de IL-1a e TNF (Campbell et al., 2005, Levesque et al., 2011).

Através da quantificação para proteína específica para microglia/macrófagos, IBA-1 avaliamos se a exposição ao material particulado induz a ativação da microglia da pineal. Essa análise foi realizada 2 horas após a exposição ao MP, e observamos um aumento significativo da imunorreatividade para proteína IBA-1 em cortes de glândulas pineais. Em modelos semelhantes também foi observado

aumento da atividade da microglia no sistema nervoso central após exposição ao diesel *in vivo* (Levesque et al., 2011) como *in vitro* (Block et al., 2004) bem como após a ativação do receptor TLR4 (da Silveira Cruz-Machado et al., 2012). O aumento da marcação para IBA-1 também pode indicar a reação da microglia em perceber e eliminar o particulado, uma vez que essa proteína participa da formação de processos na membrana para a fagocitose (Ohsawa et al., 2004). O efeito tóxico do DEP a neurônios, por exemplo, depende da ativação da fagocitose de células da microglia em cultura (Block et al., 2004).

Ao mesmo tempo em que a pineal reage e expressa um pacote de genes ligados à inflamação e à resposta imune inata, na periferia observamos uma resposta sistêmica gerada pelo material particulado. A ativação da pineal pode ser associada aos fatores pró-inflamatórios produzidos durante a resposta sistêmica gerada pela poluição (Rucker et al., 2007), mas também pode ter origem da reação das células da microglia diretamente às partículas que são capazes de chegar até a circulação, afetando a glândula pineal (Oberdorster et al. 2004, Elder et al. 2006, Peters et al., 2005). Para entender essa resposta, avaliamos o efeito direto do DEP, partículas finas e ultrafinas derivadas da combustão do diesel em glândulas pineais cultivadas. Vimos que a estimulação com DEP induz a ativação do NF- κ B e a secreção de TNF no meio de cultivo das pineais, resultando na redução da produção melatonina induzida por noradrenalina. A síntese de TNF pela pineal é essencial para o efeito do diesel, uma vez que quando bloqueamos o receptor TNFR1 deixamos de observar a

redução da produção de melatonina. Sabemos que a produção de TNF pela pineal é decorrente da ativação das células da microglia e indução da atividade do NF- κ B (Da Silveira Cruz Machado, 2012). A estimulação de pineais com LPS leva síntese de TNF e consequente redução de melatonina.

O outro elo do Eixo-Imune-Pineal é a produção de melatonina por células imunocompetentes ativadas no local da lesão ou agressão (Lardone et al., 2014, Markus et al., 2007). Aqui, confirmou-se que o DEP ativa o receptor **TLR4** e o fator de transcrição **NF- κ B** induzindo a expressão do gene que codifica a **AA-NAT**, e, por conseguinte, a síntese da **melatonina**. Isto foi demonstrado tanto em uma linhagem de macrófagos (RAW 246.7) usado para confirmar a transcrição de genes induzida por DEP através do repórter DsRed2, e nos macrófagos alveolares obtidos *in vivo*, que são a primeira linha de defesa pulmonar contra o material particulado do ar (Bowden, 1984).

O material particulado do diesel, ao contrário do que esperávamos, promove uma **redução** da secreção de citocinas pró-inflamatórias. Ao detectarmos um aumento da atividade do NF- κ B tanto pela translocação nuclear como aumento da expressão da proteína *reporter* no gene da AA-NAT prevíamos uma regulação positiva para citocinas reguladas por essa via, como TNF e MCP-1. Este perfil também já foi encontrado em outros estudos em que o DEP suprime a liberação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos alveolares humanas e murinos (Amakawa, 2003, Mundandhara et al., 2005) ou inibe a produção de citocinas em resposta ao LPS quando os

macrófagos são previamente estimulados com MP (Sawyer et al., 2013). Estes achados levantam uma discussão importante sobre dados clínicos em que se observa uma associação entre exposição à poluição e aumento de infecções respiratórias (Moon et al., 2002). Somado à inibição da resposta imune dos macrófagos pulmonares outra evidência que corrobora para este dado é o fato de que a exposição ao material particulado reduz a eficiência em fagocitar microorganismos. O material particulado causa redução do número de bactérias eliminadas pelos macrófagos devido à diminuição da internalização das partículas (Zhou & Kobzik, 2006). Experimentos desenvolvidos por Becker e Soukup (1999) com o vírus respiratório sincicial mostraram que macrófagos têm redução da produção de MCP-1 e da incorporação viral após exposição ao material particulado.

A relevância da produção de melatonina sobre a função de macrófagos alveolares também foi verificada analisando a capacidade dessas células em capturar partículas de diesel adicionados ao meio de cultura. Observamos que a incubação de macrófagos com melatonina (1 nM) aumentou significativamente a capacidade de fagocitose. Esses resultados corroboram com dados anteriores de nosso grupo obtidos em macrófagos do colostro humano, em que a ativação dos receptores de melatonina MT2 levou ao aumento da expressão de *dectina-1*, que é um receptor do tipo *scavenger* responsável pelo processamento e internalização da parede de fungos (Pires-Lapa et al., 2013).

A redução da produção de citocinas por macrófagos alveolares sintetizada por células incubadas com a DEP vai de encontro com a inibição da atividade de NF- κ B pela melatonina previamente demonstrado em linfócitos (Gilad et al., 1998), células endoteliais (Tamura et al., 2009) e da glândula pineal (Cecon et al., 2010). É interessante observar que o pico de expressão da proteína AA-NAT após 60 minutos é seguido por uma queda abrupta após 120 minutos. Possivelmente por um *feedback* negativo, uma vez que a produção de melatonina é conhecida por ser dependente da ativação do NF- κ B, enquanto a própria indolamina é capaz de inibir a atividade deste fator de transcrição. Esta poderia ser a razão para a divergência sobre a capacidade de DEP para induzir NF- κ B. Certamente esta observação depende do decurso temporal utilizado em cada protocolo experimental.

Dentre a variedade de ações da melatonina podemos destacar os efeitos pleiotrópicos como molécula **antioxidante**, citoprotetora e **anti-apoptótica** (Tan et al., 2010). Através de mecanismos dependentes ou independentes de interação com seus receptores de membrana, a melatonina estimula a expressão de genes de detoxificação e antioxidantes. Outro mecanismo convergente de proteção celular está na ação da melatonina sobre a função de sinalização mitocondrial, que envolve a diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio e ativação da proteína anti-apoptótica BCL2 (Luccheti, 2010).

Avaliamos o efeito citoprotetor da melatonina através do tratamento dos macrófagos diretamente com esta indolamina. Observamos que o material particulado do diesel reduz de forma significativa a viabilidade de macrófagos (através do método MTT) e também a indução de necrose (marcação positiva para iodeto de propídio). A melatonina **reduz** de maneira importante a perda de viabilidade celular através da ativação de seus receptores, uma vez que o bloqueio dos receptores MT1 e MT2 **potencia** a necrose induzida pelo DEP. Em estudos recentes do laboratório foi mostrado que a síntese de melatonina local, no cerebelo, é responsável por impedir a morte neuronal induzida pelo LPS (Franco & Markus, 2014). Por isso, a capacidade do LPS em induzir a morte é menos pronunciada no cerebelo do que no córtex e hipocampo. Já quando os receptores de melatonina são bloqueados os neurônios cerebelares tornam-se susceptíveis aos efeitos neurotóxicos do LPS (Pinato et al., 2014).

Comparado aos efeitos do diesel, observamos que a melatonina coordena ações citoprotetoras em macrófagos através da sinalização via receptores, uma vez que a morte celular induzida pelo DEP é significativamente potenciada quando eles são bloqueados. De outro modo, também observamos um efeito importante sobre a viabilidade dessas células quando as tratamos diretamente com esta indolamina. Neste último caso, prevemos também uma ação estequiométrica da melatonina ao se ligar diretamente a radicais livres produzidos em excesso em resposta ao DEP. Considerando os efeitos citotóxicos

causados pelo DEP, como a geração de ROS, podemos indicar que a melatonina poderia agir se ligando diretamente, quando em concentrações elevadas (Poeggeler et al., 1996), ou modulando positivamente a expressão enzimas antioxidantes, em concentrações fisiológicas (Tan et al., 2002, Hardeland, 2009).

Tomando os dados obtidos em conjunto, acreditamos que a melatonina pode estar envolvida na **remoção** eficiente de particulado, **reduzindo** os danos oxidativos gerados, portanto aumentando sua sobrevivência e **diminuindo** a resposta pró-inflamatória ao modular a produção de citocinas pelos macrófagos alveolares e consequentemente levando a um menor dano tecidual.

