Daiane Gil Franco

Modulação da Produção de Óxido
Nítrico por Melatonina em Cultura de
Células de Cerebelo

São Paulo
2010

Daiane Gil Franco

Modulação da Produção de Óxido
Nítrico por Melatonina em Cultura de
Células de Cerebelo

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

Orientadora: Regina Pekelmann Markus

São Paulo
2010

Ficha Catalográfica

F825m

Franco, Daiane Gil

Modulação da produção de óxido nítrico
por melatonina em cultura de células de cerebelo
112 p. : Il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Fisiologia, 2010.

1. Melatonina 2. Células Granulares 3.
Cerebelo 4. Óxido nítrico I. Universidade de São
Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de
Fisiologia II. Título.

LC: QP 572.M44

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

Aos meus pais

*“E aqueles que foram vistos dançando foram julgados insanos por aqueles que não
podiam ouvir a música”*

Friedrich Nietzsche

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e viver com ousadia. Pois o triunfo pertence a quem se atreve e a vida é muito bela para ser insignificante”

Charles Chaplin

Agradecimentos

Pela existência de cada um em minha vida, quero agradecer:

À minha mãe, minha alma gêmea. Seu amor incondicional, sua fé e sua dedicação são os maiores privilégios da minha vida. Amiga para todos os momentos.

Ao meu pai, meu exemplo. Na sua coragem e na sua força me espelho para vencer os obstáculos de cada dia. Na sua generosidade me inspiro para ser alguém melhor.

Às minhas irmãs, presentes do destino. Viviane, por ser sempre a primeira a trilhar os caminhos e dar o exemplo. Stéfanie, por seu espírito criativo e pelas grandes gargalhadas.

Ao Júlio, amor que escolhi. Ao seu lado sou alguém melhor. Aprendi que amar é entregar, compreender, ganhar e perder. Um desejo de fazer o outro sentir a felicidade daquele que ama.

À minha madrinha (Tia Lú) que, mesmo distante, se preocupa e cuida de todos.

Aos meus cunhados, Rodrigo e Gabriel, pelos dias agradáveis em família.

À família do Júlio. Nivaldo, dona Orilda, Victor e dona Marfy, pelo carinho com o qual me recebem em suas casas.

À querida Erika, pela amizade pura e verdadeira. De você vou guardar as coisas mais especiais dos tempos de graduação, do trabalho no laboratório, nas caronas para casa e, é claro, nas festas e momentos de descontração.

Aos amigos mais que especiais: Pedro, com sua alegria contagiante e Eduardo, inteligente e sempre pronto a ajudar.

À professora Zulma, por sua colaboração em vários momentos e sua imensurável paciência.

À Débora, pela colaboração técnica e pelos papos divertidos.

À minha orientadora Regina, admirável por seus conhecimentos e competência. Nos ensina a crescer, com a dedicação de quem faz aquilo que ama.

A todos os demais amigos que estão ou um dia estiveram no laboratório: Camila, Sanseray, Marco Antônio, Marina, Kelly, Ariana, Sandra, Renato, Luciana, Claudinha, Alex, Janaína, Cecília, Cris, Cláudia, Lidiana, Jéssica, Cintia, Gustavo, Livia e Livingstone.

Aos amigos Leonardo, Márcio, Natália, Tchellão, Bruno, Ramira, Lucas, Larissa, Fábio, Gisele, Nelsinho e a todos do grupo Ibis.

A todos os demais amigos e funcionários da Biologia e do departamento de Fisiologia.

Aos professores que um dia tive a oportunidade de encontrar e que, com certeza, participaram da minha formação.

À Dra. Merari de Fátima Ramires Ferrari e ao Dr. Daniel Carneiro Carrettiero pela ajuda na realização da cultura de células de cerebelo e da imunocitoquímica, respectivamente.

A todos que leram e contribuíram para a construção dessa dissertação (novamente): Zulma, Eduardo, Pedro e Regina.

À FAPESP (07/06423-0), CAPES e CNPq, pelo fundamental apoio científico e financeiro.

E, sobretudo, agradeço à vida e a Deus.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
1. MELATONINA	2
1.1 - Síntese de Melatonina pela Pineal.....	2
1.2 - Síntese Extrapineal de Melatonina.....	6
1.3 - Mecanismos de Ação e Efeitos da Melatonina.....	7
2 - ÓXIDO NÍTRICO COMO AGENTE SINALIZADOR.....	13
2.1 - Sintases de Óxido Nítrico.....	16
2.2 - Modulação da Atividade das Sintases de Óxido Nítrico por Melatonina	20
3 - FATOR DE TRANSCRIÇÃO NFKB	22
3.1 - Aspectos Gerais	22
3.2 - Ação da Melatonina Sobre a Via do Fator de Transcrição NFKB.....	25
OBJETIVO	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
MATERIAL E MÉTODOS	29
1. ANIMAIS	30
2. DROGAS E REAGENTES	30
3. PREPARO DE DROGAS.....	32
4. CULTURAS DE CÉLULAS DE CEREBELO.....	33
5. IMUNOCITOQUÍMICA	34
5.1 Identificação dos tipos celulares.....	34
5.2 Expressão da enzima iNOS.....	36
5.3 Expressão do receptor TLR-4.....	37
6. ANÁLISE DA TRANSLOCAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR NFKB	37
6.1 Extração Protéica Nuclear	37
6.2 Ensaio de Eletromobilidade em Gel (EMSA)	38
7. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE Ca ²⁺ INTRACELULAR ATRAVÉS DE MICROSCOPIA CONFOCAL.....	40

8. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO ATRAVÉS DE MICROSCOPIA CONFOCAL.....	41
8.1 - Curva Cumulativa de ACh.....	41
8.2 - Decurso Temporal a Agonistas (ACh e BK)	41
8.3 - Produção de Óxido Nítrico Ativado por LPS	42
9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
RESULTADOS.....	44
1. CARACTERIZAÇÃO DA CULTURA	45
2 - MELATONINA INIBE A NOS CONSTITUTIVA	46
2.1 - Melatonina Inibe a Produção de NO Induzida por BK e ACh	46
2.2 - Melatonina inibe o influxo de Ca ²⁺ intracelular induzida por ACh.....	51
3 - MELATONINA INIBE A iNOS INDUZIDA POR LPS	52
3.1 - Expressão do Receptor Toll-like 4 na Cultura de Células de Cerebelo.....	53
3.2 - Fator de transcrição NFκB	54
3.2.1 - Identificação das Subunidades do Fator de Transcrição NFκB Presentes na Cultura de Células de Cerebelo.....	54
3.2.2 Efeito da Melatonina Sobre a Translocação do Fator de Transcrição NFκB Induzido por LPS	56
3.3 - Efeito da Melatonina Sobre a Expressão da Enzima iNOS Induzida por LPS	57
3.4 - Efeito da Melatonina Sobre a Produção de NO Induzida por LPS	59
DISCUSSÃO	61
1 - CARACTERIZAÇÃO DA CULTURA.....	62
2 - MELATONINA MODULA ATIVIDADE DA NOS CONSTITUTIVA	63
3 - MELATONINA MODULA ATIVIDADE DA iNOS.....	66
CONCLUSÕES.....	71
RESUMO.....	73
ABSTRACT	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
SÚMULA CURRICULAR.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS

α -BTX	α -bungarotoxina
β A	peptídeo β -amilóide
5-HIAA	ácido 5-hidroxindolacético
5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
5-HTP	5-hidroxitriptofano
AAAD	descarboxilase de aminoácido aromático
AA-NAT	arilalquilamina-N-acetiltransferase
AC	adenilil ciclase
ACh	acetilcolina
AChRs	receptores colinérgicos
AFMK	N ¹ -acetil-N ² -formil-5-metoxiquinuramina
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ATP	adenosina trifosfato
B ₁	receptor de bradicinina do subtipo 1
B ₂	receptor de bradicinina do subtipo 2
BK	bradicinina
BSA	albumina sérica bovina
Ca ²⁺	cálcio
CaMK	proteína quinase dependente de calmodulina
CaMKII	proteína quinase II dependente de calmodulina
CREB	element de DNA ligador de AMPc (<i>cyclic AMP response element binding</i>)
DAF-FM	4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína
DAPI	4'-6-Diamidino-2-fenilindol
DAR-4M-AM	Diaminorhodamina-4M AM, 3',6'-Bis(dimetilamino)-9-[2-acetometoxicarbonil-3-amino-4-(N-metilamino)fenilxantilium iodado
DMEM	meio Dulbecco's modificado de Eagle
DMSO	dimetil sulfoxide
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	ditiotreitól
e.p.m.	erro padrão da média

EDRF	<i>endothelium-derived relaxing factor</i>
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
EMSA	ensaio de eletromobilidade em gel
eNOS	sintase de óxido nítrico endotelial
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
FITC	fluoresceína isotiocianetada
GCs	guanilil ciclase solúvel
GFAP	proteína fibrilar ácida de glia
GMPc	guanosina monofosfato cíclico
G _s	proteína G estimulatória
h	hora
HeNe	laser de neon de hélio
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfónico
HIOMT	hidroxi-indol-O-metiltransferase
HPA	heixo pituitária-adrenal/ eixo hipófise-adrenal
HSP	proteína de choque térmico
IAPs	proteína inibitória de apoptose
IFN γ	interferon - γ
IKB	proteína inibitória kappa B
IKK	IkappaB quinase
IL-1b	interleucina 1b
IL-2	interleucina 2
IL-6	interleucina 6
iNOS	sintase de óxido nítrico induzível
IP ₃	inositol trifosfato
LPS	lipopolissacarídeo constituinte de bactéria Gram-negativa
mAChRs	receptores colinérgicos muscarínicos
MAO	monoamino oxidase
MAP2	proteína associada ao microtúbulo 2
mg	miligrama
min.	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
MT ₁	receptor de melatonina do subtipo 1

MT ₂	receptor de melatonina do subtipo 2
MT ₃	receptor de melatonina do subtipo 3
NA	noradrenalina
nAChRs	receptores colinérgicos nicotínico
NAS	N-acetilserotonina
NFKB	fator nuclear kappa B
ng	nanograma
NGF	fator de crescimento neuronal
NGS	soro caprino normal
NLS	sinal de localização nuclear
nM	nanomolar
NMDA	n-metil-D-aspartato
nNOS	sintase de óxido nítrico neuronal
NO	óxido nítrico
NOS	sintase de óxido nítrico
NOS1	sintase de óxido nítrico 1
NOS2	sintase de óxido nítrico 2
NOS3	sintase de óxido nítrico 3
NP40	nonil fenoxilpolietoxietanol
NR1F1	receptor nuclear da subfamília 1, grupo F, membro 1
NR1F2	receptor nuclear da subfamília 1, grupo F, membro 2
NR1F3	receptor nuclear da subfamília 1, grupo F, membro 3
NSQs	núcleos supraquiasmáticos
OH•	radical hidroxila
PBS	solução tampão fosfato
pD ₂	logaritmo negativo da concentração do agonista que promove 50% do efeito máximo
PDZ	<i>post-synaptic density protein, discs-large, ZO-1</i>
PIN	proteína inibitória de nNOS
PKAII	proteína quinase dependente de AMPc
PKC	proteína quinase dependente de Ca ²⁺
PKG	proteína quinase dependente de GMPc
PLC	fosfolipase C
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil

PPA	proteína precursora β -amilóide
PSD93	densidade pos-sináptica 93
PSD95	densidade pos-sináptica 90
QR2	quinona redutase 2
RHD	<i>Rel homology domain</i>
RNAm	ácido ribonucleico mensageiro
ROR	receptor órfão para retinóide
ROR α	receptor órfão para retinóide do subtipo α
RORA	receptor órfão para retinóide do subtipo A
RORB	receptor órfão para retinóide do subtipo B
RORC	receptor órfão para retinóide do subtipo C
ROR β	receptor órfão para retinóide do subtipo β
ROR γ	receptor órfão para retinóide do subtipo γ
RZR α	receptor Z para retinóide do subtipo α
RZR β	receptor Z para retinóide do subtipo β
seg.	segundo
SNC	sistema nervoso central
SNP	nitroprussiato de sódio
TAD	domínio de transativação
TBE	solução contendo Tris/Borato/EDTA
TNF	fator de necrose tumoral
TNF-R1	receptor 1 de TNF
TOR	receptor órfão do timo
TPH1	triptofano hidroxilase 1
V	volt

INTRODUÇÃO

1. MELATONINA

Em 1917 Carey P. McCord e Floyd P. Allen demonstraram que extrato de glândula pineal de boi é capaz de alterar a coloração da pele de anfíbio (*Rana pipiens*), por agregar os grânulos que contêm melanina (melanossomas) no interior dos melanóforos dermais. Mais tarde, Aaron B. Lerner, utilizou a pele de rã para montar um bioensaio seletivo para a substância fotossensível presente na glândula bovina, a qual deu o nome de melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (Lerner *et al.*, 1958). Esta molécula é uma indolamina derivada do aminoácido triptofano, produzida por diversos organismos como bactérias, protozoários, fungos, plantas, invertebrados e diversos locais extrapineais em vertebrados (retina, pele, trato gastrointestinal, glândula Harderiana e células imunocompetentes) (Pandi-Perumal *et al.*, 2006).