Situando a melatonina dentro da resposta imune inata, acreditamos que esta indolamina é uma molécula singular que integra respostas específicas em contextos fisiológicos diversos. A **redução** da síntese pela pineal é requerida para o processo de gatilho da resposta inflamatória, e a sua **indução** em células de defesa se mostra altamente relevante na resolução da resposta. A regulação de uma mesma molécula por vias comuns de sinalização nos reporta provavelmente às propriedades conservadas da melatonina ao longo da evolução, e o acúmulo de funções e ações em mamíferos a torna uma molécula muito peculiar e alvo de investigação. Ao tratar sobre a poluição do ar, um fator ambiental e epidemiológico, vimos que a melatonina participa das respostas mediadas pelos poluentes, e pode ser considerada de marcador a um coadjuvante em tratamentos ou intervenções em episódios de poluição aguda.

Conclusões

VI. Conclusões

Em resumo, mostramos que a glândula pineal, é um alvo para o material particulado, que reduz a produção circadiana de melatonina devido à inibição da expressão da enzima chave neste processo, a AA-NAT. Considerando a importância da melatonina noturna no controle da migração de leucócitos da circulação para os tecidos periféricos (Lotufo et al., 2001, 2006, Marçola et al., 2012), a interferência na fisiologia pineal pela poluição do ar pode predispor o organismo para iniciar respostas inflamatórias indesejáveis. Por outro lado, a produção de melatonina extra-pineal por macrófagos pode ser um mecanismo próprio de defesa, reduzindo danos celulares e a exacerbação da resposta inflamatória gerada pelo ar material particulado. Portanto, a ativação do Eixo é essencial para que ocorra a montagem e resolução eficiente da resposta inflamatória em modelo inflamatório de poluição atmosférica.

Resumo

Padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) e citocinas pró-inflamatórias ativam o Eixo Imune-Pineal promovendo uma alternância temporária da síntese de melatonina da glândula pineal para células imuno-competentes. Esta regulação é mediada pela ativação do fator de transcrição factor nuclear kappa B (NF-kB), que de acordo com contexto fisiológico controla a transcrição do gene que codifica a enzima-chave na síntese de melatonina (arilalquilamina-N-acetiltransferase, AA-NAT), e altera a função da melatonina de cronobiótica a reguladora de respostas inflamatórias. Nosso objetivo foi investigar se a poluição do ar, um importante fator inflamatório ambiental é capaz de acionar o Eixo Imune-Pineal. Investigamos o efeito de partículas concentradas finas (<2,5 µm) na síntese de melatonina noturna em ratos, e o efeito de partículas isoladas derivadas diesel (DEP) na síntese de melatonina por células RAW 264.7 e macrófagos pulmonares. A exposição ao PM aumentou a translocação nuclear de NF-kB e reduziu a expressão pineal de AA-NAT e a concentração de melatonina plasma. Em contraste, a DEP leva a uma translocação transitória de NF-kB em macrófagos resultando na expressão de AA-NAT e a síntese da melatonina. Nós confirmamos que a ativação de elementos kappa B no gene *Aa-nat* foi responsável por sua transcrição. Em conclusão, a poluição do ar, o que pode ser considerado um agente de sinalização de perigo, ativa o eixo imune-pineal, reduzindo a síntese da melatonina pineal noturno, e ativando a produção de melatonina por macrófagos.

Abstract

Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and pro-inflammatory cytokines activate the Immune-Pineal Axis promoting a temporary shift of melatonin synthesis from the pineal gland to immune-competent cells. This shift is mediated by the activation of the transcription factor nuclear factor kappa B (NF- κ B), which according to the cell *milieu* inhibits or induces the transcription of the gene that codifies the key enzyme in melatonin synthesis (arylalkylamine-N-acetyltransferase, AA-NAT), and alters melatonin function from chronobiotic to a regulator of inflammatory responses. Our aim is to investigate whether air pollution, an important environmental danger-associated molecular pattern, triggers the immune-pineal axis. We investigated the effect of urban fine concentrated particulate matter (PM_{2.5}, <2.5 μ m) on the nocturnal melatonin synthesis in rats, and the effect of isolated derived diesel particles (DEP) on melatonin synthesis by RAW 264.7 cells, a model for studying macrophages. PM exposition increased nuclear translocation of NF- κ B and reduced the pineal expression of AA-NAT and plasma melatonin concentration. In contrast, DEP leads to a transient translocation of NF- κ B in RAW 274.6 cells resulting in the expression of AA-NAT and the synthesis of melatonin. We confirmed that the activation of κ B elements in aa-nat gene was responsible for its transcription. In conclusion, air pollution, which can be considered a danger-signalizing agent, activates the immune-pineal axis, reducing nocturnal pineal melatonin synthesis, and activating the production of melatonin by macrophages.

VII Referências Bibliográficas

AXELROD J, WEISSBACH H. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science*. 131(3409): 1312, 1960.

ADAMSON IY, PRIEDITIS H, HEDGECOCK C, VINCENT R. Zinc is the toxic factor in the lung response to an atmospheric particulate sample. *Toxicol Appl Pharmacol*. 15; 166(2): 111-9, 2000.

AMAKAWA K1, TERASHIMA T, MATSUZAKI T, MATSUMARU A, SAGAI M, YAMAGUCHI K. Suppressive effects of diesel exhaust particles on cytokine release from human and murine alveolar macrophages. *Exp Lung Res*. 29(3): 149-64, 2003.

BECKER S, DAILEY L, SOUKUP JM, SILBAJORIS R, DEVLIN RB. TLR-2 is involved in airway epithelial cell response to air pollution particles. *Toxicol Appl Pharmacol*. 15; 203(1): 45-52, 2005.

BECKER S, FENTON MJ, SOUKUP JM. Involvement of microbial components and toll-like receptors 2 and 4 in cytokine responses to air pollution particles. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 27: 611-618, 2002.

BECKER S, MUNDANDHARA S, DEVLIN RB, MADDEN M. Regulation of cytokine production in human alveolar macrophages and airway epithelial cells in response to ambient air pollution particles: further mechanistic studies. *Toxicol Appl Pharmacol*. 207 (2): 269- 75, 2005.

BECKER, S, SOUKUP, J M. Exposure to urban air particulates alters the macrophage-mediated inflammatory response to respiratory viral infection. *J. Toxicol. Environ. Health* 57: 445-457, 1999.

BECKER S, SOUKUP JM, SIOUTAS C, CASSEE FR. Response of human alveolar macrophages to ultrafine, fine, and coarse urban air pollution particles. *Exp Lung Res*. 29(1): 29-44, 2003.

BEN NERIAH Y, KARIN M. Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the marthmaker. *Nat Immunology*, 12, 715-723, 2011

BENÍTEZ-KING G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res*. 40(1):1-9, 2006.

BERSON, D.M. Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci*. 26: 314–320, 2003

BLOCK ML, CALDERON-GARCIDUENAS L. Air pollution: mechanisms of neuroinflammation and CNS disease. *Trends Neurosci* 32(9): 506–516, 2009.

BOJKOWSKI CJ, ARENDT J, SHIH MC, MARKEY SP. Melatonin secretion in humans assessed by measuring its metabolite, 6-sulfatoxymelatonin. *Clin Chem*. 33(8): 1343-8, 1987.

BORJIGIN J, WANG MM, SNYDER SH. Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland. *Nature*. 378(6559): 783-5, 1995.

BOWDEN DH, ADAMSON IY. The role of cell injury and the continuing inflammatory response in the generation of silicotic pulmonary fibrosis. *Pathol*. 144(3): 149-61, 1984.

BRAIN, J. Macrophages in the respiratory tract. In *Handbook of physiology*, ed. I. A. P. Fishman, pp. 447–471. Bethesda, MD: American Physiological Society. 1985.

BROOK, R. D, FRANKLIN, B, CASCIO, W, HONG Y. L, HOWARD, G, LIPSETT, M, LUEPKER, R, MITTLEMAN, M, SAMET, J, SMITH, S. C, TAGER, I. Air pollution and cardiovascular disease a statement for healthcare professionals from the expert panel on population and prevention science of the Amer Heart Assoc. *Circul.* 109: 2655-2671, 2004.

BUBENIK GA. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig Dis Sci.* 47(10): 2336-48, 2002.

CALDERON-GARCIDUENAS L, SOLT AC, HENRIQUEZ-ROLDAN C, TORRES-JARDON R, NUSE B, HERRITT L. Long-term air pollution exposure is associated with neuroinflammation, an altered innate immune response, disruption of the blood-brain barrier, ultrafine particulate deposition, and accumulation of amyloid beta-42 and alpha-synuclein in children and young adults. *Toxicol Pathol.* 36: 289–310, 2008.

CALVO JR, GONZÁLEZ-YANES C, MALDONADO MD. The role of melatonin in the cells of the innate immunity: a review. *J Pineal Res.* 55(2): 103-20, 2013.

CALVO JR, RAFII-EL-IDRISSI M, POZO D et al. Immunomodulatory role of melatonin: specific binding sites in human and rodent lymphoid cells. *J Pineal Res*; 18:119–126, 1995.