1.1 - Síntese de Melatonina pela Pineal

A produção de melatonina pela pineal é sincronizada pelo ciclo claro-escuro ambiental e, independentemente da espécie considerada, essa produção segue um padrão rítmico diário e sazonal, com um pico na fase escura. A principal regulação da atividade da pineal se dá pela via do trato retino-hipotalâmico. A informação fótica recebida pela retina é enviada através das fibras retino-hipotalâmicas aos núcleos supraquiasmáticos (NSQs), o oscilador endógeno em mamíferos. Os NSQs projetam-se sobre o núcleo paraventricular, que, através de uma via polissináptica, inerva os neurônios da coluna

intermédio-lateral da medula óssea. Desta, seguem projeções para o gânglio cervical superior que, através dos ramos carotídeo interno e nervos conários, projeta-se para a pineal (Simonneaux & Ribelayga, 2003).

Na fase de escuro, noradrenalina (NA) é liberada dos terminais simpáticos (Klein, 1985) e ativa adrenoceptores α_1 e β_1 . Em condições de hígidez, apenas os receptores β_1 são ativados (Tobin *et al.*, 2002), porém um aumento da atividade simpática pode induzir a liberação de concentrações de noradrenalina suficientes para ativar adrenoceptores α_1 (Sabban *et al.*, 2004; Serova *et al.*, 2008). Os adrenoceptores β_1 acoplam-se à proteína G estimulatória (G_s) e sua ativação resulta na produção de adenosina monofosfato cíclica (AMPc) pela adenilil ciclase (AC). O AMPc, por sua vez, ativa a proteína quinase dependente de AMPc do subtipo II (PKAII) (figura 1) (Simonneaux & Ribelayga, 2003). A estimulação do nervo conário pode levar também a liberação de adenosina trifosfato (ATP) (Mortani-Barbosa *et al.*, 2000), a qual interage com receptores purinérgicos, P2Y₁ e ativa a via dependente de inositol trifosfato (IP₃) (Ferreira *et al.*, 1994; Ferreira & Markus, 2001). A ativação dessa via leva a um aumento intracelular de cálcio (Ca^{2+}) (Ferreira *et al.*, 2003) e da atividade da proteína quinase dependente de Ca^{2+} (PKC). A PKC potencia a formação do AMPc por fosforilar a AC (Tzavara *et al.*, 1996).

Entre os mamíferos podemos distinguir dois grupos quanto à ativação da produção de melatonina na pineal: os de hábito noturno (ex.: roedores) e os de hábito diurno (ex.: primatas e ungulados) (figura 1). Em roedores PKAII fosforila o fator de transcrição CREB (do inglês, *cyclic AMP response element*

binding) que ativa a transcrição do RNA mensageiro (RNAm) da enzima arilalquilamina-N-acetiltransferase (AA-NAT) (Klein *et al.*, 1997; Coon *et al.*, 2001). Uma vez transcrita e traduzida, esta enzima é degradada pelo proteassoma 26S. A fosforilação da AA-NAT por PKAII favorece a interação com a proteína 14-3-3, tornando-a estável e expondo o sítio ativo. Portanto, em roedores, a ativação β_1 -adrenérgica sinaliza a transcrição do gene da AA-NAT, sua estabilização e ativação (Coon *et al.*, 2001; Gastel *et al.*, 1998; Ganguly *et al.*, 2001; Klein *et al.* 2002). Em primatas e ungulados, o gene *Aa-nat* é transcrito e traduzido constitutivamente, porém a proteína AA-NAT sofre processo contínuo de degradação pelo proteassoma 26S. A indução de sua atividade também depende da fosforilação pela PKAII e ligação com a proteína 14-3-3, obtida através da ativação simpática na fase de escuro. Em ambos os grupos, a enzima AA-NAT é o passo chave da síntese de melatonina (Simonneaux & Ribelayga, 2003), mas o decurso temporal de ativação é diferente. No caso dos animais de hábito noturno existe um tempo longo entre a entrada do escuro e o início da produção de melatonina, enquanto que, em animais de hábito diurno a subida de melatonina ocorre imediatamente após o escuro (Lee *et al.*, 2009).

Figura 1 - Regulação da produção de melatonina pela glândula pineal em primatas e roedores. Em primatas, o RNAm da enzima arilalquilamina-N-Acetiltransferase (AA-NAT) é transcrito e traduzido constantemente. A liberação noturna de noradrenalina (NA) para a pineal promove a fosforilação da proteína quinase A (PKA) através da adenosina monofosfato cíclica (AMPc). A PKA fosforila a AA-NAT que se liga a proteína 14-3-3, mantendo-se estável. No caso do roedores, a expressão da AA-NAT só ocorre na fase noturna, pois depende da ativação da PKA, que por sua vez, fosforila o elemento CREB (*cyclic AMP response element binding*). Neste caso, a AA-NAT também é fosforilada pela PKA e liga-se à proteína 14-3-3. Nessa conformação, a AA-NAT catalisa a transformação de 5-HT em N-acetilserotonina (NAS), que é, a seguir, metilada pela enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) dando origem à melatonina (Simonneux & Ribelayga, 2003).

A biossíntese da melatonina se dá pela captação do triptofano da corrente sanguínea que é hidroxilado a 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase 1 (TPH1) (Lovenberg *et al.*, 1967). 5-HTP é convertido a serotonina pela descarboxilase de aminoácido aromático (AAAD), dando

origem à serotonina (5-HT) (Snyder & Axelrod, 1964). Em seguida, a 5-HT é acetilada pela enzima AA-NAT formando a N-acetilserotonina (NAS) que, por fim, é metilada pela enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) dando origem à melatonina. A 5-HT pode seguir para a via de catabolismo, sofrendo deaminação oxidativa pela monoaminoxidase (MAO) e formando o ácido 5-hidroxindolacético (5-HIAA) (Simonneaux & Ribelayga, 2003) (figura 1).

A melatonina pode ser considerada um *zeitgeber* interno (termo alemão que significa “doador de tempo”). Sua produção noturna pela pineal e sua liberação, tanto para a corrente sanguínea quanto para o líquido cefalorraquidiano (Skinner & Malpaux, 1999; Tricoire *et al.*, 2002), marca o escuro para os órgãos internos (Simonneaux & Ribelayga, 2003) sincronizando os animais ao ciclo claro-escuro e às estações do ano.

1.2 - Síntese Extrapineal de Melatonina

Como dito anteriormente, além da pineal, outros tecidos e órgãos apresentam o conjunto de enzimas necessário à síntese de melatonina. Esta terá uma ação autócrina ou parácrina e não está, necessariamente, sob controle rítmico de produção. A retina, por exemplo, produz melatonina ritmicamente, mas tem ação local, modulando e sendo modulada pela liberação de dopamina pelas células amácrinas (Dubocovich, 1983).

O trato gastrointestinal, por outro lado, contribui significativamente para a melatonina circulante, embora não seja observado ritmo diário de produção (Bubenik, 2002). É provável que os níveis diurnos de melatonina detectados na

circulação tenham origem no trato gastrointestinal, já que pinealectomia em ratos alimentados *ad libitum* não abole esses níveis (Ozaki & Lynch, 1976) e animais com restrição de alimentos não apresentam níveis detectáveis de melatonina no plasma na fase de claro (Chik *et al.*, 1987). A concentração de melatonina no trato gastrointestinal varia conforme a ingestão de alimentos, sendo que o aumento do triptofano devido à alimentação é capaz de aumentar esses níveis (Chik *et al.*, 1987; Bubenik *et al.*, 1996; 2000).

As células imunocompetentes também são capazes de produzir melatonina quando ativadas. Finocchiaro e colaboradores (1988) mostraram que células mononucleares (macrófagos e linfócitos) em cultura ativadas por interferon- γ (IFN γ), na presença de serotonina, produzem NAS e melatonina. Trabalhos posteriores demonstraram que tanto células mononucleares (Carrillo-Vico *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2004; Pontes *et al.*, 2006), quanto células polimorfonucleares (Pontes *et al.*, 2006) ativadas produzem melatonina no local da lesão.

1.3 - Mecanismos de Ação e Efeitos da Melatonina

O fato da melatonina ser responsável pela transmissão da informação fotoperiódica para todo o organismo faz dela um fator importante na regulação dos mais diversos aspectos fisiológicos, envolvendo diferentes mecanismos de ação.

A melatonina pode agir através de receptores de membrana acoplados à proteína G (MT₁, MT₂) ou ao sítio receptor localizado na enzima quinona

redutase (MT_3) (Markus & Tamura, 2009). Devido ao seu alto coeficiente de partição óleo-água (Shida *et al.*, 1994), a melatonina pode atravessar membranas biológicas, chegando ao interior das células, onde pode ligar-se a diferentes moléculas, ressaltando receptores nucleares, radicais livres e o complexo Ca^{2+} -calmodulina (Markus & Tamura, 2009).

Na década de 1990 vários pesquisadores tentavam clonar os receptores de melatonina acoplados à proteína G e o primeiro a ter sucesso foi o grupo de Steve M. Reppert que usou uma biblioteca genômica obtida de melanóforos de rã (Ebisawa *et al.*, 1994). Muitas das ações da melatonina são mediadas pelos receptores MT_1 e MT_2 que diferem entre si pela afinidade de seus ligantes. Ambos são responsáveis pelos efeitos cronobiológicos da melatonina nos NSQs. Também são expressos nos órgãos e tecidos periféricos contribuindo para diversas ações da melatonina como ativação de células do sistema imunológico (linfócitos e células dendríticas) e controle vasomotor (Dubocovich & Markowska, 2005).

O receptor de membrana MT_3 foi purificado a partir de rim de *syrian hamster* e identificado como homólogo da quinona redutase 2 (QR2) humana, ou seja, uma enzima antioxidante (Nosjean *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2008). A melatonina é, possivelmente, um co-substrato da QR2 e doa um elétron para o co-fator da enzima flavina adenina dinucleotídeo (FAD). FAD é reduzida a FADH ou $FADH_2$, enquanto que, a melatonina é convertida a N_1 -acetil- N_2 -formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) e/ou 3-hidroximelatonina cíclica (Tan *et al.*, 1998).

A melatonina é uma molécula capaz de reduzir a formação de radicais livres, o que lhe confere ação antioxidante. Sua ação não se restringe apenas a reação direta com espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio ou radicais orgânicos, doando um elétron a esses compostos eletrofílicos, mas inclui também regulação de enzimas antioxidantes, tais como: glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, catalases e cobre/zinco/manganes-superóxido dismutase. Além disso, a melatonina também inibe a ação de enzimas pró-oxidantes: sintase de óxido nítrico (NOS) e lipoxigenase (Hardeland, 2005).

A melatonina no meio intracelular inibe a interação entre o complexo Ca^{2+} -calmodulina e proteínas alvos. A calmodulina é uma proteína com quatro sítios de ligação para o Ca^{2+} . Uma vez formado, o complexo Ca^{2+} -calmodulina interage com enzimas como, por exemplo, glicogênio fosforilase quinase, proteína quinase dependente de Ca^{2+} -calmodulina (CaMK), miosina quinase de músculos lisos e NOS. Dessa forma, esta proteína modula os níveis de AMPc e guanosina monofosfato cíclica (GMPc) (Means *et al.*, 1982). Benítez-King e colaboradores demonstraram, em uma série de trabalhos, que a melatonina interage com a calmodulina, modulando o rearranjo do citoesqueleto celular e inibindo a atividade da fosfodiesterase dependente de calmodulina (Benítez-King *et al.*, 1991; 1993; Benítez-King & Antón-Tay, 1993). Baseado nessa hipótese, Pozo e colaboradores (1997) propuseram que a melatonina é capaz de inibir a produção de NO e a formação de GMPc através da interação com o complexo Ca^{2+} -calmodulina em cerebelo de rato. Em cultura de miotubo de

ratos, foi demonstrado que o efeito da melatonina sobre a diminuição da expressão de receptores colinérgicos nicotínicos sensíveis a α -bungarotoxina (α -BTX) se dá pela inibição da atividade da calmodulina, com consequente redução dos níveis de AMPc e GMPc (de Almeida-Paula *et al.*, 2005). Nos NSQs, a melatonina inibe o potencial de longa duração induzido por estimulação de alta frequência devido a inibição da interação da CaMK do subtipo II (CaMKII) com o complexo Ca^{2+} -calmodulina (Fukunaga *et al.*, 2002).

Outro sítio de interação da melatonina são os receptores nucleares. Esta indolamina vem sendo considerada o ligante endógeno da subfamília de receptores nucleares retinóides órfãos (ROR) formada por ROR α (NR1F1, RORA ou RZR α), ROR β (NR1F2, RORB ou RZR β) e ROR γ (NR1F3, RORC ou TOR) (Jetten, 2009). O primeiro estudo da interação da melatonina com receptor RZR/ROR foi feito em linfócitos B humanos, no qual a melatonina inibe a expressão do RNAm da 5-lipoxigenase. Os efeitos demonstrados para a melatonina sobre esses receptores estão relacionados ao potencial anti-inflamatório do hormônio da glândula pineal que, além de diminuir a expressão da 5-lipoxigenase, aumenta a expressão de enzimas antioxidantes, a síntese de interleucina 2 (IL-2) e de seu receptor (Steinhilber *et al.*, 1995; Carlberg & Wiesenber, 1995).