CAMPBELL A, OLDHAM M, BECARIA A, BONDY SC, MEACHER D, SIOUTAS C, MISRA C, MENDEZ LB, KLEINMAN M. Particulate matter in polluted air may increase biomarkers of inflammation in mouse brain. *NeuroToxicology* 26: 133–140, 2005.

CARRILLO-VICO A, LARDONE PJ, ALVAREZ-SÁNCHEZ N, RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ A, GUERRERO JM. Melatonin: buffering the immune system. *Int J Mol Sci.* 14(4): 8638-83, 2013.

CARRILLO-VICO A, CALVO JR, ABREU P, LARDONE PJ, GARCÍA-MAURIÑO S, REITER RJ, GUERRERO JM. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.* 18(3): 537-9, 2004.

CARRILLO-VICO A, GARCÍA-PERGAÑEDA A, NAJI L, CALVO JR, ROMERO MP, GUERRERO JM. Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse immune system. *Cell Mol Life Sci.* 60(10): 2272-8, 2003.

CARVALHO-SOUSA CE, DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO S, TAMURA EK, FERNANDES PA, PINATO L, MUXEL SM, CECON E, MARKUS RP. Molecular basis for defining the pineal gland and pinealocytes as targets for tumor necrosis factor. *Front Endocrinol* 13 2: 10, 2011.

CECON E, FERNANDES PA, PINATO L, FERREIRA ZS, MARKUS RP. Daily variation of constitutively activated nuclear factor kappa B (NF- κ B) in rat pineal gland. *Chronobiol Int.* 27 (1): 52-67, 2010.

CHALLET, E. Minireview: entrainment of the suprachiasmatic clockwork in diurnal and nocturnal mammals. *Endocrinology* 148: 5648–5655, 2007

CONTI A, CONCONI S, HERTENS E, SKWARLO-SONTA K, MARKOWSKA M, MAESTRONI JM. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res.* 28(4): 193-202, 2000.

CORNELISSEN M, PHILIPPE J, DE SITTER S, DE RIDDER L. Annexin V expression in apoptotic peripheral blood lymphocytes: An electron microscopic evaluation. *Apoptosis*. 7:41–47. 2002.

COSTA DL, DREHER KL. Bioavailable transition metals in particulate matter mediate cardiopulmonary injury in healthy and compromised animal models. *105*: 1053– 1060, 1997

CSABA G, BARÁTH P. Morphological changes of thymus and the thyroid gland after postnatal extirpation of pineal body. *Endocrinol Exp*. 9(1): 59-67, 1975.

DAVIS RL, DAS S, BUCK DJ, STEVENS CW. B-funaltrexamine inhibits chemokine (CXCL10) expression in normal human astrocytes. *Neurochem Int*. 62(4): 478-85, 2013.

DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO S, CARVALHO-SOUSA CE, TAMURA EK, PINATO L, CECON E, FERNANDES PA, DE AVELLAR MC, FERREIRA ZS, MARKUS RP. TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFkB pathway. *J Pineal Res*. 49(2): 183-92, 2010.

DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO S, PINATO L, TAMURA EK, CARVALHO-SOUSA CE, MARKUS RP. Glia-pinealocyte network: the paracrine modulation of melatonin synthesis by tumor necrosis factor (TNF). *PLoS One*. 7(7): e40142, 2012.

DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO Caracterização dos receptores tipo Toll em glândulas pineais de rato e sua implicação no entendimento do Eixo Imune-Pineal. São Paulo, Universidade de São Paulo, 2015.

DE WAAL MALEFYT R, ABRAMS J, BENNETT B, FIGDOR CG, DE VRIES JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human

monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* 1;174 (5): 1209-20, 1991.

DOMINGUEZ-RODRIGUEZ A, ABREU-GONZALEZ P, GARCIA M, FERRER J, DE LA ROSA A, VARGAS M, REITER RJ. Light/dark patterns of interleukin-6 in relation to the pineal hormone melatonin in patients with acute myocardial infarction. *Cytokine.* 26(2): 89-93, 2004.

DUBOCOVICH ML, MASANA MI, IACOB S, SAURI DM. Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 355(3): 365-75, 1997.

DUBOCOVICH ML, RIVERA-BERMUDEZ MA, GERDIN MJ, MASANA MI. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci.* 1; 8:d1093-108, 2003

DUBOCOVICH ML. Pharmacology and function of melatonin receptors. *FASEB J.* 2(12): 2765-73, 1988.

DUVERNOY HM, RISOLD PY. The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain Res Rev.* 56(1): 119-47, 2007.

EKSTRÖM P, MEISSEL H. Evolution of photosensory pineal organs in new light: the fate of neuroendocrine photoreceptors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 358(1438): 1679-700, 2003.

ELDER A, GELEIN R, SILVA V, FEIKERT T, OPANASHUK L, CARTER J, POTTER R, MAYNARD A, ITO Y, FINKELSTEIN J, OBERDÖRSTER

G. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect.* 114(8): 1178, 2006.

EMA M, NAYA M, HORIMOTO M, KATO H: Developmental toxicity of diesel exhaust: a review of studies in experimental animals. *Reprod Toxicol* 42:1–17, 2013.

FERNANDES PA, BOTHOREL B, CLESSE D, MONTEIRO AW, CALGARI C, RAISON S, SIMONNEAUX V, MARKUS RP. Local corticosterone infusion enhances nocturnal pineal melatonin production in vivo. *J Neuroendocrinol.* 21(2): 90-7, 2009.

FERNANDES PA, CECON E, MARKUS RP, FERREIRA ZS Effect of TNF- α on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a 'feedback' of the immune response on circadian timing. *J Pineal Res.* 41(4): 344-50, 2006.

FERREIRA ZS, CIPOLLA-NETO J, MARKUS RP. Presence of P2-purinoceptors in the rat pineal gland. *Br J Pharmacol.* 112(1): 107-10, 1994.

FERREIRA ZS, MARKUS RP. Characterisation of P2Y (1)-like receptor in cultured rat pineal glands. *Eur J Pharmacol.* 415(2-3): 151-6, 2001.

FERREIRA ZS, FERNANDES PA, DUMA D, ASSREUY J, AVELLAR MC, MARKUS RP. Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. *J Pineal Res.* 38(3): 182-8, 2005

FONKEN LK, XU X, WEIL ZM, CHEN G, SUN Q, RAJAGOPALAN S, NELSON RJ. Air pollution impairs cognition, provokes depressive-like behaviors and alters hippocampal cytokine expression and morphology. *Mol Psychiatry.* 16(10): 987-95, 2011

FOSTER CE, BIANCHET MA, TALALAY P, FAIG M, AMZEL LM. Structures of mammalian cytosolic quinone reductases. *Free Radic Biol Med.* 29(3-4): 241-5, 2000.

FRANCO DG, MARKUS RP The cellular state determines the effect of melatonin on the survival of mixed cerebellar cell culture. *PLoS One.* 9(9):e106332, 2014.

FRIED J, PEREZ AG, CLARKSON BD. Flow cytofluorometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide. Properties of the method and mathematical analysis of the data. *J Cell Biol.* 71: 172–181, 1976.

FUJII T, HAYASHI S, HOGG JC, VINCENT R, VAN EEDEN SF. Particulate matter induces cytokine expression in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 25(3): 265-71, 2001.

GARCIA-PERGANEDA A, GUERRERO JM, RAFII-EL-IDRISSI M et al. Characterization of membrane melatonin receptor in mouse peritoneal macrophages: inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein. *J Neuroimmunol;* 95: 85–94, 1999.

GARIDOU ML, BARTOL I, CALGARI C, PÉVET P, SIMONNEAUX V. In vivo observation of a non-noradrenergic regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression in the rat pineal complex. *Neurosci.* 105(3): 721-9, 2001.

GANGULY S, GASTEL JA, WELLER JL, SCHWARTZ C, JAFFE H, NAMBOODIRI MA, COON SL, HICKMAN AB, ROLLAG M, OBSIL T, BEAUVERGER P, FERRY G, BOUTIN JA, KLEIN DC. Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding

switch in melatonin synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(14): 8083-8, 2001.

GANGULY S, COON SL, KLEIN DC. Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell Tissue Res.* 309(1): 127-37, 2002.

GARCÍA-MAURIN O, S., M.G. GONZALEZ-HABA, J.R. CALVO, R. GOBERNA, J.M. GUERRERO Involvement of nuclear binding sites for melatonin in the regulation of IL-2 and IL-6 production by human blood mononuclear cells. *J.Neuroimmunol.* 92: 76-84, 1999

GASTEL JA, ROSEBOOM PH, RINALDI PA, WELLER JL, KLEIN DC. Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Sci.* 279(5355): 1358-60, 1998.

GAVETT SH, HAYKAL-COATES N, COPELAND LB, HEINRICH J, GILMOUR MI. Metal composition of ambient PM2.5 influences severity of allergic airways disease in mice. *Environ Health Perspect.* 111(12): 1471-7, 2003.