O papel da melatonina sobre o sistema imunológico e no processo inflamatório pode estar tanto relacionado às atividades antioxidante e antiapoptótica, que terão ações protetoras sobre os tecidos, bem como na modulação da hematopoiese e da função das células imunocompetentes (Reiter

et al., 2000; Szczepanik, 2007). Carrillo-Vico e colaboradores (2004) demonstraram pela primeira vez que linfócitos ativados produzem melatonina e esta produção local está relacionada à modulação da expressão de IL-2. Por outro lado, mediadores da inflamação atuam diretamente sobre a pineal, modulando a produção de melatonina (Ferreira *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2006; 2009). A via do fator de transcrição NFkB (do inglês *nuclear factor kappa B*) é um alvo importante de ação da melatonina (Chuang *et al.*, 1996; Gilad *et al.*, 1998; Markus *et al.*, 2007; Cecon *et al.*, 2010). A partir desses fatos, nosso laboratório propôs recentemente a hipótese do eixo imuno-pineal.

A produção rítmica de melatonina pela glândula pineal pode ser modulada frente a uma agressão ao organismo. Na fase aguda de uma inflamação, a produção de melatonina pela pineal é inibida (Markus *et al.*, 2007). Foi observada que, quando há produção da citocina pró-inflamatória TNF (do inglês *tumor necrosis factor*), a produção noturna de melatonina no colostro de mães parturientes que apresentavam mastite é abolida (Pontes *et al.*, 2006).

Se, por um lado, no início da inflamação ocorre queda na produção de melatonina noturna pela pineal, células do sistema imunológico ativadas produzem melatonina em uma concentração cerca de cem vezes maior que a produzida pela pineal. Esta melatonina atua no próprio local de forma intrácina, parácina ou autócrina (Finocchiaro *et al.*, 1988; Carrillo-Vico *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2004; Pontes *et al.*, 2006).

Em cultura de glândulas pineais de rato o NFkB é expresso constitutivamente e participa do controle da síntese de melatonina (Ferreira *et*

al., 2005; Cecon *et al.*, 2010). Em condição de hígidez, a pineal expressa o fator de transcrição NFκB de forma rítmica dependente da informação fótica, tendo um pico de expressão ao final da fase de claro (Cecon *et al.*, 2010). No entanto, a via do NFκB na pineal pode ser inibida por ativação de receptores de glicocorticóides potenciando a produção noturna de melatonina (Ferreira *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2009). Na periferia, foi mostrado que a melatonina reduz a ligação do NFκB ao DNA (Chuang *et al.*, 1996; Gilad *et al.*, 1998) como será visto adiante.

A hipótese do eixo imuno-pineal postula que a pineal tem papel bidirecional na modulação da resposta inflamatória. Neste contexto, a melatonina liberada pela pineal na fase noturna impede a montagem de uma resposta inflamatória. No entanto, na fase inicial de uma injúria, o aumento das concentrações de TNF leva a uma inibição da produção de melatonina pela glândula pineal (Fernandes *et al.*, 2006). Esta produção, então, passa a ser feita no local da injúria por células imunocompetentes. A restauração do ritmo noturno de melatonina se dá através da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (Markus *et al.*, 2007). A ativação desse eixo eleva a concentração de corticosteróides circulantes (Nagano *et al.*, 1999; Turnbull & Rivier, 1999) que, na fase anti-inflamatória, exercem um controle positivo na secreção de melatonina pela pineal (Ferreira *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2009).

Por fim, as possibilidades de ação da melatonina são amplas e vão desde a organização temporal interna, à defesa do organismo contra agentes oxidantes e apoptose, além de ser importante como imunomoduladora.

2 - ÓXIDO NÍTRICO COMO AGENTE SINALIZADOR

No ano de 1980, Furchgott e Zawadzki chamaram de EDRF (*endothelium-derived relaxing factor*) uma molécula mensageira liberada pelo endotélio quando estimulado por acetilcolina (ACh). Esta molécula é capaz de difundir-se pelas células musculares lisas da aorta de coelho e promover relaxamento muscular (Furchgott & Zawadzki, 1980). Murad e Ignarro verificaram que vasodilatadores como a nitroglicerina e o próprio NO produzem relaxamento do músculo liso por ativar a síntese de GMPc. Apenas em 1986, em um congresso, Furchgott e Ignarro sugeriram, simultaneamente, que o EDRF era NO (Ignarro *et al.*, 1987; Furchgott & Vanhoutte, 1989). Uma série de experimentos realizados independentemente pelo grupo de Moncada deu respaldo a esta proposta (Palmer *et al.*, 1987). A descoberta de uma molécula gasosa atuando em um sistema biológico deu a Furchgott, Murad e Ignarro o prêmio Nobel de Medicina em 1998.

Atualmente, sabemos que o NO é fundamental nos mecanismos de sinalização celular dos sistemas cardiovascular, nervoso, gastrointestinal, entre outros, além de, desempenhar funções de defesa do hospedeiro. É produzido por três isoformas da NOS (como será visto na próxima sessão) e muitas das funções fisiológicas do NO são mediadas através da ativação do seu receptor guanilil ciclase solúvel (GCs), uma hemoproteína que converte guanosina trifosfato (GTP) no segundo mensageiro GMPc (Ignarro, 1991; Moncada & Higgs, 1993). A guanilil ciclase solúvel é composta de duas subunidades (α_1 ou α_2 ; β_1 ou β_2), sendo que, o NO ativa somente os heterodímeros $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_1$. A

primeira isoforma é a mais abundante e tem predominância no cérebro (Russwurm *et al.*, 1998).

Antes mesmo da descoberta do NO como um produto endógeno, Tannenbaum e colaboradores (1978) observaram que pacientes com infecções diarréicas liberavam altas concentrações de nitrato na urina. Essa é considerada a primeira observação de um possível papel do NO no sistema imunológico. De fato, nas últimas décadas, o NO assumiu grande importância na modulação desse sistema. O NO é liberado em altas concentrações por células imunocompetentes e é importante para a destruição de bactérias patogênicas (Bishop & Anderson, 2005).

No sistema nervoso central (SNC) é observada a maior atividade da NOS em relação a outros tecidos (Salter *et al.*, 1991). O NO pode atuar como um neurotransmissor na modulação do fluxo sanguíneo, da neurogênese e da plasticidade sináptica culminando, assim, na modulação do aprendizado e da formação da memória, além da morte celular neuronal (Bishop & Anderson, 2005). Como neurotransmissor, o NO é produzido por neurônios nitrérgicos conforme a demanda e, devido às suas características físico-químicas, atravessa a membrana celular por difusão, sem a necessidade, portanto, de um transportador (Denninger & Marletta, 1999; Esplugues, 2002).

A concentração de NO e o tipo de enzima que o produz são fundamentais para definir um papel fisiológico ou fisiopatológico. De forma simplificada, altas concentrações estão relacionadas aos efeitos danosos, que podem levar a morte celular e baixas concentrações aos efeitos protetores ou

fisiológicos (Bishop & Anderson, 2005). Quanto à relação do tipo de enzima e efeito produzido, vamos detalhar melhor na próxima sessão, mas podemos citar como exemplo o processo de isquemia. O dano neuronal que acompanha o processo se dá pela liberação excessiva de glutamato e consequente ativação de receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), o que leva a um aumento do influxo de Ca^{2+} e ativação da isoforma neuronal da NOS (nNOS) (Valencia *et al.*, 2006). Por outro lado, a ativação da isoforma endotelial da NOS (eNOS) gera neuroproteção por aumentar o fluxo sanguíneo no local da lesão (Stagliano *et al.*, 1997). Essa citotoxicidade causada pelo NO está relacionada à formação de peroxinitrito, o qual reage diretamente com o DNA e proteínas das células. Já o efeito citoprotetor do NO parece estar relacionado à capacidade do NO em ativar a via da proteína quinase dependente de GMPc (PKG) levando a formação de GMPc pela GCs (Wiley, 2007).

Este efeito do NO, no entanto, não é tão simples. Bobba e colaboradores (2007) mostram que até 3 horas após a indução de apoptose em células granulares de cerebelo de rato por baixa concentração extracelular de potássio (5 mM) há um aumento da produção de NO que coincide com um aumento do GMPc. Após 3 horas, uma importante fragmentação do DNA é acompanhada pelas diminuições de NO e GMPc. Esta redução não é resultante da morte celular, visto que, é muito maior que a prevista pelo número de células mortas. O autor conclui, portanto, que a alta concentração de NO neste caso está relacionada à proteção neuronal.

Em suma, o NO é uma molécula sinalizadora importante para diferentes sistemas. É um radical livre que atravessa a membrana celular livremente e, dependendo da sua quantidade e local onde é produzido, pode ter efeitos benéficos ou maléficos sobre o organismo.

2.1 - Sintases de Óxido Nítrico

A formação do NO se dá pela conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina (Sakuma *et al.*, 1988; Moncada *et al.*, 1989; Moncada & Riggs, 1993) pela NOS. Uma vez formado, o NO atua principalmente através da ativação da GCs, (Ignarro, 1991; Hobbs, 1997; Koglin *et al.*, 2001).

Existem três isoformas de NOS, sendo duas isoformas constitutivas: a nNOS (NOS1) e a eNOS (NOS3), que são dependentes da concentração de Ca^{2+} -calmodulina e importantes na regulação de processos fisiológicos; e uma isoforma induzível, a NOS induzível (iNOS ou NOS2) (Moncada *et al.*, 1997) que é sintetizada, por exemplo, após indução por endotoxinas bacterianas ou citocinas e, por isso, pode ser denominada como uma isoforma do processo inflamatório. Esta isoforma não é dependente da Ca^{2+} -calmodulina, mas da transcrição gênica que é regulada pela principalmente pela via do fator de transcrição nuclear NFkB (Alderton *et al.*, 2001). Um estudo detalhado do NFkB será visto a diante.

As sintases de óxido nítrico são flavoproteínas diméricas, que contêm tetraidrobiopterina e possuem homologia com o citocromo P450 (Moncada & Higgs, 1993). As três isoformas conhecidas catalisam a mesma reação, porém,

ocorre uma alta especificidade quanto à afinidade por substrato, inibidores, localização tecidual e celular, dando a cada uma delas diferentes papéis na regulação de processos fisiológico ou fisiopatológicos. A eNOS localiza-se na membrana celular, a nNOS também pode ser encontrada na membrana, mas sua localização preferencial é o citoplasma, onde também é encontrada a iNOS (Arzumanian *et al.*, 2003). A eNOS está presente, por exemplo, em trombócitos, miócitos, plaquetas e células endoteliais (Govers & Rabelink, 2001; Arzumanian *et al.*, 2003). A nNOS em neurônios, trombócitos, células β -pancreáticas, músculos, pulmões, estômago, epitélio celular do útero e células endoteliais de arteríolas, entre outros. E a iNOS é expressa em inúmeras células, tendo como destaque os macrófagos, astrócitos e microglia (Bryan *et al.*, 2009). A especificidade funcional de cada uma das isoformas de NOS está diretamente relacionada com a especificidade tissular.

A expressão da eNOS em neurônios ainda é um dado controverso e alguns autores indicam que a marcação desta enzima em tecidos nervosos é um artefato da técnica e que apenas as células endoteliais do cérebro são marcadas (Garthwaite, 2008). Entre os que defendem a hipótese de que eNOS é expressa no sistema nervoso, podemos citar o trabalho de imunocitoquímica de Dinerman e colaboradores (1994). Eles propuseram que eNOS e nNOS ocorrem nas mesmas populações de células em diferentes regiões do cérebro, como cerebelo e bulbo olfatório. Além disso, o autor conclui que no hipocampo, a eNOS está mais concentrada nas células piramidais, enquanto que, a nNOS está restrita a interneurônios. Além disso, outros trabalhos indicam que a eNOS

pode estar presente em astrócitos núcleo do trato solitário, como revisto por Lin e colaboradores (2007).

No cérebro, é certo que a nNOS é predominante e existe na forma de partícula e solúvel (Hecker *et al.*, 1994), podendo estar tanto ancorada a membrana celular, como também se apresentar no citoplasma. A nNOS contém na região N-terminal um domínio PDZ (*post-synaptic density protein, discs-large, ZO-1*), que se liga ao domínio PDZ de proteínas ancoradoras, tais como: sintrofina, PSD95 ou PSD93 (Brenman *et al.*, 1996). A PSD95 ancora a nNOS ao receptor de NMDA. Essa interação molecular explica como o influxo de Ca^{2+} através de receptores de NMDA está acoplado de forma eficiente a síntese de NO (Sattler *et al.*, 1999). A regulação da atividade da nNOS pode se dar tanto pela interação dessa com proteínas ancoradoras e reguladoras [calmodulina, proteínas com domínio PDZ, caveolina -3, proteína de choque térmico 90 (HSP-90 do inglês, *Heat shock protein 90*) e a proteína inibitória de nNOS (PIN)] como também pela fosforilação por PKA, CaMK, PKC e fosfatase 1 em diversos sítios da nNOS, o que afeta sua atividade diferentemente (Zhou & Zhu, 2009).

Diversos receptores que promovem aumento de Ca^{2+} intracelular estão associados à ativação da produção de NO. Entre esses, é de particular interesse no presente trabalho, os receptores colinérgicos (AChRs) e os receptores de bradicinina (BK).

Os AChRs são receptores de membrana classificados com base na reatividade ao alcalóide muscarina, encontrado no cogumelo *Amanita muscaria*, ou à nicotina, encontrada na planta *Nicotina tabacum*, sendo chamados,

respectivamente, de receptores muscarínicos (mAChRs) e nicotínicos (nAChRs). Os mAChRs fazem parte da família das proteínas de sete domínios transmembrânicos associadas à proteína G. Já os nAChRs são receptores canais dependentes de ligantes (Sargent, 1993).