GERLOFS-NIJLAND, M. E., BERLO, D. VAN, CASSEE, F. R., SCHINS, R. P. F., WANG, K. E CAMPBELL, A.. Effect of prolonged exposure to diesel engine exhaust on proinflammatory markers in different regions of the rat brain. *Particle and fibre toxicology*, 7, 12, 2010.

GHOSH, S., HAYDEN M. S. NF- κ B in immunobiology. *Cell Res.* (2): 223-44, 2011.

GILAD E, WONG HR, ZINGARELLI B, VIRÁG L, O'CONNOR M, SALZMAN AL, SZABÓ C. Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages:

role of inhibition of NFkappaB activation. *FASEB J.* 12(9): 685-93, 1998.

GÓMEZ-CORVERA A., CERRILLO I., MOLINERO P., NARANJO MC., LARDONE PJ., SANCHEZ-HIDALGO M., CARRASCOSA-SALMORAL MP., MEDRANO-CAMPILLO P., GUERRERO JM., RUBIO A. (2009). Evidence of immune system melatonin production by two pineal melatonin deficient mice, C57BL/6 and swiss strains. *J Pineal Res.* 47: 15-22, 2009

HARADA Y, OKUBO M, YAGA K, KANEKO T, KAKU K. Neuropeptide Y inhibits beta-adrenergic agonist- and vasoactive intestinal peptide-induced cyclic AMP accumulation in rat pinealocytes through pertussis toxin-sensitive G protein *J Neurochem.* 59(6): 2178-83, 1992.

HARDELAND, R. Neuroprotection by radical avoidance: search for suitable agents. *Molecules* 14: 5054–102, 2009.

HARDELAND R, PANDI-PERUMAL SR, CARDINALI DP. Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol.* 38(3): 313-6, 2006.

HARDELAND R, COTO-MONTES A, POEGGELER B. Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms. *Chronobiol Int.* 20(6): 921-62, 2003.

HAYDEN MS, GHOSH S. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. *Semin Immunol.* 26(3): 253-66, 2014.

HARTZ AM, BAUER B, BLOCK ML, HONG JS, MILLER DS. Diesel exhaust particles induce oxidative stress, proinflammatory signaling, and P-glycoprotein up-regulation at the blood-brain barrier. *FASEB J.* 22: 2723–33, 2008.

HIRAIWA K, VAN EEDEN SF. Contribution of lung macrophages to the inflammatory responses induced by exposure to air pollutants. *Mediators Inflamm.* 619523, 2013.

HIURA TS, KASZUBOWSKI MP, LI N, NEL AE. Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis- in macrophages. *J Immunol.* 163(10): 5582-91, 1999.

HUANG SH, CAO XJ, WEI W. Melatonin decreases TLR3- mediated inflammatory factor expression via inhibition of NF-kappa B activation in respiratory syncytial virus infected RAW 264.7 macrophages. *J Pineal Res* 45: 93–100, 2008.

HUSSELL T, BELL TJ. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol.* 14(2): 81-93, 2014.

KAMPFRATH T, MAISEYEU A, YING Z, SHAH Z, DEIULIIS JA, XU X, KHERADA N, BROOK RD, REDDY KM, PADTURE NP, PARTHASARATHY S, CHEN LC, MOFFATT-BRUCE S, SUN Q, MORAWIETZ H, RAJAGOPALAN S. Chronic fine particulate matter exposure induces systemic vascular dysfunction via NADPH oxidase and TLR4 pathways. *Circ Res.* 108(6): 716-26, 2011.

KANAREK N, BEN-NERIAH Y. Regulation of NF-kappaB by ubiquitination and degradation of the IkappaBs. *Immunol Rev* 246: 77-94, 2012.

KARIN M, BEN-NERIAH Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa] B activity. *Annu Rev Immunol.* 18: 621-63, 2000.

KAWAI T, AKIRA S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol.* 7(2): 131-7, 2006.

KENNAWAY DJ, WRIGHT H. Melatonin and circadian rhythms. *Curr Top Med Chem.* 2(2): 199-209, 2002.

KLEIN DC, WELLER JL. Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Scie.* 169(3950): 1093-5, 1970.

LARDONE PJ, ALVAREZ-SANCHEZ SN, GUERRERO JM, CARRILLO-VICO A. Melatonin and glucose metabolism: clinical relevance. *Curr Pharm Des.* 20(30): 4841-53, 2014.

LARDONE, PJ, CARRILLO-VICO, A, MOLINERO, P, RUBIO, A, GUERRERO, JM. A novel interplay between membrane and nuclear melatonin receptors in human lymphocytes: significance in IL-2 production. *Cell. Mol. Life Sci.* 66: 516–525, 2009.

LERNER, AB, CASE, JD, TAKAHASHI, Y, LEE, TH, MORI, W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc.* 80: 2587, 1958.

LEVESQUE S, TAETZSCH T, LULL ME, KODAVANTI U, STADLER K, WAGNER A, JOHNSON JA, DUKE L, KODAVANTI P, SURACE MJ, LOTUFO CM, LOPES C, DUBOCOVICH ML, FARSKY SH, MARKUS RP. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur J Pharmacol.* Nov 2; 430(2-3): 351-7, 2001.

BLOCK ML. Diesel exhaust activates and primes microglia: air pollution, neuroinflammation, and regulation of dopaminergic neurotoxicity. *Environ Health Perspect.* 119(8):1149-55, 2011.

LAKS DM, OLIVEIRA R, ANDRÉ P, MACCHIONE M, LEMOS M, FAFFE DS. Composition of diesel particles influences acute pulmonary toxicity: an experimental study in mice. *Inhal Toxicol* 11: 1037–42, 2008.

LI R, NING Z, CUI J, KHALSA B, AI L, TAKABE W, BEEBE T, MAJUMDAR R, SIOUTAS C, HSIAI T. Ultrafine particles from diesel engines induce vascular oxidative stress via JNK activation. *Free Radic Biol Med*. 15; 46(6):775-82, 2009.

LI R, MOUILLESSEAU KP, MONTTOYA D, CRUZ D, GHARAVI N, DUN M, KORONIAK L, BERLINER JÁ. Identification of prostaglandin E2 receptor subtype 2 as a receptor activated by OxPAPC. *Circ Res*. 17;98(5): 642-50, 2006.

LISSEONI P, BARNI S, TANCINI G, ARDIZZOIA A, ROVELLI F, CAZZANIGA M, BRIVIO F, PIPERNO A, ALDEGHI R, FOSSATI D, ET AL. Immunotherapy with subcutaneous low-dose interleukin-2 and the pineal indole melatonin as a new effective therapy in advanced cancers of the digestive tract. *Br J Cancer*. 67(6): 1404-7, 1993.

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

LOPES C, DELYRA JL, MARKUS RP, MARIANO M. Circadian rhythm in experimental granulomatous inflammation is modulated by melatonin. *J Pineal Res*. 23(2): 72-8, 1997.

LOPEZ-GONZALEZ MA, MARTIN-CACAO A, CALVO JR et al. Specific binding of 2-[125I] melatonin by partially purified membranes of rat thymus. *J Neuroimmunol* 45: 121– 126, 1993.

LOTUFO CM, YAMASHITA CE, FARSKY SH, MARKUS RP. Melatonin effect on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B4. *Eur J Pharmacol.* 534(1-3): 258-63, 2006.

LUCAS K, MAES M. Role of the Toll Like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway. *Mol Neurobiol.* 48(1): 190-204, 2013.

LUCHETTI F, CANONICO B, BETTI M, ARCANGELETTI M, PIOLLI F, PIRODDI M, CANESI L, PAPA S, GALLI F. Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J.* 24(10): 3603-24, 2010.

MAESTRONI GJ, CONTI A, PIERPAOLI W. Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. *J Neuroimmunol.* 13(1): 19-30, 1986.

MARÇOLA M, DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO S, FERNANDES PA, MONTEIRO AW, MARKUS RP, TAMURA EK. Endothelial cell adhesiveness is a function of environmental lighting and melatonin level. *J Pineal Res.* 54(2): 162-9, 2013.

MARKUS RF, FERREIRA ZS, FERNANDES PACM, CECOM E. The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *NeuroImmunoModulation* 14: 126-133. 2007

MARKUS RP, FERREIRA ZS. The immune-pineal axis: the role of pineal and extra-pineal melatonin in modulating inflammation. *Adv Neuroimmune Biol* 1: 95-104, 2011.

MARTINEZ FO, SICA A, MANTOVANI A, LOCATI M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 13: 453-61, 2008.

MARTINS E JR, FERREIRA AC, SKORUPA AL, AFECHÉ SC, CIPOLLANETO J, COSTA ROSA LF. Tryptophan consumption and indoleamines production by peritoneal cavity macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 75, 1116–1121, 2004.

MATÉS JM, SEGURA JA, ALONSO FJ, MÁRQUEZ J. Intracellular redox status and oxidative stress: Implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Arch Toxicol.* 82, 273–299, 2008.

MAYO JC, SAINZ RM, TAN DX, HARDELAND R, LEON J, RODRIGUEZ C, REITER RJ. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol* 165: 139–149, 2005.