Os nAChRs podem estar associados fisicamente a NOS. Em junções neuro-musculares a produção de NO modula a formação de *clusters* de nAChR induzido por agrina, um fator essencial para a sinaptogênese (Lück *et al.*, 2000; Blottner & Lück, 2001). Em preparações de fatias ou culturas de células do gânglio da raiz dorsal, a ativação de nAChR promove a entrada de Ca^{2+} , ativando a nNOS que está ancorada ao mesmo complexo protéico (*cluster*) que o nAChR (Haberberger *et al.*, 2003; Papadopolou *et al.*, 2004). E no hipocampo, a liberação de NO é provocada pela ativação do subtipo α_7 nAChR, o qual tem permeabilidade preferencial para o íon Ca^{2+} e leva a modulação da propagação auditiva. Os receptores do subtipo α_7 estão presentes em uma subpopulação de neurônios do hipocampo imuno-reativos para NOS (Adams *et al.*, 2000). A ativação de mAChRs também estimula a produção de NO através do aumento de Ca^{2+} intracelular (Lanzafame *et al.*, 2003): em linfócitos (Kawashima & Fuji, 2003), no coração (Hare & Colucci, 1995), no íleo (Kortezova *et al.*, 1998) e no hipocampo (Huang & Hsu, 2010).

A BK atua através dos seus receptores de membrana acoplados a proteína G (B_1 e B_2) e ativa a via da fosfolipase C (PLC) liberando estoques de Ca^{2+} do retículo endoplasmático (Regoli *et al.*, 1998). O receptor B_2 está presente constitutivamente na membrana das células, enquanto que, os receptores B_1 são

expressos em condições patológicas (Rodi *et al.*, 2005). Imunohistoquímica revelou a presença de receptores B₂ presentes exclusivamente em neurônios de diversas áreas do SNC, inclusive no cerebelo (Chen *et al.*, 2000). Em células endoteliais a ativação de B₂ resulta no aumento do complexo Ca²⁺-calmodulina e consequente geração de NO. Por outro lado, a ativação de B₁ nessas células, em condição inflamatória, leva a um aumento prolongado da produção de NO através da expressão da iNOS (Kuhr *et al.*, 2010).

2.2 - Modulação da Atividade das Sintases de Óxido Nítrico por Melatonina

O óxido nítrico contém um elétron desemparelhado e é, portanto, um radical livre. Apesar da importante função na sinalização celular, o NO pode conduzir a efeitos deletérios aos tecidos por formar rapidamente peroxinitrito, através da reação com superóxido (Beckman & Koppenol, 1996). A modulação da produção de NO, tanto em condições fisiológicas, como fisiopatológicas é de suma importância para manter o bom funcionamento celular. Desta forma, o efeito da melatonina sobre a produção de NO pode ser vista como uma ação protetora, e, além disso, essa indolamina pode agir tanto sobre as isoformas constitutivas, como sobre a isoforma induzida da NOS.

Em homogenato de cerebelo Pozo e colaboradores (1994; 1997) demonstraram que uma larga faixa de concentração (1nM - 1mM) de melatonina inibe a produção de NO. Este efeito não se mostrou saturável e aumenta de forma linear ao longo de seis unidades logarítmicas de concentração. Os autores propõem que este efeito é dependente de Ca²⁺ e da

interação da melatonina com a calmodulina (Pozo *et al.*, 1994; 1997). Tendo em vista os diferentes mecanismos de ação da melatonina e as diferentes formas de gerar NO, é mais provável que vários mecanismos estejam contribuindo para gerar este efeito.

Em células de músculo esquelético a NOS constitutiva se agrega a um complexo protéico de distrofinas, canais iônicos e proteínas ancoradoras importante na formação da junção neuromuscular (Blottner & Lück, 2001). Neste caso, a melatonina promove uma inibição da produção de GMPc, que é resultado da ativação da via NO/PKG/GMPc (de Almeida-Paula *et al.*, 2005). Sabendo que os receptores nicotínicos do subtipo $\alpha 7$ (nAChRs $\alpha 7$), mas não os receptores de glutamato, são sensíveis a melatonina em fatias de cerebelo (Markus *et al.*, 2003), uma das partes de nosso trabalho visa verificar se melatonina modifica a ativação da NOS constitutiva induzida por agonista colinérgico.

A ativação da eNOS em cultura de células endoteliais de rato é passível de ser bloqueada pela melatonina quando o aumento intracelular de Ca^{2+} é promovido pela ativação de receptores acoplados a proteína G (BK, histamina e purinoceptores P2Y), mas não quando é resultante da ativação de canais operados por ATP (P2X) (Tamura *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2007). Neste mesmo modelo, a ativação da iNOS por lipopolissacarídeo da parede de bactérias gram-negativas (LPS) é bloqueada por concentrações 1000 vezes maiores de melatonina do que a necessária para bloquear a eNOS (Tamura *et al.*, 2009).

3 - FATOR DE TRANSCRIÇÃO NFKB

3.1 - Aspectos Gerais

O fator de transcrição nuclear NFKB tem um papel central no processo de inflamação tanto na periferia quanto no SNC. Além disso, o NFKB atua no controle da apoptose, sobrevivência, proliferação e divisão celular (Xiao, 2004).

A família do NFKB, também denominada de família Rel consiste de cinco subunidades que incluem: RelA (p65), c-Rel, RelB, p50 e p52. Esta família é caracterizada por conter uma porção N – terminal bem conservada com cerca de 300 aminoácidos (RHD – *Rel homology domain*), a qual se subdivide em uma região que se liga ao DNA e outra denominada de domínio de dimerização, onde se encontra um sinal de localização nuclear (NLS). A região C-terminal tem importante grau de especificidade. RelA, c-Rel e RelB contém um domínio de transativação (TAD), necessária para iniciar a atividade transcricional. As subunidades p50 e p52 são sintetizadas a partir de grandes moléculas precursoras, p105 e p100, respectivamente (Meffert & Baltimore, 2005).

O NFKB encontra-se no citoplasma das células, complexado com proteínas inibitórias da família IKB. Existem pelo menos duas vias possíveis para que haja ativação dessa via: a clássica (via canônica) e a alternativa (via não-canônica) (Neumann & Naumann, 2007). A via clássica é a mais comum e está associada à expressão de genes relacionados à inflamação, à resposta imunológica inata, à anti-apoptose e à sobrevivência celular (Xiao, 2004). Esta via é ativada por uma variedade de sinais inflamatórios, incluindo citocinas

pró-inflamatórias e de antígenos de microorganismos. A via alternativa é ativada através dos receptores da família do TNF e leva a transformação do precursor p100 e liberação da subunidade p52. Os genes ativados por esta via estão relacionados ao sistema imune adaptativo (Xiao, 2004; Neumann & Naumann, 2007).

Segundo a via clássica, para que haja ativação do fator de transcrição NFkB, o IKB é fosforilado pelo complexo de proteína quinase IKK. Essa fosforilação é o sinal para a ubiquitinação e posterior degradação do IKB pelo proteassoma. Após a liberação do dímero NFkB, são expostas as sequências peptídicas que sinalizam a internalização nuclear (Kaltschmidt *et al.*, 2005).

Vários estímulos que ativam NFkB no sistema imunológico também podem atuar no SNC como: citocinas TNF e IL-1b (interleucina-1b), LPS, infecções virais e estresse oxidativo. Outros estímulos são específicos do SNC como glutamato, neurotrofina, proteína precursora β -amilóide (PPA), bem como o peptídeo β -amilóide (β A) e o fator de crescimento neural (NGF, do inglês *Nerve Growth Factor*) (Barger & Mattson, 1996). O TNF, através do receptor TNF-R1 (*Tumor Necrosis Factor Receptor 1*), o peptídeo β A e o LPS através do receptor TLR-4 (*Toll-Like Receptor 4*) ativam a via clássica do NFkB (Mattson & Camandola, 2001).

Os genes regulados pelo NFkB relevantes para o SNC incluem: citocinas (ex. TNF e IL-6), PPA, iNOS, proteínas inibidoras de apoptose (IAPs), calbidina-D28, Mn-superóxido dismutase, Bcl-2, receptores μ -opióide e CaMKII (Kaltschmidt *et al.*, 2005).

Neurônios e glias expressam constitutivamente os dímeros p50p50 e p50RelA (Kaltschmidt *et al.*, 1994). Em neurônios o NFkB modula atividade sináptica, desenvolvimento, plasticidade neural e sobrevivência celular, através da ativação da expressão de genes antiapoptóticos (Meffert & Baltimore, 2005). A redução da atividade do NFkB por agentes que bloqueiam a via ou por formas super-repressoras do IKB inibe o crescimento de dendritos e neuritos (Pizzi & Spano, 2006) e a inibição da ligação do NFkB ao DNA também causa danos à célula por reduzir a regulação de agentes antiapoptóticos como Bcl-2, Bcl-XL e Bfl-1/A1 (Bhakar *et al.*, 2002).

A neuroproteção do NFkB foi inicialmente associada ao efeito protetor do TNF. Fernyhough e colaboradores (2005) mostraram que a ativação do complexo do NFkB é essencial para sobrevivência de neurônios sensoriais ativados com TNF. Contudo, esse efeito pode ser alterado quando as células são submetidas às diferentes concentrações de TNF. Células granulares de cerebelo que possuem uma ativação basal do NFkB apresentam uma curva de sobrevivência em forma de “U” invertido quando ativadas por TNF (figura 2). Isso indica que a ativação basal do NFkB nesses neurônios é essencial para sua sobrevivência, enquanto que, a regulação anormal do mesmo, seja para uma maior ou para uma menor atividade do NFkB, é prejudicial às células. A subunidade do NFkB RelA teria um papel central nesse balanço, ora ativando ora reprimindo a expressão de genes antiapoptóticos (Kaltschmidt *et al.*, 1995; 2005).

Figura 2 – Modelo de regulação da atividade do fator de transcrição NFKB. A ativação basal do NFKB está envolvida em atividades neuronais tais como sinapse, plasticidade e desenvolvimento. Uma perturbação dessa ativação fisiológica pode ser patológica resultando na morte celular. (Baseado em Kaltschmidt *et al.*, 2005).

De fato, regulação anormal do NFKB pode levar a patologias associadas à neurodegeneração e muitos estudos clínicos ou utilizando modelos experimentais descrevem um aumento da atividade do NFKB em condições neuropatológicas. Para Grilli e Memo (1999) o NFKB é responsável pelo início da aceleração de vários processos neurodegenerativos no decurso de doenças do SNC como doença de Parkinson, doença de Alzheimer e infecções virais.

3.2 - Ação da Melatonina Sobre a Via do Fator de Transcrição NFKB

O papel da melatonina na imunomodulação já havia sido descrito (Maestroni *et al.*, 1986) quando Chuang e colaboradores (1996) propuseram que a melatonina poderia modular a ligação do fator NFKB ao DNA. A atividade do

NFKB de extrato nuclear do baço de ratos mostrou ser maior em animais sacrificados na fase de claro do que na fase de escuro. Ainda, a injeção intraperitoneal de melatonina (10 mg/Kg) inibiu a atividade do NFKB em animais sacrificados durante a fase de claro (Chuang *et al.*, 1996).

Diversos modelos mostram o efeito da melatonina sobre a inibição da via do fator de transcrição NFKB. Em cultura de macrófagos (Gilad *et al.*, 1998) e de células endoteliais (Tamura *et al.*, 2009) ativadas por LPS a melatonina inibe a translocação do NFKB ao núcleo, assim como a expressão da enzima iNOS e, conseqüentemente, a produção de NO. Na própria pineal, foi verificado que a melatonina sintetizada na fase noturna é importante para manter baixas concentrações de NFKB no interior do núcleo (Cecon *et al.*, 2010).

No presente trabalho, foram utilizadas culturas de células granulares de cerebelo para demonstrar o efeito da melatonina sobre a produção de NO e o influxo de Ca^{2+} induzidos por agonista colinérgico e BK. LPS foi utilizado para ativar a via do fator de transcrição NFKB e, conseqüentemente, a expressão da enzima iNOS e a produção de NO sob ação da melatonina.

OBJETIVO

Avaliar o efeito da melatonina sobre a produção de óxido nítrico em cultura de células de cerebelo de rato.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Efeito da melatonina sobre a ativação da NOS constitutiva:

- a) avaliar o efeito da melatonina sobre a produção de NO ativada por ACh e BK;
- b) avaliar o efeito da melatonina sobre o aumento de Ca^{2+} intracelular ativado por ACh.

2. Efeito da melatonina sobre ativação da iNOS:

- a) determinar se as células em cultura expressam TLR-4;
- b) determinar as subunidades de NF κ B presentes em núcleos de células cerebelares;
- c) avaliar o efeito da melatonina sobre a translocação nuclear do fator de transcrição NF κ B induzido por LPS (100 ng/mL);
- d) avaliar o efeito da melatonina sobre a expressão da enzima iNOS induzida por LPS (100 ng/mL);
- e) avaliar o efeito da melatonina sobre a produção de NO induzida por LPS (100 ng/mL).

MATERIAL E MÉTODOS

1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, com idade entre 7 à 8 dias, obtidos do biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Os animais permaneceram alojados em gaiolas de polipropileno mantidas em sala com temperatura e umidade controladas. O ciclo claro-escuro empregado foi de 12:12 h. Todos os procedimentos seguiram as recomendações e os princípios éticos de experimentação animal, cujo protocolo experimental foi devidamente aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais Vertebrados em Experimentação (CEA) do Instituto de Biociências da USP (protocolo nº046/2007) (Anexo 1).

2. DROGAS E REAGENTES

As drogas e reagentes utilizadas tiveram as seguintes procedências:

- Abcam (Cambridge, MA, EUA): anticorpo policlonal de ovelha anti-coelho conjugado a *Texas Red*, anticorpo policlonal de coelho anti-TLR-4 (*Toll like receptor 4*).
- Alexis Biochemical (Plymouth Meeting, PA, EUA): DAR-4M-AM (Diaminorhodamine-4M AM).
- Amersham Bioscience (Buckinghamshire, Reino Unido): poli(dIdC).
- Bio-Rad (Richmond, CA, EUA): acrilamida.

- Amresco (Solon, Ohio, EUA): Triton X-100, saponina.
- Calbiochem (Darmstadt, Hessen, Alemanha): NP40 (Nonidet-p40).
- GE Healthcare (Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, UK): coluna microSpin Sefadex G-25.
- GIBCO BRL Products (Grand Island, NY, EUA): DMEM (*Dubeco's modified Eagles medium*) , estreptomicina, glutamina, penicilina e soro fetal bovino.
- Invitrogen Life Technology (Carlsbad, CA, EUA): DAPI (6-diamidino-2-fenilindol), DTT (ditiotreitól), PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil), T4 polinucleotídeo quinase
- Merck (São Paulo, SP, Brasil): álcool etílico.
- Molecular Probes (Eugene, Oregon, EUA): DAF-FM (4-amina-5-metilamina-2',7'-difluorosceína diacetato) e Fluo-3 AM (ácido 1-[Amino-5-(2,7- dicloro -6- acetometoxi -3- oxo - 3*H* - xanten -9- il) fenoxi] -2- (2'-amino-5'-metilfenoxi) etano -N,N,N',N' -tetraacético, ester pentaacetoxi-metil).
- Perkin Elmer (Boston, MA, EUA): Easy Tides® Adenosine 5'-trifosfato, [γ -³²P].
- Promega (Madison, WI, EUA): oligonucleotídeo consenso para NFκB (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3').
- Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Califórnia, EUA): Anticorpo policlonal de coelho para iNOS, anticorpos para as subunidades do NFκB p50 (C-19)X e RelA (C-20)X.

- Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA): acetilcolina, bradicinina, EGTA (etileno-bis(oxietilenonitrila)ácido tetraacético), glicerol, HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfônico), inibidor de tripsina, LPS (lipopolissacarídeo constituinte de bactéria gram negativa *Escherichia coli*, sorotipo 0127:B8), melatonina, SNP (nitroprussiato de sódio), tripsina, bis-acrilamida (N,N'-methylenebisacrylamide), anticorpo monoclonal contra a proteína fibrilar ácida de coelho (GFAP) conjugado ao fluorescente Cy3, anticorpo monoclonal de camundongo contra a proteína associada ao microtúbulo 2 (MAP2), anticorpo de camundongo anti-MAP2 conjugado ao fluorescente FITC (fluoresceína isotiocianetada).

Todos os demais reagentes utilizados apresentavam grau de pureza analítico.

3. PREPARO DE DROGAS

O estoque de melatonina (1 mM) foi feito em etanol (1%) e de BK (10 mM) em ácido acético 5%. DAF-FM e Fluo-3 AM foram estocados na concentração de 1 mM em dimetilsufóxido (DMSO) 100%. Todo o material restante foi diluído, aliquotado e estocado em H₂O deionizada e purificada por sistema Milli-Q e armazenado a -20 °C.

As diluições seguintes foram feitas com as soluções descritas em cada protocolo. A concentração final do solvente foi de cerca de 0,1% (exceção para o DAF-FM 0,2% DMSO) e não tiveram efeitos nos experimentos.

4. CULTURAS DE CÉLULAS DE CEREBELO

Cerebelos de ratos recém removidos foram colocados em solução fisiológica contendo (mM): NaCl 120, KCl 5, KH_2PO_4 1,2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2, NaHCO_3 25 e glicose 1; pH = 7,4) para limpeza do tecido (retirada de tecidos anexos e sangue), cortados em pequenos pedaços e, então, incubados com tripsina (0,05%, 37 °C, 40 min.). A dispersão mecânica foi realizada na presença de inibidor de tripsina (0,06%). O sobrenadante foi centrifugado a 300 g por 5 min. em temperatura ambiente e o *pellet* recolhido em meio *Dulbecco's modified Eagles medium* (DMEM 13,4 g/1000 mL) acrescido de (mM): KCl 25, NaHCO_3 44, penicilina (50 U/mL), streptomycina (50 µg/mL) e 10% soro fetal bovino (pH = 7,4). A viabilidade das células foi estimada pela técnica de exclusão azul de Trypan. As células foram semeadas em placas com lamínula de 120 mm de diâmetro ou em placas de oito poços (Permanox® Slide) na concentração de 5×10^5 células/placa para estudo no confocal ou imunocitoquímica, respectivamente. Além disso, foram feitas culturas numa concentração maior (10^7 células/poço) em placas de 12 poços de 25 mm para extração do conteúdo protéico nuclear. Todas as placas foram tratadas com poli-L-lisina (20 µg/mL, 40 min.).

As células em cultura foram mantidas em meio DMEM em uma estufa umidificada (37°C, 5% de CO₂). O meio de cultura foi trocado a cada 48 h e as culturas foram utilizadas no oitavo dia (Zago, 2001). Cerca de 90% dos neurônios presentes em cerebelo de rato com 7-8 dias são células granulares, o que facilita a obtenção de culturas homogêneas (Burgoyne & Cambray-Deakin, 1988).

5. IMUNOCITOQUÍMICA

5.1 Identificação dos tipos celulares

A cultura de células granulares de cerebelo foi submetida à imunocitoquímica a fim de caracterizar os tipos celulares e verificar sua homogeneidade. Para tanto, no oitavo dia de cultura o meio DMEM foi removido e as células foram lavadas com tampão fosfato PBS (mM: NaCl 125, Na₂HPO₄ 2, NaH₂PO₄ 2 e KCl 5) três vezes. A fixação foi feita com metanol e acetona (1:1, 10 min., -20 °C) seguida de três lavagens com PBS. As células foram, então, permeabilizadas com PBS contendo 0,2% Triton X-100 por 30 min. à temperatura ambiente. Para o bloqueio de sítios não específicos foi utilizado uma solução de PBS, 2% NGS (soro caprino normal), 4% BSA (albumina sérica bovina) e 0,2% Triton X-100 (30 min., temperatura ambiente).

Para marcação dos neurônios, o anticorpo primário monoclonal de camundongo contra a proteína associada ao microtúbulo 2 (MAP2) foi diluído

em PBS (1:200) contendo 0,2% Triton X-100, 1% NGS e 2% BSA e a cultura foi incubada por 24 h à 4 °C. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS, 0,2% Triton X-100 e incubadas com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado ao fluorescente fluoresceína isotiocianetada (FITC, diluição 1:230) por 2h.

Após a marcação dos neurônios foi feita marcação da astroglia. O anticorpo monoclonal contra a proteína fibrilar ácida de coelho (GFAP conjugado ao fluorescente Cy3) foi preparado em PBS, 0,2% de Triton X-100 (diluição 1:200) e a cultura foi incubada por 1,5 h à temperatura ambiente.

Por último, após mais três lavagens com PBS, 0,2% de Triton X-100 foi feita marcação do núcleo das células com 4'-6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI, 300 µM, 5 min., temperatura ambiente) seguida de mais três lavagens. As lâminas foram montadas com PBS e glicerol (1:1).

As lâminas foram analisadas através de um microscópio confocal. Foram selecionados campos contendo aproximadamente 15-30 células e o nível de fluorescência emitida por cada célula foi avaliado através do programa LSM 510. Os registros foram realizados com a objetiva de imersão em óleo (40X), sendo utilizado um laser argônio para excitação do fluoróforo FITC no comprimento de onda 488 nm e um filtro para emissão em 515-530 nm. Para o Cy3 foi utilizado o laser HeNe para excitação no comprimento de onda 530 e um filtro para emissão em 580. E para excitação do DAPI foi utilizado um laser *enterprise* ultravioleta para excitação no comprimento de onda de 364 nm e um filtro para emissão em 460-475.

5.2 Expressão da enzima iNOS

Para ativar a expressão da enzima iNOS, as células foram incubadas com LPS 100 ng/mL na presença ou não de melatonina 100 nM (1 ou 2 h). Ao final das incubações, o meio DMEM foi removido e as células lavadas com PBS três vezes.

As células foram fixadas com paraformaldeído 4% (10 min, 4 °C). Em seguida, foram feitas três lavagens com tampão fosfato PBS e as células incubadas em PBS suplementado com saponina 0,5% (10 min., temperatura ambiente). A saponina foi removida e as células incubadas com solução de bloqueio (PBS, BSA 1% e glicina 0,3 M) para sítios não-específicos. Após 60 min. a solução de bloqueio foi retirada e o anticorpo primário específico anti-iNOS (diluição 1:200) incubado por aproximadamente 18 h (PBS + BSA 1% - 4 °C). Novamente foram feitas três lavagens com PBS e então o anticorpo secundário anti-coelho conjugado ao marcador fluorescente *Texas red*[®] (diluição 1:400) foi adicionado por 1h na temperatura ambiente. Por último, após mais três lavagens, foi feita marcação do núcleo das células com DAPI (300 µM, 5 min., temperatura ambiente). O controle negativo foi feito sem a incubação do anticorpo primário.

No microscópio confocal foram selecionados campos contendo aproximadamente 15-30 células e o nível de fluorescência emitida por cada célula foi avaliado através do programa LSM 510. Os registros foram realizados com a objetiva de imersão em óleo (40X), sendo utilizado lasers HeNe 543 e 633

para excitação do fluoróforo *Texas Red*[®] no comprimento de onda de 590 nm e um filtro para emissão em 650. Para excitação do DAPI foi utilizado um laser *enterprise* ultravioleta para excitação no comprimento de onda de 364 nm e um filtro para emissão em 460-475.

5.3 Expressão do receptor TLR-4

As células foram fixadas e incubadas com anticorpo primário policlonal de coelho (anti-TLR-4) e anticorpo secundário policlonal anti-coelho conjugado ao fluorescente *Texas red*[®] (diluição 1:400) da mesma forma que foi descrita para a iNOS. Foi feita uma curva de diluição para o anticorpo primário (1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000). A leitura da fluorescência emitida foi realizada com o mesmo protocolo descrito para a iNOS.

6. ANÁLISE DA TRANSLOCAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR NFκB

6.1 Extração Protéica Nuclear

As culturas de células de cerebelo foram incubadas com LPS 100 ng/mL (0,5, 1, 2 e 12 h) na presença ou na ausência de melatonina 100 nM.

Após as incubações, as células foram ressuspensas com 200 µL/poço com solução de lise (mM): HEPES 10 (pH 7,5), KCl 10, EDTA (ácido etileno

diamino tetracético) 0,1 (pH 8,0), DTT 1, PMSF 0,1 (pH 7,5) e 10% glicerol. As amostras foram então homogeneizadas, acrescentando-se em seguida 12,5 µL NP40 (10%). As amostras foram agitadas por 10 seg., mantidas por 15 min. em gelo, e então centrifugadas (12000 g, 1 min., 4° C).

O precipitado foi lavado com 100 µL do tampão de lise e centrifugado (12000 g, 1 min., 4 °C). O precipitado nuclear foi ressuspenso em 20 µL do tampão de extrato nuclear (mM): HEPES 10 (pH 7,5), KCl 10, EDTA 1 (pH 8,0), DTT 1, PMSF 0,1 e 10% glicerol e mantidos sob agitação (15 min., 4 °C). Por fim, as amostras foram centrifugadas (20000 g, 5 min., 4 °C) e o extrato nuclear aliquoteado armazenado a -70 °C até serem utilizados. O conteúdo protéico foi avaliado por espectrofotometria, utilizando o leitor ND-1000 (Nanodrop®).

6.2 Ensaio de Eletromobilidade em Gel (EMSA)

O ensaio de eletromobilidade em gel (*Eletromobility Shift Assay* - EMSA) foi adaptado do trabalho de Ferreira *et al.* 2005. O oligonucleotídeo de dupla-fita consenso para NFκB (5' AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') foi marcado nas extremidades com [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP na presença da enzima T₄ polinucleotídeo quinase por 10 min. a 37 °C, seguida da remoção dos nucleotídeos não incorporados através da coluna Sefadex G-25. Este ensaio baseia-se na ligação das proteínas de NFκB presentes em extratos protéicos nucleares a sonda de oligonucleotídeo dupla-fita consenso para NFκB marcada nas extremidades com ^{32}P ([^{32}P]-NFκB). Os extratos nucleares das células granulares de cerebelo foram

incubados à temperatura ambiente por 20 min. em um volume final de 20 μ L de tampão contendo (mM): tris-hidroximetilaminometano-HCl 10, $MgCl_2$ 1, NaCl 50, DTT (ditiotretitol) 0,5, EDTA 0,5, glicerol 4% e poli(dIdC) 1 μ g, (pH 7,5). Posteriormente, cada amostra foi incubada por 30 min. à temperatura ambiente com aproximadamente 40.000 c.p.m. do oligonucleotídeo [^{32}P]-NFkB. Os complexos proteína-DNA foram analisados em gel não-desnaturante 6% de acrilamida:bisacrilamida (37,5 : 1) em tampão Tris-borato/EDTA (TBE 0,25x) a 150 V por 2 h e 30 min. O gel foi seco à vácuo, em seguida, exposto ao filme XAR-5 (Kodak®) por 36 - 48 h à -70 °C, revelado (solução reveladora e fixadora Kodak®) e, por último, quantificado densitometricamente no programa ImageJ (Image Processing and Analysis in Java).