MCGETTRICK AF, O'NEILL LA. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. *Curr. Opin. Immunol.* 22(1): 20–7, 2010.

MEDZHITOV R, JANEWAY C A. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91: 295–298, 1997.

MIYATA R, VAN EEDEN SF. The innate and adaptive immune response induced by alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1; 257(2): 209–26, 2011.

MØLLER M, INGILD A, BOCK E. Immunohistochemical demonstration of S-100 protein and GFA protein in interstitial cells of rat pineal gland. *Brain Res.* 20; 140(1): 1–13, 1978.

MØLLER M, RAVAUULT JP, COZZI B. The chemical neuroanatomy of the mammalian pineal gland. *Neurochem Int.* 28(1): 23–33, 1996.

MONN C, FENDT R, KOLLER T. Ambient PM(10) extracts inhibit phagocytosis of defined inert model particles by alveolar macrophages. *Inhal Toxicol.* 14(4): 369-85, 2002.

MOORE, R Y. Circadian rhythms basic neurobiology and clinical applications. *Annu Rev Med.* 48: 253-266, 1997.

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

MUNDIGLER G, DELLE-KARTH G, KORENY M, ZEHETGRUBER M, STEINDL-MUNDA P, MARKTL W, FERTI L, SIOSTRZONEK P. Impaired circadian rhythm of melatonin secretion in sedated critically ill patients with severe sepsis. *Crit Care Med.* 30(3): 536-40, 2002.

MUXEL SM, PIRES-LAPA MA, MONTEIRO AW, CECON E, TAMURA EK, FLOETER-WINTER LM, MARKUS RP. NF- κ B drives the synthesis of melatonin in RAW 264.7 macrophages by inducing the transcription of the arylalkylamine-N-acetyltransferase (AA-NAT) gene. *PLoS One.* 7(12): e52010, 2012.

NARANJO MC, GUERRERO JM, RUBIO A, LARDONE PJ, CARRILLO-VICO A, CARRASCOSA-SALMORAL MP, JIMÉNEZ-JORGE S, ARELLANO MV, LEAL-NOVAL SR, LEAL M, LISSEN E, MOLINERO P. Melatonin biosynthesis in the thymus of humans and rats. *Cell Mol Life Sci.* 64(6): 781-90, 2007.

NEL AE, DIAZ-SANCHEZ D, NG D, HIURA T, SAXON A. Enhancement of allergic inflammation by the interaction between diesel exhaust particles and the immune system. *J Allergy Clin Immunol* 102: 539-554, 1998.

NELSON RJ, DRAZEN DL. Melatonin mediates seasonal adjustments in immune function. *Reprod Nutr Dev*. 39(3): 383-98, 1999.

NELSON RJ, DEMAS, GE. Role of melatonin in mediating seasonal energetic and immunologic adaptations. *Brain Res Bull*. 44(4): 423-30, 1997.

NEMMAR A, AL-SALAM S, DHANASEKARAN S, SUDHADEVI M, ALI BH.

Pulmonary exposure to diesel exhaust particles promotes cerebral microvessel thrombosis: protective effect of a cysteine prodrug 1-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid. *Toxicol*. 263(2-3): 84-92, 2009.

NEMMAR A, AL-MASKARI S, ALI BH, AL-AMRI IS. Cardiovascular and lung inflammatory effects induced by systemically administered diesel exhaust particles in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 292(3): L664-70, 2007.

NEMMAR A, HOET PH, NEMERY B. Health effects of air pollution episodes. *Rev Mal Respir*. 20(3 Pt 1): 327-30, 2003.

NEMMAR A, HOET PH, VANQUICKENBORNE B, DINSDALE D, THOMEER M, HOYLAERTS MF, VANBILLOEN H, MORTELMANS L, NEMERY B. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* 105: 411-414, 2002.

NEMMAR A, VANBILLOEN H, HOYLAERTS MF, HOET PH, VERBRUGGEN A, NEMERY B. Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *Am J Respir Crit Care Med*. 164(9): 1665-8, 2001.

NOSJEAN O, FERRO M, COGE F, BEAUVERGER P, HENLIN JM, LEFOULON F, FAUCHERE JL, DELAGRANGE P, CANET E, BOUTIN

JA. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem.* 275(40): 31311-7, 2000.

NOVAES, P SALDIVA, PH KARA-JOSÉ, N MACCHIONE, M, MATSUDA, M, RACCA, L, BERRA A. Ambient Levels of Air Pollution Induce Goblet-Cell Hyperplasia in Human Conjunctival Epithelium. *Environ Health Perspect.* 115(12): 1753–1756, 2007.

OBERDORSTER G, SHARP Z, ATUDOREI V, ELDER A, GELEIN R, LUNTS A, KREYLING W, COX C. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A* 65: 1531–1543, 2002.

OBERDORSTER G, SHARP Z, ATUDOREI V, ELDER A, GELEIN R, KREYLING W, COX C. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* 16: 437–445, 2004.

OHSAWA K1, IMAI Y, SASAKI Y, KOHSAKA S Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem* 88(4): 844-56, 2004.

OMS. Health Aspects of Air Pollution with Particulate Matter, Ozone and Nitrogen Dioxide, 2003.

OSORNIO-VARGAS AR, BONNER JC, ALFARO-MORENO E, MARTÍNEZ L, GARCÍA-CUELLAR C, PONCE-DE-LEÓN ROSALES S, MIRANDA J, ROSAS I. Proinflammatory and cytotoxic effects of Mexico City air pollution particulate matter in vitro are dependent on particle size and composition. *Environ Health Perspect.* 111(10): 1289-93, 2003.

PANDI-PERUMAL SR, TRAKHT I, SRINIVASAN V, SPENCE DW, MAESTRONI GJ, ZISAPEL N, CARDINALI DP. Physiological effects of

melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog. Neurobiol.* 85: 335–353, 2008.

PARK JY, PARK MH, PARK H, HA J, KIM SJ, AHN C. Neuroprotection by fructose-1,6-bisphosphate involves ROS alterations via p38 MAPK/ERK. *Brain Res.* 1026(2): 295–301, 2004.

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* 275: 207–213, 2005.

PENNING TM, BURCZYNSKI ME, HUNG CF, MCCOULL KD, PALACKAL NT, TSURUDA LS. Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones. *Chem Res Toxicol.* 12(1): 1–18, 1999.

PERREAU-LENZ S, KALSBECK A, GARIDOU ML, WORTEL J, VAN DER VLIET J, VAN HEIJNINGEN C, SIMONNEAUX V, PÉVET P, BUIJS RM. Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms. *Eur J Neurosci.* 17(2): 221–8, 2003.

PETERS A, VERONESI B, CALDERON-GARCIDUENAS L, GEHR P, CHEN LC, GEISER M, REED W, ROTHEN-RUTISHAUSER B, SCHURCH S, SCHULZ H Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update. *Part Fibre Toxicol* 3: 13, 2006.

PIERDOMINICI M, MASELLI A, CECCHETTI S, TINARI A, MASTROFRANCESCO A, ALFÈ M, GARGIULO V, BEATRICE C, DI BLASIO G, CARPINELLI G, ORTONA E, GIOVANNETTI A, FIORITO S.

Diesel exhaust particle exposure in vitro impacts T lymphocyte phenotype and function. *Part Fibre Toxicol.* 11(1): 74, 2014.

PINATO L, DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO S, FRANCO DG, CAMPOS LM, CECON E, FERNANDES PA, BITTENCOURT JC, MARKUS RP. Selective protection of the cerebellum against intracerebroventricular LPS is mediated by local melatonin synthesis. *Brain Struct Funct.* 220(2): 827-40, 2015.

PIRES-LAPA MA, TAMURA EK, SALUSTIANO EM, MARKUS RP. Melatonin synthesis in human colostrum mononuclear cells enhances dectin-1-mediated phagocytosis by mononuclear cells. *J Pineal Res.* 55(3): 240-6, 2013.

PLUMMER LE, SMILEY-JEWELL S, PINKERTON KE. Impact of air pollution on lung inflammation and the role of Toll like receptors. *Int J Interferon Cytokine Mediator Res.* 4(2): 43-57, 2012.

POEGGELER B, THUERMANN S, DOSE A, SCHOENKE M, BURKHARDT S, HARDELAND R. Melatonin's unique radical scavenging properties - roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. *J Pineal Res.* 33(1): 20-30, 2002.

POEGGELER B, SAARELA S, REITER RJ, TAN DX, CHEN LD, MANCHESTER LC, BARLOW-WALDEN LR. Melatonin--a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann N Y Acad Sci.* 738: 419-20, 1994.

PONTES GN, CARDOSO EC, CARNEIRO-SAMPAIO MM, MARKUS RP. Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF-alpha

increase after cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. *J Pineal Res.* 43(4): 365-71, 2007.

PONTES GN, CARDOSO EC, CARNEIRO-SAMPAIO MM, MARKUS RP. Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) - melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. *J Pineal Res.* 41(2): 136-41, 2006.