Para identificar as subunidades do NFkB presentes em extratos protéicos nucleares utilizamos anticorpos para p50 e RelA (2 μ g/ μ L, 2 μ L por amostra). Estes foram incubados juntos aos extratos protéicos (30 min., temperatura ambiente) antes da adição do oligonucleotídeo. As subunidades presentes no extrato se conjugam ao anticorpo formando um complexo que fica retido no início do gel (“super-shift”).

7. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE Ca^{2+} INTRACELULAR ATRAVÉS DE MICROSCOPIA CONFOCAL

Antes de iniciar o experimento o meio de cultura DMEM em que as células estavam foi trocado por uma solução fisiológica contendo (mM): NaCl 120, KCl 25, NaH_2PO_4 1,2, $MgCl_2$ 1,3, $CaCl_2$ 2, $NaHCO_3$ 25, glicose 11 e L-arginina 10 (pH = 7,4). Nesta solução as células foram incubadas com Fluo3-AM (5 μ M, 50 min.) para marcação do Ca^{2+} intracelular. No microscópio confocal foi realizado o seguinte protocolo:

- 1) Registro de fluorescência basal por 1 min.
- 2) Adição de veículo ou melatonina 1 nM (1 min.) antes da adição de ACh 1mM. A melatonina foi mantida na cultura até o final do experimento (150 seg.).

Os registros foram realizados em microscópio confocal (Zeiss) com a objetiva de imersão em óleo (40X), sendo utilizado um laser argônio para excitação do fluoróforo no comprimento de onda de 488 nm e um filtro para emissão em 515-530 nm. Foram selecionados campos contendo aproximadamente 15-30 células e o nível de fluorescência emitida por cada célula decorrente do aumento da concentração do Ca^{2+} intracelular foi avaliado através do programa LSM 510 (Zeiss).

8. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO ATRAVÉS DE MICROSCOPIA CONFOCAL

8.1 - Curva Cumulativa de ACh

O meio de cultura DMEM em que as células estavam foi trocado pela solução fisiológica (vide composição acima) acrescida de DAR-4M-AM (5 μ M, 30 min.) e o seguinte protocolo foi seguido:

- 1) Registro de fluorescência basal por 1 min.
- 2) Adição de veículo ou melatonina 1 nM (1 min.) antes do início das curvas concentração-resposta. A melatonina foi mantida na cultura até o final do experimento.
- 3) Adição cumulativa de veículo ou ACh (0,1 – 1000 μ M, intervalo de 0,5 log₁₀ entre as concentrações). O intervalo entre cada adição foi de 30 segundos.
- 4) Adição do doador de NO, nitroprussiato de sódio (SNP, 10 mM).

8.2 - Decurso Temporal a Agonistas (ACh e BK)

Foram realizados os mesmos procedimentos até as etapas 1 e 2 do protocolo anterior. A seguir, as células foram estimuladas com veículo, ACh (1 mM) ou BK (100 nM) e a produção de NO foi registrada continuamente por 210 segundos. Em seguida, foi adicionado SNP.

8.3 - Produção de Óxido Nítrico Ativado por LPS

Para avaliar o efeito da melatonina sobre a produção de NO induzida por LPS (100 ng/mL) a cultura de células de cerebelo foi incubada em meio DMEM acrescida de L-arginina 10 mM por 1, 2, 3 12 e 24 horas na presença ou na ausência de melatonina (100 nM).

No término de cada tempo com LPS, o meio DMEM foi trocado por solução fisiológica (vide composição acima) contendo DAF-FM (5 μ M, 50 min.). No final dessa incubação, as células foram lavadas com solução fisiológica duas vezes e foram levadas ao microscópio confocal. Para cada placa foram feitos três registros em campos diferentes de 10 segundos cada. No final do terceiro registro foi acrescentado SNP.

Os registros foram realizados com a objetiva de imersão em óleo (40X), sendo utilizado um laser HeNe para excitação do fluoróforo DAR-4M-AM no comprimento de onda de 550 nm e um filtro para emissão em 580 nm (vermelho). Para excitação do fluoróforo DAF-FM foi utilizado um laser argônio no comprimento de onda de 488 nm e um filtro para emissão em 515-530 nm. Foram selecionados campos contendo aproximadamente 15-30 células e o nível de fluorescência emitida por cada célula foi avaliada através do programa LSM 510.

O fluoróforo DAR-4M-AM foi usado nos experimentos iniciais, quando se avaliou a produção de NO induzido por ACh e BK. Depois passou-se a usar o

fluoróforo DAF-FM. Essa medida foi necessária já que o primeiro marcador mostrou estar perdendo efeito, não apresentado a fluorescência esperada.

9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) e foram considerados estatisticamente diferentes quando apresentaram uma variação menor do que 5% ($p < 0,05$).

A fluorescência relativa à produção de NO e de Ca^{2+} foi normalizada pela fluorescência basal, ou seja, antes de qualquer tratamento. A expressão da enzima iNOS e o conteúdo do NFkB no núcleo foram determinados como porcentagem em relação aos controles.

Utilizamos a análise de variância de uma via, seguida do teste de Newman-Keuls para comparar mais de duas médias ou teste t de Student para dois grupos experimentais. As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa GraphPad Prisma versão 5.00 (GraphPad Software®).

Para a análise da curva concentração-resposta obtida no experimento de produção de NO induzida por ACh na ausência ou presença de melatonina foi utilizada a regressão não-linear considerando uma única população de receptores. Foi calculado o valor do parâmetro farmacológico pD_2 (logaritmo negativo da concentração de agonista que promove 50% do efeito máximo) para comparação entre as curvas.

RESULTADOS

1. CARACTERIZAÇÃO DA CULTURA

A cultura foi caracterizada através da técnica de imunocitoquímica com anticorpos para marcação dos neurônios (MAP2 - secundário FITC) e para marcação de astrócitos (GFAP-cy3 conjugado) (figura 3). Para contagem das células foram escolhidos campos aleatórios e foi encontrada uma proporção de 96% de neurônios para 4% de astrócitos. Através da marcação com DAPI podemos observar que todos os núcleos marcados pertencem às células neuronais ou de astrócitos.

Figura 3 - Cultura de células de cerebello de rato - Imunocitoquímica para marcação de proteína associada à microtúbulos (MAP2 - verde) de neurônios, de proteína glial fibrilar ácida (GFAP - vermelha) para marcação de astrócitos e para marcação de DNA (DAPI - azul). A) Células neuronais marcadas em verde e núcleos marcados em azul. B) Mesmo campo, demonstrando astrócitos marcados em vermelho e núcleos em azul. C) Sobreposição das marcações de neurônios, astrócitos e seus respectivos núcleos.

2 - MELATONINA INIBE A NOS CONSTITUTIVA

2.1 - Melatonina Inibe a Produção de NO Induzida por BK e ACh

O efeito da BK (100 nM) sobre a produção de NO foi testada na presença ou ausência de melatonina (100 nM). Foi feito um registro da fluorescência basal, durante 1 min. e, em seguida, foi adicionado veículo ou melatonina. Após mais 1 min. foi feito o estímulo com BK. Bradicinina induziu um aumento percentual de NO acima do basal em cerca de 14% ($13,80 \pm 4,17\%$, $n = 52$) (figura 4), enquanto que, a melatonina inibiu essa produção induzida por BK ($4,5 \pm 2,1\%$, $n = 36$, $p < 0,05$).

Figura 4 - Efeito da melatonina sobre a produção de NO induzida por bradicinina (BK). Após 1 min. de registro basal foi adicionado veículo (controle - círculos cinzas) ou melatonina 1 nM (quadrados laranjas). Bradicinina (100 nM) foi acrescentada 1 min. após a melatonina (60 seg.). Os dados são apresentados como variação percentual da fluorescência no exato momento antes adição de BK. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. do total de células. Controle = 52 e melatonina = 36 células.

Nosso próximo passo foi avaliar se a produção de NO induzida por ACh era passível de modulação por melatonina em cultura de células cerebelar. Para isso, as culturas marcadas com DAR-4M-AM foram incubadas por 1 min. na presença de veículo ou melatonina (1 nM). Em seguida, foram adicionadas doses crescentes de ACh.

A ACh levou a um aumento concentração-dependente do conteúdo intracelular de NO. O efeito 50% foi observado com a concentração de 10 μ M e a resposta máxima com 1 mM ($pD_2 = 5,12 \pm 0,147$)(figura 5). A melatonina (1 nM) reduziu a resposta observada nas concentrações de 1 - 10 μ M de ACh, mas não alterou a resposta a concentrações maiores (figura 5) ($pD_2 = 4,58 \pm 0,14$; $p < 0,05$).

Figura 5 - Efeito da melatonina sobre a produção de NO induzida por acetilcolina (ACh). A curva concentração-resposta foi construída pela adição de doses crescentes de ACh a cada 30 seg. Após 1 min. de registro da fluorescência basal, veículo ou melatonina foi pré-incubado por 1 min. seguido da adição de concentrações crescentes de ACh a cada 30 seg. Os dados são apresentados como variação percentual da fluorescência emitida no exato momento antes da adição do primeiro estímulo. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. do total de células; Controle: $pD_2 = 5,12 \pm 0,15$; $n = 16$ células; melatonina: $pD_2 = 4,58 \pm 0,14$; $n = 23$ células.

A próxima investigação foi avaliar se a melatonina de fato não altera a produção de NO induzida por altas concentrações de ACh. Como o sistema colinérgico é passível de dessensibilização, decidimos avaliar o efeito da melatonina sobre o decurso temporal da produção de NO induzida por uma única concentração de ACh (1 mM) capaz de ativar o efeito máximo (figuras 6 e 7).

A figura 6 mostra a imagem representativa do efeito da ACh (1 mM) na presença ou ausência de melatonina (1 nM). Podemos observar que a ACh aumenta de forma expressiva a fluorescência dada pela marcação com DAR-4M-AM (6B) em relação ao controle (6A). A princípio precisamos comparar o efeito da melatonina *per se*. Em diversos experimentos, verificamos que o efeito da melatonina não é consistente, podendo não haver alteração ou haver um aumento da detecção de fluorescência relativa ao NO. Ao comparar as figuras 6A e 6C observamos um dos casos de aumento da fluorescência dada pela incubação com melatonina. No entanto, o efeito da ACh sobre os valores basais é sempre bem evidenciado por um aumento significativo da fluorescência basal (figura 6B). A produção de NO por células incubadas simultaneamente com melatonina e ACh foi reduzida em relação às células incubadas apenas com ACh (figura 6D). Ao final do experimento adicionamos SNP (1 mM) para obter a reatividade máxima do sistema.(figura 6E).

Figura 6 - Imagem representativa do aumento de fluorescência emitida pelo NO marcado por DAR-4M-AM. Após 1 min. de leitura basal foi adicionado melatonina ou seu veículo. Em seguida, foi adicionado veículo de ACh ou ACh (1mM). A) Controle (veículo de melatonina + veículo de ACh); B) Veículo de melatonina + ACh; C) Melatonina + veículo de ACh D) Melatonina + ACh; E) SNP adicionado ao final do experimento.

O decurso temporal do aumento de NO induzido pela ACh e o efeito da melatonina são mostrados de forma quantitativa na figura 7. A ACh promove um aumento da produção de NO que se estabiliza em cerca de 50 % acima do basal ($52,52 \pm 18,26\%$, $n=37$ células) e a melatonina inibe esse efeito para cerca de 10% acima do basal ($8,89 \pm 6,1\%$, $n=28$ células). A análise estatística realizada

a partir da média das células de dois experimentos no tempo de 190 seg. mostra uma redução significativa da produção de NO induzida por ACh 1 mM na presença de melatonina.

Esses resultados indicam que se houver uma administração acumulada de concentração de ACh ocorre a dessensibilização do sistema, mas de forma imediata, a melatonina tem capacidade de bloquear o efeito de concentrações que induzem resposta máxima na produção de NO.

Figura 7 - Efeito da melatonina sobre a produção de NO induzida por ACh. Após 1 min. de registro basal foi adicionado veículo (controle - círculos cinzas) ou melatonina 1 nM (quadrados laranjas). A ACh (1 mM) foi acrescentada 1 min. após a melatonina e a fluorescência foi registrada até 210 seg. Os dados são apresentados como variação percentual da fluorescência emitida no exato momento antes da adição de ACh. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. do total de células; controle: $52,52 \pm 18,26\%$, $n=37$ células (2 placas); melatonina: $8,89 \pm 6,1\%$, $n=28$ células (2 placas).

2.2 – Melatonina inibe o influxo de Ca^{2+} intracelular induzida por ACh

A ativação da NOS constitutiva depende do aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular para que haja ativação do complexo Ca^{2+} -calmodulina. Desta forma, avaliamos o efeito da melatonina sobre o aumento de Ca^{2+} induzido por ACh. Neste experimento, as células marcadas com Fluo3-AM foram incubadas durante 1 min. com veículo ou melatonina (1 nM) e foi feita leitura da fluorescência basal. Em seguida, as células foram estimuladas com veículo de ACh ou ACh 1 mM. A ACh promoveu um aumento transiente da concentração de Ca^{2+} intracelular (resposta máxima $591,70 \pm 41,01\%$; $n = 3$, 42 células), enquanto que, a melatonina inibiu significativamente esse aumento (resposta máxima $219,69 \pm 15,07\%$; $n = 3$, 26 células; $p < 0,05$) (figura 8). A melatonina *per se* não alterou os níveis basais da concentração de Ca^{2+} intracelular, assim como o uso dos veículos.

Figura 8 - Efeito da melatonina sobre o influxo de Ca^{2+} induzido por ACh. Após 1 min. de leitura basal foi adicionado veículo de melatonina (símbolos preto e cinza) ou melatonina 1 nM (símbolos verdes escuro e claro). Após mais 1 min. ACh (1 mM) foi adicionada (símbolos preto e verde escuro). Os dados são apresentados como variação percentual da fluorescência emitida no exato momento antes da adição de ACh (60 seg.). Os valores representam a média $\pm$ e.p.m: Controle (Veículo + ACh, preto) (resposta máxima = $591,7 \pm 41,01$, $n = 3$, 42 células); melatonina + ACh (verde escuro) (resposta máxima = $219,69 \pm 15,07$, $n = 3$, 26 células). Diferença entre as repostas máximas apresenta * $p < 0,05$, teste t de Student.

3 - MELATONINA INIBE A *i*NOS INDUZIDA POR LPS

Para investigar o efeito da melatonina sobre a *i*NOS, as células foram ativadas com LPS (100 ng/mL). Inicialmente determinamos a presença de receptores TLR-4, que são os responsáveis pelo reconhecimento deste lípido proveniente de bactérias gram-negativas. Posteriormente, caracterizamos a presença e o efeito da melatonina sobre NF κ B, fator de transcrição responsável pela indução da *i*NOS. Finalmente, mostramos que a melatonina é capaz de

bloquear a expressão da iNOS em células granulares de cerebelo e a produção de NO.

3.1 - Expressão do Receptor Toll-like 4 na Cultura de Células de Cerebelo

Nossa primeira estratégia foi avaliar a presença do receptor TLR-4 em cultura de células de cerebelo por imunocitoquímica, indicando que essas células possuem receptores para LPS. Foi realizada uma curva de diluição para o anticorpo primário (1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000) e a figura 9 mostra a melhor diluição observada (1:50).

Figura 9 - Expressão de TLR-4 em cultura de células de cerebelo. (A) Controle negativo realizado na ausência de anticorpo primário. (B) Imunocitoquímica utilizando anticorpo primário contra TLR-4 (diluição 1:50) e anticorpo secundário conjugado ao fluorescente *Texas Red* (diluição 1:400).

3.2 - Fator de transcrição NFκB

3.2.1 - Identificação das Subunidades do Fator de Transcrição NFκB Presentes na Cultura de Células de Cerebelo

A produção de NO induzida por LPS é dependente da via do fator de transcrição NFκB. Assim, nosso primeiro passo foi avaliar as subunidades do NFκB presentes no núcleo das células granulares de cerebelo de rato através de ensaio de “super shift” na presença ou ausência de melatonina (100 nM) (figura 10).

Como visto anteriormente, o NFκB possui diversas subunidades, sendo que, a p50, RelA, cRel e p52 são as principais subunidades encontradas em mamíferos. Neste trabalho, utilizamos anticorpos para p50 e RelA por serem as subunidades mais abundantes no SNC (Kaltschmidt *et al.*, 1994). A figura 10 apresenta o “super-shift” dos complexos que se ligaram aos anticorpos em extratos nucleares de células controles (esquerda) ou tratadas previamente com melatonina (direita). Na primeira coluna de cada grupo estão apresentados os controles sem adição de anticorpo, na segunda e terceiras colunas os extratos foram tratados com anticorpos para p50 ou RelA, respectivamente. Nas colunas sem anticorpo podemos ver a presença de quatro complexos; na segunda coluna de cada grupo é possível ver o “super-shift” e o desaparecimento dos dois primeiros complexos, indicando que esses dois complexos possuem a subunidade p50. Já na terceira coluna, há um “super-shift” menos proeminente

que o anterior e o desaparecimento do primeiro complexo apenas, indicando que esse contém a subunidade RelA. Esses resultados sugerem que em cultura de células granulares de cerebelo de rato há um heterodímero p50RelA (complexo 1) e um homodímero p50p50 (complexo 2). Os demais complexos podem ser inespecíficos ou formados por outras subunidades do NFkB. A melatonina não altera o conteúdo e o padrão de expressão dos dímeros de NFkB.

Figura 10 - Identificação das subunidades do NFkB presentes em cultura de células granulares de cerebelo de rato na presença ou na ausência de melatonina. As três primeiras colunas (esquerda) são extratos de células controle e as três últimas (direita) são extratos de células tratadas previamente com melatonina (100 nM, 30 min.). A primeira coluna de cada grupo é o controle (sem anticorpo), a segunda possui anticorpo para p50 (Ac-p50) e a terceira anticorpo para RelA (Ac-RelA). Na presença dos anticorpos é possível observar o “super-shift”, ou seja, a conjugação do anticorpo à subunidade correspondente. O controle negativo é feito na ausência do extrato nuclear; C1: complexo 1 (p50RelA); C2: complexo 2 (p50p50); C3 e C4: complexos inespecíficos ou outras subunidades do NFkB.

3.2.2 Efeito da Melatonina Sobre a Translocação do Fator de Transcrição NFkB Induzido por LPS

A translocação do fator de transcrição NFkB ao núcleo foi avaliada em extratos nucleares de células granulares de cerebelo tratadas com LPS (100 ng/mL, 0,5, 1 ou 12 h) na presença ou ausência de melatonina (100 nM) (figura 11). O LPS aumenta o conteúdo do dímero p50RelA em todos os tempos de incubação analisados: 0,5 h ($155,5 \pm 14,0\%$; $n = 4$), 1 h ($181,4 \pm 19,4\%$; $n = 3$) e 12 h ($266,5 \pm 42,9\%$, $n = 3$). Em relação ao dímero p50p50, o LPS promove um aumento do conteúdo nuclear somente para os tempos de 0,5 h e 12 h: 0,5 h ($685,1 \pm 263,3\%$; $n = 4$) e 12 h ($242,3 \pm 64,5\%$; $n = 3$)

A melatonina inibe a translocação nuclear do NFkB induzido por LPS em todos os tempos analisados para o dímero p50RelA. Para o dímero p50p50, esse efeito é observado também nos tempos em que LPS foi capaz de induzir a translocação (0,5 h e 12 h) (figura 11).

Figura 11 – Translocação das subunidades do NFkB induzido por LPS na presença ou na ausência de melatonina em cultura de células granulares de cerebelo de rato. Análise densitométrica dos dois dímeros identificados do NFkB (p50RelA e p50p50) presente nos núcleos das células granulares de cerebelo de rato incubadas por 0,5, 1 ou 12 h com LPS (100 ng/mL) na presença ou ausência de melatonina (100 nM). Os dados estão apresentados como média $\pm$ e.p.m. da porcentagem em relação ao controle (barra branca). Número amostral indicado em cada barra. *, # $p < 0,05$ em relação ao controle e em relação ao tratamento com LPS, respectivamente (*One-way* ANOVA).

3.3 - Efeito da Melatonina Sobre a Expressão da Enzima iNOS Induzida por LPS

Nosso próximo passo foi avaliar a capacidade da melatonina em modular a expressão da iNOS induzida pelo LPS. As células foram tratadas com LPS (100 ng/mL) na presença ou não de melatonina (100 nM) por 1 ou 2 h. Como esperado, LPS aumentou significativamente a expressão de iNOS, enquanto que, a melatonina (100 nM) inibiu o efeito do LPS (figuras 12 e 13).

Figura 12 – Imagem representativa da expressão de iNOS em culturas de células de cerebello. As células foram incubadas com LPS 100 ng/mL ou veículo na presença ou ausência de melatonina 100 nM por 1 h (A-D) ou 2 h (E-H). (A e E) controles; (B e F) melatonina; (C e G) LPS, (D e H) melatonina + LPS. A expressão da iNOS foi detectada por imunocitoquímica utilizando anticorpo primário anti-iNOS e anticorpo secundário conjugado ao fluorescente *Texas Red* (vermelho). Resultado representativo de três experimentos para cada tempo.

A quantificação da expressão da enzima iNOS (figura 13) mostra de forma mais objetiva que o LPS aumenta a expressão da iNOS em cerca de 130% para 1 h e de 100% para 2 h. A melatonina reverte o efeito do LPS, sendo mais significativo após 2 h de incubação, já que após 1 h ainda há diferença estatística em relação ao controle. Após 1 h de incubação com melatonina há uma diminuição estatisticamente significativa (cerca de 50%) sobre a produção de NO. No entanto, após duas horas, a melatonina promove um aumento na produção de NO em cerca de 30%.

Figura 13 – Melatonina inibe o aumento da expressão da iNOS induzido por LPS em cultura de células de cerebelo de rato. As células foram incubadas com LPS (100 ng/mL) na presença ou não de melatonina (100 nM) por 1 ou 2 h. Dados expressos como média $\pm$ e.p.m. da porcentagem de fluorescência emitida pelo controle. O número de células representado no interior das colunas foi obtido a partir de 3-4 experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado ao controle; # $p < 0,05$ comparado ao tratamento com LPS (*One-way ANOVA*).

3.4 - Efeito da Melatonina Sobre a Produção de NO Induzida por LPS

O LPS induz um aumento da expressão da enzima iNOS e este efeito é inibido pela melatonina. Nosso próximo passo foi avaliar se a melatonina teria o mesmo efeito sobre a produção de NO ativada por LPS. Dessa forma, incubamos as células com LPS (100 ng/mL) por 1, 2, 3, 12 e 24 h na presença ou ausência de melatonina (100 nM). O LPS induz um aumento da produção de NO em todos os tempos analisados, sendo que este aumento é maior nas três primeiras horas (cerca de 300 %). Após 12 h a produção de NO reduz, porém é

mantido constante e maior do que no controle. Até três horas de incubação, a melatonina *per se* inibe a produção de NO. A melatonina reverte o efeito do LPS em todos os tempos avaliados (figura 14).

Figura 14 - Melatonina inibe o aumento da produção de NO induzido por LPS em cultura de células de cerebelo de rato. As células foram incubadas com LPS (100 ng/mL) na presença ou ausência de melatonina (100 nM) por 1, 2, 3, 12 ou 24 h. Controle (preto), Melatonina (verde), LPS (azul), LPS + Melatonina (laranja). Dados expressos como média $\pm$ e.p.m. da porcentagem de fluorescência emitida pelo controle (n = 20-60 células). * $p < 0,05$ em relação ao controle (teste *t* de Student).

DISCUSSÃO

O NO foi descoberto na década de 1980 como um importante sinalizador endógeno e, desde então, tem sido atribuído a esta molécula funções tanto fisiológicas como fisiopatológicas (Bishop & Anderson, 2005). Acredita-se que a diferença de concentração e o tipo de enzima que está atuando determinem a função do NO. No SNC é conhecida a existência das três isoformas, mas ainda existe discussão sobre as funções das mesmas. De uma forma geral, as isoformas constitutivas (eNOS e nNOS) estão relacionadas a respostas fisiológicas (neuroplasticidade, neurogênese, modulação de sinapses, entre outros) e a isoforma induzida (iNOS) à respostas fisiopatológicas. Esta isoforma tem sido relacionada às doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, por exemplo (Esplugues, 2002; Bishop & Anderson, 2005). Nossos resultados indicam que a melatonina é capaz de modular a produção de NO ativada por agonistas endógenos (ACh e BK), que ativam a NOS constitutiva (Lück *et al.*, 2000; Blottner & Luck, 2001; Tamura *et al.*, 2006; Kuhr *et al.*, 2010) em cultura de células granulares de cerebelo. Além disso, pudemos demonstrar que a melatonina modula a produção de NO induzida por agente patogênico (LPS) e que existe um forte indício de que a via do fator de transcrição NFkB esteja envolvida.

1 - CARACTERIZAÇÃO DA CULTURA

A cultura de células de cerebelo utilizada como modelo de estudo nesse trabalho é uma cultura com predominância de células granulares (96 %) e uma

porcentagem menor de astrócitos (4 %) (figura 3), corroborando os dados de Burgoyne e Cambray-Deakin (1988). As células granulares estão entre os menores e mais numerosos neurônios no cérebro (Llinas *et al.*, 2004). Devido a essa característica, essa cultura tem sido amplamente utilizada como modelo para estudos de sobrevivência celular (Mason *et al.*, 1999; Ciani *et al.*, 2002; Misiti *et al.*, 2006), vias de sinalização (Lilienbaum & Israël, 2003), desenvolvimento (Guerrini *et al.*, 1995; Kokubo *et al.*, 2009) e funcionalidade (Liu *et al.*, 2007; Lax, 2008) de neurônios em cultura.