PROVENCIO I, RODRIGUEZ IR, JIANG G, HAYES WP, MOREIRA EF, ROLLAG MD. A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci.* 20(2): 600-5, 2000.

QUAN N, BANKS WA. Brain-immune communication pathways. *Brain Behav Immun.* 21(6): 727-35, 2007

RAFII-EL-IDRISSI M, CALVO JR, POZO D. Specific binding Bof 2-[125I] iodomelatonin by rat splenocytes: characterization and its role on regulation of cyclic AMP production. *J Neuroimmunol* 57: 171-178, 1995.

REITER, J.R. Melatonin: Lowering the high price of free radicals. *New Physiol Sci* 15: 246-250, 2000.

REITER RJ. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Braz J Med Biol Res.* 26(11): 1141-55, 1993.

REITER RJ. The mammalian pineal gland: structure and function. *Am J Anat.* 162(4): 287-313, 1981.

REPPERT SM, WEAVER DR, EBISAWA T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron.* 13(5): 1177-85, 1994.

REPPERT SM, WEAVER DR, CASSONE VM, GODSON C, KOLAKOWSKI LF JR. Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron*. 15(5): 1003-15, 1995.

RIEGER AM, NELSON KL, KONOWALCHUK JD, BARREDA, DR. Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. *J Vis Exp*. (50): 259, 2011.

RISOM L, MØLLER P, LOFT S. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res*. 592(1-2): 119-37, 2005.

ROSEBOOM PH, COON SL, BALER R, MCCUNE SK, WELLER JL, KLEIN DC. Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinol* 137(7): 3033-45, 1996.

RÜCKER J, STÜKEN A, NIXDORF B, FASTNER J, CHORUS I, WIEDNER C. Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin in 21 Aphanizomenon-dominated temperate lakes. *Toxicon*. 50(6): 800-9., 2007.

SAWYER K, MUNDANDHARA S, GHIO AJ, MADDEN MC. The effects of ambient particulate matter on human alveolar macrophage oxidative and inflammatory responses. *J Toxicol Environ Health A*. 73(1): 41-57, 2010.

SEN R , BALTIMORE D.. Inducibility of K immunoglobulin enhancer-binding protein NF-KB by a posttranslational mechanism. *Cell* 47: 921-928, 1986.

SERIANI, R, JUNQUEIRA MS, CARVALHO-SOUSA CE, ARRUDA AC, MARTINEZ D, ALENCAR AM, GARIPPO AL, BRITO JM, MARTINS MA, SALDIVA PH, NEGRI EM, MAUAD T, MACCHIONE M. Enriched inorganic compounds in diesel exhaust particles induce mitogen-activated protein kinase activation, cytoskeleton instability, and cytotoxicity in human bronchial epithelial cells. *Exp Toxicol Pathol*. 2015.

SHOENFELT J, MITKUS RJ, ZEISLER R, SPATZ RO, POWELL J, FENTON MJ, SQUIBB KA, MEDVEDEV AE. Involvement of TLR2 and TLR4 in inflammatory immune responses induced by fine and coarse ambient air particulate matter. *J Leukoc Biol*. 86(2): 303-12, 2009.

SIBILLE Y, REYNOLDS HY. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis* 141:471–501, 1990.

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*. 55(2): 325-95, 2003.

SKWARLO-SONTA K, MAJEWSKI P, MARKOWSKA M, OBLAP R, OLSZANSKA B. Bidirectional communication between the pineal gland and the immune system. *Can J Physiol Pharmacol*. 81(4): 342-9, 2003.

SLOMINSKI A, TOBIN DJ, ZMIJEWSKI MA, WORTSMAN J, PAUS R. Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. *Trends Endocrinol Metab*. 19(1): 17-24, 2008.

SLOMINSKI A, BAKER J, ROSANO TG, GUISTI LW, ERMAK G, GRANDE M, GAUDET SJ. Metabolism of serotonin to N-

acetylserotonin, melatonin, and 5-methoxytryptamine in hamster skin culture. *J Biol Chem.*, 271(21): 12281-6, 1996.

SIOUTAS C, KOUTRAKIS P, FERGUSON ST. Development and evaluation of a prototype ambient particle concentrator for inhalation exposure studies. *Inhalation Toxicology*; 7: 633-644, 1995.

SIOUTAS C, KOUTRAKIS P, GODLESKI JJ, FERGUSON ST, KIM CS, BURTON RM. Fine particles concentrators for inhalation exposures. Effect of particle size and composition. *Journal of Aerosol Science*; 28: 1057-1071, 1997.

SOUKUP JM, BECKER S. Human alveolar macrophage responses to air pollution particulates are associated with insoluble components of coarse material, including particulate endotoxin. *Toxicol Appl Pharmacol.* 171(1): 20-6, 2001.

TAKEDA K, AKIRA S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol.* 16(1): 3-9, 2004.

TAMURA EK, FERNANDES PA, MARÇOLA M, DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO S, MARKUS RP. Long-lasting priming of endothelial cells by plasma melatonin levels. *PLoS One.* 5(11): e13958, 2010.

TAN DX, HARDELAND R, MANCHESTER LC, PAREDES SD, KORKMAZ A, SAINZ RM, MAYO JC, FUENTES-BROTO L, REITER RJ. The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 85(3): 607-23, 2010.

TAN DX, MANCHESTER LC, SANCHEZ-BARCELO E, MEDIIVILLA MD, REITER RJ. Significance of high levels of endogenous melatonin

in Mammalian cerebrospinal fluid and in the central nervous system. *Curr Neuroparmacol.* 8(3): 162-7, 2010.

TAN DX, MANCHESTER LC, REITER RJ, QI WB, ZHANG M, WEINTRAUB ST, CABRERA J, SAINZ RM, MAYO JC Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochim Biophys Acta.* 1472(1-2): 206-14, 1999.

TAKENAKA K, SHINAGAWA K, MAEDA Y, MAKITA M, KOZUKA T, ASHIBA A, YAMAMOTO K, FUJII N, NAWA Y, HIRAMATSU Y, SUNAMI K, ISHIMARU F, YOSHIMO T, KIURA K, HARADA M. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem cell transplantation is effective for nasal and nasal-type CD56+ natural killer cell lymphomas. *Leuk Lymphoma.* 42(6): 1297-303, 2001.

TECLEMARIAM-MESBAH R, TER HORST GJ, POSTEMA F, WORTEL J, BUIJS RM. Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway. *J Comp Neurol.* 406(2): 171-82, 1999.

TSAI SY, MCNULTY JA. Interleukin-1beta expression in the pineal gland of the rat. *J Pineal Res.* 27(1): 42-8, 1999.

TSAI SY, SCHLUNS KS, LE PT, MCNULTY JA. TGF-beta1 and IL-6 expression in rat pineal gland is regulated by norepinephrine and interleukin-1beta. *Histo Histopathol.* 16(4): 1135-41, 2001.

TSAI SY, O'BRIEN TE, MCNULTY JA. Microglia play a role in mediating the effects of cytokines on the structure and function of the rat pineal gland. *Cell Tissue Res.* 303(3): 423-31, 2001

VALLABHAPURAPU S, KARIN M. Regulation and function of NFkappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 27: 693-733, 2009.

VAN BERLO D, KNAAPEN AM, VAN SCHOOTEN FJ, SCHINS RP, ALBRECHT C. NF-kappaB dependent and independent mechanisms of quartz-induced proinflammatory activation of lung epithelial cells. *Part Fibre Toxicol.* 21, 7:13, 2010.

VAN EEDEN SF, TAN WC, SUWA T, MUKAE H, TERASHIMA T, FUJII T, QUI D, VINCENT R, HOGG JC. Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM(10)). *Am J Respir Crit Care Med.* 164(5): 826-30, 2001.

VERMYLEN J, NEMMAR A, NEMERY B, HOYLAERTS MF. Ambient air pollution and acute myocardial infarction. *J Thromb Haemost.* 3(9): 1955-61, 2005.

VOLLMAR P, KULLMANN JS, THILO B, CLAUSSEN MC, ROTHHAMMER V, JACOBI H, SELLNER J, NESSLER S, KORN T, HEMMER B. Active immunization with amyloid-beta 1-42 impairs memory performance through TLR2/4-dependent activation of the innate immune system. *J Immunol.* 185(10): 6338-47, 2010.

XIA MZ, LIANG YL, WANG H, CHEN X, HUANG YY, ZHANG ZH, CHEN YH, ZHANG C, ZHAO M, XU DX, SONG LH. Melatonin modulates tlr4-mediated inflammatory genes through myd88- and trif-dependent signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated raw 264.7 cells. *J. Pineal Res.* 53, 325-334, 2012.

WAN F, LENARDO MJ. The nuclear signaling of NF-kappaB: current knowledge, new insights, and future perspectives. *Cell Res.* 20(1): 24-33, 2010.

WICHMANN HE. Diesel exhaust particles. *Inhal Toxicol.* 1: 241-4, 2007.

WICHMANN HE, PETERS A .Epidemiological evidence of the effects of ultrafine particle exposure, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A*, 358: 2751–2769, 2000.

WILLIAMS MA, CHEADLE C, WATKINS T, TAILOR A, KILLEDAR S, BREYSSE P, BARNES KC, GEORAS SN. TLR2 and TLR4 as Potential Biomarkers of Environmental Particulate Matter Exposed Human Myeloid Dendritic Cells. *Biom Ins.* 30; 2:226-40, 2007.

WITHYACHUMNARNKUL B, NONAKA KO, SANTANA C, ATTIA AM, REITER RJ. Interferon-gamma modulates melatonin production in rat pineal glands in organ culture. *J Interferon Res.* 10(4): 403-11, 1990.

WITT-ENDERBY PA, BENNETT J, JARZYNKA MJ, FIRESTINE S, MELAN MA. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci.* 72(20): 2183-98, 2003.

WURTMAN RJ, AXELROD J, CHU EW, HELLER A, MOORE RY. Medial forebrain bundle lesions: blockade of effects of light on rat gonads and pineal. *Endocrinol.* 81(3): 509-14, 1967.

ZHAO C, LIAO J, CHU W, WANG S, YANG T, TAO Y, WANG G. Involvement of TLR2 and TLR4 and Th1/Th2 shift in inflammatory responses induced by fine ambient particulate matter in mice. *Inhal Toxicol.* 24(13): 918-27, 2012.

ZHOU H., ANDONEGUI G., WONG CH., KUBES P.. Role of endothelial TLR4 for neutrophil recruitment into central nervous system microvessels in systemic inflammation. *J Immunol.* 183: 5244-5250, 2009.

ZMIJEWSKI MA, SWEATMAN TW, SLOMINSKI AT. The melatonin-producing system is fully functional in retinal pigment epithelium (ARPE-19). *Mol Cell Endocrinol.* 307(1-2):211-6, 2009.

ZYLIŃSKA K, KOMOROWSKI J, ROBAK T, MUCHA S, STEPIEŃ H. Effect of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and granulocyte colony stimulating factor on melatonin secretion in rats in vivo and in vitro studies. *J Neuroimmunol.* 56(2): 187-90, 1995.

Curriculum vitae

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Doutorado em Fisiologia- 6 meses de estágio

Instituto Weizmann, em Rehovot, Israel, abril-setembro de 2014

Projeto: O papel da melatonina sobre o ritmo circadiano de células tronco hematopoiéticas

Colaborador: Tsvee Lapidot

Bolsa de: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Doutorado em Fisiologia Geral

Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Título: Eixo Imune Pineal: Efeito da poluição atmosférica de São Paulo sobre a função pineal

Orientadora: Regina Pekelmann Markus

Agência de Fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

04/2011- 04/2014

Mestrado em Fisiologia

Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Título: Caracterização do Eixo Imune-Pineal: efeito da citocina pró-inflamatória TNF sobre a função pineal.

Orientadora: Regina Pekelmann Markus

Agência de Fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

12/2008 – 03/2011

Licenciatura em Ciências Biológicas

Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz De Fora, Brasil

03/2005 – 12/2008

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Cursos de curta duração

1. **Mini-curso: Apoptosis in the immune system**

Departamento de Imunologia

Instituto de Ciências Biomédicas

Universidade de São Paulo

Período: 23-27 março de 2009

2. **Curso de processamento de imagens com o programa Image J**

XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology

Julho 2010

Carga Horária: 18h

3. **Writing a Scientific Paper: Theory and Practice**

Sociedade Brasileira de Farmacologia e terapêutica experimental

18 a 21 de outubro de 2010

Carga Horária: 12 horas

4. **Mini-curso: Glia**

XV Encontro da Sociedade Brasileira de Biologia Celular

São Paulo, Brasil

2010

Carga Horária: 12 horas

5. **Curso de redação científica**

Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo

Março, 2013

Carga horária: 16 horas

6. **Confocal and Fluorescence Microscopy and Principles**

IB-USP, Leica.

Carga Horária : 8 horas

Cursos de Longa Duração

1. Communication and Fluency in English in advanced level

Number One Idiomas

Abaeté-MG

Duração: 2001 - 2004

2. IV Curso de Inverno- Tópicos em Fisiologia Comparativa

Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências

Universidade de São Paulo (USP)

Duração: 10 a 27/07/2007

Carga Horária: 80h

3. XVII Curso de Verão em Fisiologia e Farmacologia “Prof. Wilson Teixeira Beraldo”

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Duração: 14 a 25/01/2008

Carga Horária: 80h

4. Curso “Desenho Experimental e Determinação Amostral com Animais de Laboratório”

Centro de Biologia da Reprodução

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Adela Rosenkranz- Universidade de Buenos Aires, Argentina

Carga Horária: 40h

5. Curso “Microscopia Avançada”

Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Rio de Janeiro, Brasil

Carga Horária: 45 horas

PRÊMIOS E HONRARIAS

2012 – Finalista do Concurso Images of Life Sciences. ICB-USP e Carl Zeiss Brasil, São Paulo.

2011 – Menção honrosa pelo trabalho: Why to consider the pineal gland a sensor and player in the inflammation responses. 3º INF Summer School in

Neuroendocrinology.

2010 - Menção honrosa pelo trabalho: Pineal gland expresses TNFR1 in a constitutive and rhythmic manner. Conferência da Sociedade Brasileira de Biologia Celular (SBBC). São Paulo, SP, Brasil.

2009 - Menção honrosa pelo trabalho: TNF induces iNOS expression by pineal cells through a mechanism dependent of NF- κ B. Sociedade Brasileira de Farmaceutica e Terapeutica experimental, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

2006 - Menção honrosa pelo trabalho Death Behaviour (Thanatoethology) in fishes from the Santana Formation (Lower Cretaceous, Northeast Brasil) XXIV Encontro Anual de Etologia , Brasília, DF, Brasil

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigos publicados em periódicos indexados

1. Enriched inorganic compounds in diesel exhaust particles induce mitogen-activated protein kinase activation, cytoskeleton instability, and cytotoxicity in human bronchial epithelial cells. Seriani R, Junqueira MS, **Carvalho-Sousa CE**, Arruda AC, Martinez D, Alencar AM, Garippo AL, Brito JM, Martins MA, Saldiva PH, Negri EM, Mauad T, Macchione M. *Exp Toxicol Pathol.*, 2015 (In Press). doi:10.1016/j.etp.2015.02.004

2. Da Silveira Cruz-Machado S, Pinato L, Tamura EK , **Carvalho-Sousa, C. E.**, Markus, R. P (2012). Glia-pinealocyte network: the paracrine modulation of melatonin synthesis by tumor necrosis factor (TNF). *PloS One*, e40142, 2012.

3 **Carvalho-Sousa, Claudia Emanuele**, Cruz-Machado, Sanseray da Silveira, Tamura, Eduardo Koji, Fernandes, Pedro A. C. M., Pinato, Luciana, Muxel, Sandra M., Cecon, Erika, Markus, Regina P. Molecular basis for defining the pineal gland and pinealocytes as targets for tumor necrosis factor. *Frontiers in Cellular Endocrinology.* , v.2, p.1 – 11, 2011.

4. Da Silveira Cruz-Machado, Sanseray, **Carvalho-Sousa, C. E. C.**, Tamura, Eduardo Koji, Pinato, Luciana, Cecon, Erika, Fernandes, Pedro Augusto Carlos Magno, De Avellar, Maria Christina Werneck, Ferreira, Zulma Silva,

Markus, Regina Pekelmann. TLR4 and CD14 receptors expressed in the rat pineal gland triggers NFkB pathway. *Journal of Pineal Research*. 49: 183–192, 2010.

5. Carvalho-Sousa, Claudia Emanuele, Motta-Teixeira, L.C., Souza, F.T., Peters, V.M. Sex ratio off offspring and weight development of Young rats. *Interdisciplinary Journal of Experimental Studies*, v.1, p.82 – 84, 2009.

6. Sousa, C. E. C., Tamura, E.K, Cruz-Machado, S. S. The circadian rhythms and reproduction in mammals. *Boletim do Centro da Biologia da Reprodução.* , v.26, p.15 -21, 2008.

COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS

Apresentação oral

1- Carvalho-Sousa C.E, Pereira, E, Muxel, S.M, Fernandes, P.A.C.M, Saldiva, P.H and Markus, R.P. (FASEB) Melatonin Biology: Actions & Therapeutics. Niagara Falls, New York, USA, 2013.

2- Carvalho-Sousa C.E, Pereira, E.P, Tamura, E.K, Muxel, S.M, Saldiva, P.H and Markus, R.P. Air pollution impairs the activity of Pineal Gland (PG). 42nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans, USA, 2012.

3- Aula ministrada no VI Curso de Inverno: Tópicos Avançados de Fisiologia

Tema: Introdução à Cronobiologia

Instituto de Biociências

Julho/2009

4- Aula ministrada no VI Curso de Inverno: Tópicos Avançados de Fisiologia

Tema: Melatonina a hora e a vez de uma molécula multifacetada

Instituto de Biociências

Julho/2011

5- Aula ministrada no VI Curso de Inverno: Tópicos Avançados de Fisiologia

Tema: Melatonina e suas múltiplas ações

Instituto de Biociências

Julho/2012

6- Aula ministrada no VI Curso de Inverno: Tópicos Avançados de Fisiologia

Tema: Ações múltiplas do hormônio do sono

Instituto de Biociências

Julho/2013

APRESENTAÇÃO DE POSTER

1. Carvalho-Sousa C.E, Muxel, S.M, Nunes, F.P, Martins, J.O Saldiva, P.H e Markus. Melatonin regulates phagocytosis, production of cytokines and survival of macrophages exposed to environmental diesel particles. SBI, 2014.

2 Carvalho-Sousa C.E, Pereira, E, Muxel, S.M, Fernandes, P.A.C.M, Saldiva, P.H and Markus, R.P. (FASEB) Melatonin Biology: Actions & Therapeutics. Niagara Falls, New York, USA, 2013 .

3. Carvalho-Sousa C.E, Pereira, E.P, Tamura, E.K, Muxel, S.M, Saldiva, P.H e Markus, R.P. Air pollution impairs the activity of Pineal Gland (PG). 42nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans, USA, 2012.

4. Carvalho-Sousa C.E, Muxel, S.M, Stranieri, A, Macchione, M, Saldiva, P.H, Markus, R.P. Diesel particles (DEP) induce melatonin synthesis by macrophages through NF-kB activation. 10th International Congress on Cell Biology, Rio de Janeiro, Brasil, 2012.

5. Carvalho-Sousa, Claudia Emanuele ; Da Silveira Cruz-Machado, Sanseray ; Fernandes, Pedro A. C. M. ; Tamura, E.K ; Muxel, Sandra M.; Cecon, Erika ; Markus, Regina P. Regulation of pineal gland melatonin synthesis by distinct NF-KB dimers. XXVI Annual Meeting of the Brazilian Federation of Experimental Biology Societies (FeSBE), Rio de Janeiro, Brasil,

2011.

6. Souza, G.; Teodoro, L.H.S.; Garcia, L.A.; Petrilli, C.L. **Carvalho- Sousa, C.E** Fernandes,P.A.C.M.; Markus, R.P.; Ferreira, Z.S. Effect of purinergic stimulation on TNF release in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated rat pinealgland. II Meeting of the Brazilian Purine Club, Rio de Janeiro, Brasil, 2011.

7. Da Silveira Cruz-Machado, Sanseray; **Carvalho-Sousa, Claudia Emanuele**; Tamura, E.K; Pinato, L.; Markus, Regina P . Microglia mediates LPS-induced TNF production through NF-KB pathway: a paracrine modulation of melatonin synthesis. FASEB Summer Research Conferences Melatonin Receptors: Actions and Therapeutics. Snowmass Village, CO, USA, 2011.

8. Da Silveira Cruz-Machado, Sanseray; **Sousa, C. E. C.**; Pinato, Luciana ; Tamura, E.K; Fernandes, Pedro A. C. M. Why to consider the pineal gland a sensor and player in the inflammation responses. III Summer School in Neuroendocrinology - International Neuroendocrine Federation. Ribeirão Preto, Brasil, 2011.

9. Cruz-Machado, S. S; Pinato, L.; **Carvalho-Sousa, C.E.**, Tamura, E.K.; Ferreira, Z.S; markus, R.P . Signaling transduction pathway involved in LPS-induced suppression of melatonin production by rat pineal gland. In: 42nd Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2010.

10. **Carvalho-Sousa, C. E.**; Cruz-Machado, S. S; Fernandes, P.A.C.M ; Tamura, E.K. ; Pinato, L.; Petrilli, C. L.; Markus, R.P . Pineal gland is instrumented to be an integral player of innate immune response. In: 42nd Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2010.

11. Cruz-Machado, S.S; Pinato, L.; **Carvalho-Sousa, C. E.**; Tamura, E.K.; Ferreira, Z.S; Markus, R.P. Evidences for glia-pinealocytes interaction in cultured rat pineal gland. In: XV Meeting of the Brazilian Society for Cell

Biology. São Paulo, SP, 2010.

12. Carvalho-Sousa, C. E. ; Cruz-Machado, S.S; Pinato, L.; Tamura, E.K.; Fernandes, P.A.C.M; Markus, R.P . Pineal gland expresses TNFR1 in a constitutive and rhythmic manner. In: XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, São Paulo, SP, 2010.

13. Petrilli, C.L Sousa, C. E. C.; Muxel, S.M.; Markus, R.P.; Ferreira, Z.S. P2Y1 receptors stimulation on rat pineal glands: effects on nuclear factor kappa b pathway (NF-KB) and inducible nitric oxide synthase (iNOS). In: 42nd Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2010.

14. Sousa, C. E. C. Fernandes, Pedro Augusto Magno; Tamura, E.K; Petrilli, Camila Lopes; Markus, R.P.M . TNF induces iNOS expression by pineal cells through a mechanism dependent of NF- κ B. In: 41nd Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2009.

MONITORIAS

1. **Disciplina: Zoologia dos Invertebrados I**

Prof^a Sueli de Souza Lima

Departamento de Zoologia do Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Juiz de Fora

Período: 2º sem./2006 (bolsista) e 1º sem./2007

2. **Disciplina: Biofísica**

Prof. Sérgio Luiz Schmidt

Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Juiz de Fora

Período: 2º sem./2006

3. **Programa de Preparação Pedagógica - Fisiologia para o Ensino Médio (PAE)**

Prof^a. Responsável: Regina Pekelmann Markus

Departamento de Fisiologia
Universidade de São Paulo
Período: 1º sem./2010

4. Programa de Preparação Pedagógica - Ensino de Ciências (PAE)

Prof. Responsável: Hamilton Haddad Junior
Departamento de Fisiologia
Universidade de São Paulo
Período: 2º sem./2012

ESTÁGIOS

1. Estágio Curricular I em Zoologia/ Iniciação Científica

Projeto: Paleoartropodofauna do Cretáceo Brasileiro
Orientador: Rafael Gioia Martins Neto
Programa de Pós - Graduação em Biologia e Comportamento Animal
Universidade Federal de Juiz de Fora
Período: 10/2005 a 10/2007

2. Bolsista do Programa de Treinamento Profissional em Biologia da Reprodução

Projeto: Treinamento Profissional em boas práticas aplicadas às atividades de Biotério do Centro de Biologia da Reprodução.
Orientadora: Vera Maria Peters
Centro de Biologia da Reprodução
Universidade Federal de Juiz de Fora
Período: 04/2007 a 03/2008

3. Estágio Curricular II em Biologia da Reprodução

Tema: Fatores que interferem no desenvolvimento pós-Natal de crias de ratos Wistar
Orientadora: Vera Maria Peters
Centro de Biologia da Reprodução
Universidade Federal de Juiz de Fora
Período: 03/2008 – 07/2008

4. Estágio de Férias em Cronofarmacologia

Projeto: Estudo do Eixo Imune-Pineal

Orientadora: Regina P. Markus
Laboratório de Cronofarmacologia
Departamento de Fisiologia - IB
Universidade de São Paulo-USP
Período: Fevereiro de 2008; Julho de 2008

5. Bolsista do Programa de Treinamento Profissional em Morfologia

Projeto: Treinamento Profissional em Práticas e Técnicas em Histologia

Orientador: Rogério Estevam Farias

Departamento de Morfologia

Universidade Federal de Juiz de Fora

Período: 05/2008 a 12/2008

ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS /ATIVIDADES COMPLEMENTARES

1. Comissão Organizadora da I Mostra de Paleobiodiversidade

Duração: 16 a 20 de outubro de 2006

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Juiz de Fora

2. Palestras Proferidas

Tema: Morfofisiologia e Ecologia de Rotíferos

Data: 2º sem. 2006; 1º e 2º sem 2007; 1º sem 2008

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Juiz de Fora

3. Participação de Grupo de Discussão

Tema: Como ensinar Genética no Ensino Médio

Disciplina Optativa: Instrumentação em genética

Instituto de Ciências Biológicas- UFJF

Departamento de Biologia

Data: 1º sem/ 2008

4. . Comissão Organizadora do VII Curso de Inverno: Tópicos em Fisiologia Comparativa

Duração: 5 a 23 de julho, 2010.

CARVALHO DE SOUSA, C. E. **Efeito da poluição atmosférica de São Paulo sobre o Eixo Imune-Pineal**. São Paulo. 2015. 175 f. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2015.

ERRATA

Página	Linha	Onde se lê	Leia-se
89	2; 3; 5	células RAW 264.7	glândulas pineais
99	6	de 3-4 glândulas por ponto	-