2 - MELATONINA MODULA ATIVIDADE DA NOS CONSTITUTIVA

A NOS constitutiva é ativada pelo complexo Ca^{2+} -calmodulina na dependência de um aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} (Alderton *et al.*, 2001). Neste trabalho usamos os agonistas ACh e BK para ativar a NOS constitutiva. Verificamos que a ACh induz o aumento de cálcio intracelular e a BK, através da ativação de receptor acoplado à proteína G_q , libera cálcio intracelular através da via de sinalização PLC- IP_3 nas células granulares do cerebelo (Billups *et al.*, 2006). Além disso, já foi verificado a presença dos receptores de BK (B_2) em cerebelo de rato (Chen *et al.*, 2000). Ambos agonistas levaram a um aumento da produção de NO na cultura de células de cerebelo e a melatonina inibiu esse efeito.

No caso da ACh, a adição de concentrações cada vez maiores promove um aumento gradual da produção de NO. A princípio, quando observamos

esta curva concentração-resposta, deduzimos que a melatonina inibe somente concentrações intermediárias de ACh (1-10 μ M). No entanto, essa aparente perda de atividade da melatonina pode ser um artefato de técnica, visto que, esta indolamina inibe o efeito da concentração que promove o efeito máximo (1 mM) na produção de NO. A perda de atividade da melatonina pode ser explicada por metabolização local, um dos exemplos é a reação com radical hidroxila, gerando o produto 3-hidroxi-melatonina cíclica (Tan *et al.*, 1998).

A inibição da mobilização de Ca^{2+} intracelular por melatonina já foi discutida em outros modelos celulares (células de hipófise, gônada e endotélio de rato), porém, ainda não há um mecanismo de ação definido (Vanecek, 1998; Dubocovich & Markouska, 2005; Silva *et al.*, 2007). Na cultura de células granulares de cerebelo, a melatonina (1 nM) inibe o aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular induzido por ACh (1 mM). Esse deve ser o mecanismo pelo qual essa indolamina promove a diminuição da produção de NO, já que, a atividade da NOS constitutiva depende da interação com o complexo Ca^{2+} -calmodulina.

Em 1997, Pozo e colaboradores haviam proposto que o bloqueio da atividade da NOS constitutiva por melatonina em homogenato de cerebelo de rato, seria devido à interação dessa indolamina com o complexo Ca^{2+} -calmodulina. No entanto, nossos dados, em conjunto com os dados de Tamura e colaboradores (2006) e de Silva e colaboradores (2007) indicam que o efeito da melatonina se dá na inibição do aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular.

O aumento de Ca^{2+} intracelular se dá por dois mecanismos básicos: entrada através de canais iônicos dependentes de voltagem ou mobilização de estoques intracelulares por IP_3 oriundo da ativação da PKC que, por sua vez, é ativada por receptores acoplados à proteína G (Hoffman & Taylor, 2001). Em cultura de células endoteliais, a melatonina bloqueia a atividade da eNOS quando Ca^{2+} é mobilizado a partir do retículo endoplasmático, mas não quando entra através de canais operados por receptores (Tamura *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2007). Sendo assim, podemos supor que o efeito da melatonina observado na cultura de células granulares de cerebelo sobre a produção de NO e o aumento de Ca^{2+} intracelular induzido por ACh, seja mediada por mAChR, que são receptores metabotrópicos. Um outro dado a favor de uma ação muscarínica é a afinidade aparente medida através da curva concentração resposta de ACh, que é maior que a observada para colinoceptores nicotínicos (Carneiro & Markus, 1990). Esse dado não pode ser confirmado, pois a incubação das células com antagonista muscarínico (atropina) causou morte celular. Contudo, não podemos excluir uma participação de nAChRs do subtipo α_7 , já que estes estão presentes nas células cerebelares (Renó *et al.*, 2004).

A compreensão do efeito da melatonina sobre a atividade da BK no SNC é uma área ainda não explorada. A BK nesse sistema pode agir como moduladora e/ou neurotransmissora (Snyder, 1980; Yau *et al.*, 1986). Está envolvida na produção de interleucina-6 através da ativação da via do NF κ B (Schwaninger *et al.*, 1999), indução e manutenção da febre (Rao & Bhattacharya, 1988; Coelho *et al.*, 1997) e dor (Pesquero *et al.*, 2000). Nossos resultados abrem

perspectiva para novos estudos do efeito da melatonina sobre atividade de receptores de BK no SNC.

Por fim, o NO é um importante sinalizador do SNC e sua produção pela NOS constitutiva está relacionada à modulação da atividade neuronal. Em cultura de células de cerebelo de rato, concentrações de melatonina compatíveis com o pico noturno no líquido cefalorraquidiano inibe a produção de NO induzida por ACh e BK, por um mecanismo dependente do aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular. Esse efeito da melatonina nos permite sugerir que a via de sinalização mediada pelo NO apresente uma variação ao longo do dia.

3 - MELATONINA MODULA ATIVIDADE DA iNOS

As células granulares de cerebelo em cultura expressam TLR-4, indicando que estão instrumentadas para responder às proteínas virais, HSPs (Takeda *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2005; Takeda & Akira, 2005), $A\beta$ (Udan *et al.*, 2008) e ao LPS (Akira & Takeda, 2004). Apesar de já ter sido demonstrado que diversas áreas do cérebro como: córtex parietal, hipocampo e hipotálamo (Rolls *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2009; Milanski *et al.*, 2009) expressam TLR-4, essa é a primeira demonstração da presença desses receptores em cultura de células granulares de cerebelo.

O LPS, ao se ligar ao TLR-4 ativa a via de sinalização do fator de transcrição NF κ B (Akira & Takeda, 2004). Nas células granulares de cerebelo o

NFKB está presente constitutivamente, conforme descrito anteriormente (Kaltschmidt *et al.*, 1994; Lilienbaum & Israël, 2003). Através de “supershift” verificamos que as subunidades presentes são p50 e RelA formando os dímeros de NFKB p50RelA e p50p50. A expressão de múltiplos dímeros da família do NFKB tem sido descrita em diferentes células do SNC, contudo, os dímeros mais comuns são esses citados (Meffert & Baltimore, 2005).

As células incubadas com LPS apresentam um conteúdo nuclear do dímero de NFKB p50RelA significativamente maior do que no grupo controle em todos os tempos analisados. Este dímero contém o domínio de transativação, necessário para desencadear a transcrição de vários genes responsáveis pela resposta inflamatória, incluindo o gene da iNOS (Hayden & Ghosh, 2008). Quanto ao dímero p50p50, o aumento da translocação nuclear induzido por LPS tem um aumento estatisticamente significativo nos tempos de 0,5 h e 12h. O aumento do conteúdo nuclear do dímero p50p50 pode estar inibindo a expressão de alguns genes, mas não o da enzima iNOS, como será discutido adiante.

Para ambos os dímeros a melatonina reverte o efeito do LPS quando este foi observado, a exemplo do que foi verificado em outros modelos, tais como: macrófagos de murino (Gilad *et al.*, 1998) e cultura de células endoteliais de rato (Tamura *et al.*, 2009). A incubação com melatonina somente, não altera os níveis basais dos dímeros de NFKB na cultura de células granulares de cerebelo. Essa expressão constitutiva do NFKB é importante para manutenção das atividades neuronais, tais como sinapses e plasticidade neural (Meffert & Baltimore, 2005),

além de ser essencial para a sobrevivência celular (Lilienbaum & Israël, 2003). A atividade basal é mantida através do aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular estimulada por agentes que promovem despolarização (Lilienbaum & Israël, 2003; Meffert *et al.*, 2003). A incubação com melatonina não altera a atividade basal do NF κ B, assim como também não altera os níveis basais de Ca^{2+} na cultura de células de cerebelo como foi mostrado no presente trabalho.

A escolha da dose de LPS usada foi um processo interessante que merece ser comentado nesta discussão. Na literatura são encontradas concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$ (Sato *et al.*, 1996) e 200 ng/mL (Mezghani-Abdelmoula *et al.*, 2004) para ativar cultura de células granulares de cerebelo. No primeiro trabalho citado o LPS era de *Escherichia coli*, enquanto que, no segundo caso o LPS era extraído de *Pseudomonas fluorescense*. Em nosso laboratório, utilizamos o LPS extraído de *E. coli* na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ para ativar a via do fator de transcrição NF κ B, em culturas de células endoteliais (Tamura *et al.*, 2009) e de pinealócitos (Ferreira, comunicação pessoal). Iniciamos o teste pela concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, mas notamos um grande número de células mortas e, por isso, optamos por usar uma concentração mais baixa (100 ng/mL) e que reproduzisse as respostas esperadas. Os efeitos do LPS são específicos, não apenas segundo a origem da bactéria da qual é extraído, mas também de acordo com o tipo de célula testado.

Um dos genes ativados pelo NF κ B é o da enzima iNOS. Desta forma, avaliamos a expressão dessa enzima por imunocitoquímica em culturas ativadas por LPS, na presença ou ausência de melatonina. Como previsto, o LPS

aumenta a expressão da iNOS tanto para 1 h quanto para 2 h de incubação e este efeito é inibido quando melatonina está presente.

Em relação à incubação apenas com melatonina, observamos que, após a primeira hora há uma diminuição da expressão da enzima. No entanto, após duas horas há um aumento estatisticamente significativo. Como mostrado, a incubação com melatonina não altera a expressão de NFkB nos tempos avaliados, porém, dados preliminares (não apresentados) mostram que, em 2 h, a melatonina promove um aumento da translocação nuclear do NFkB. Esse aumento da atividade do NFkB pode ser responsável pelo aumento da expressão de iNOS na presença de melatonina.

É de se esperar que o bloqueio do efeito do LPS por melatonina sobre a expressão de iNOS leve a uma diminuição da produção de NO, como pode ser constatado em nossos resultados. O LPS leva a um aumento da produção de NO e a melatonina reverte esse efeito.

A respeito do efeito da melatonina *per se*, novamente, merece uma discussão. Nas três primeiras horas de incubação, a melatonina inibe a produção de NO em relação ao controle. Ao compararmos o efeito da melatonina sobre a produção de NO e a expressão de iNOS, a princípio, podemos pensar que há uma relação controversa. No entanto, podemos formular a hipótese de que a melatonina é capaz de modular a produção basal de NO, através da diminuição da atividade da NOS constitutiva. Essa diminuição da produção de NO serve como um sinal para que a célula aumente a expressão da enzima iNOS, na tentativa de regular a produção de NO basal. É

necessário lembrar que, assim como o fator de transcrição NFkB, o NO é essencial para manutenção da atividade de neurônios (Bishop & Anderson, 2005). Essa hipótese é fundamentada no fato de que o próprio NO é capaz de modular a translocação nuclear do fator de transcrição NFkB. Todavia, esse efeito do NO na atividade do NFkB é bastante controverso. Óxido nítrico pode ativar a translocação nuclear do NFkB em alguns tipos celulares, como: em cultura de neurônios estriatais de rato (Simpson & Morris, 1999), células da pele de camundongo (Chun *et al.*, 2004) e em células mesangiais humanas (Díaz-Cazorla *et al.*, 1999), enquanto que, em outros tipos, exerce um efeito inibitório: macrófago de murino (de la Torre *et al.*, 1999), cultura de células endoteliais humana (Peng *et al.*, 1995).

Em suma, as células granulares de cerebelo estão instrumentadas para responder ao LPS. Essa endotoxina bacteriana promove um aumento da expressão da enzima iNOS através da ativação da translocação nuclear do fator de transcrição NFkB. A melatonina inibe esta via e, portanto, a expressão da enzima e a produção de NO induzidas por LPS. Nossos resultados mostram que a melatonina participa da modulação da resposta à agressão em cultura de células predominantemente neuronais.

CONCLUSÕES

A cultura de células granulares de cerebelo de rato, por ser bastante homogênea, é um modelo de cultura de neurônios bastante adequado para entender os efeitos da melatonina sobre a produção de NO induzida por diferentes agentes, sejam fisiológicos ou fisiopatológicos. O presente trabalho mostra que a melatonina é capaz de inibir a atividade das enzimas constitutivas e induzida da NOS em cultura de células de cerebelo de rato. O fato da melatonina inibir o aumento de Ca^{2+} intracelular induzido por ACh é um indicativo do mecanismo pelo qual esta indolamina está atuando na inibição da produção de NO induzida por ACh. A atividade da enzima iNOS e a produção de NO induzida por LPS também são inibidas por melatonina. A inibição da translocação nuclear do fator de transcrição NF κ B induzida por LPS é um forte indicativo do mecanismo de ação da melatonina. Esse estudo indica que a melatonina tem efeito sobre a atividade fisiológica e fisiopatológica do NO. Além disso, este trabalho abre novos campos para o estudo do efeito da melatonina sobre atividade de receptores de BK no SNC.

RESUMO

A melatonina, um derivado da serotonina, é o principal produto da glândula pineal. Pode ser produzida também por diversas células e tecidos extrapineais, como retina, trato gastrointestinal, células do sistema imunológico, entre outros. Nos mamíferos exerce diferentes papéis, sendo que, classicamente, é conhecida por atuar como mediadora química da fase escura. A liberação rítmica desse hormônio para a corrente sanguínea e para o líquido cefalorraquidiano marca o ciclo claro-escuro e as estações do ano para os órgãos internos. Além disso, a melatonina atua como moduladora do sistema imunológico e da inflamação, agente citoprotetora e antioxidante. Os mecanismos de ação também são diversos e variam desde receptores de membrana às interações intracelulares. No presente trabalho mostramos que a melatonina inibe a produção de NO ativado por ACh ou BK em cultura de células granulares de cerebelo. Esses agonistas ativam as NOS constitutivas, que são dependentes do aumento de Ca^{2+} intracelular. A melatonina também bloqueia o aumento de Ca^{2+} intracelular induzido por ACh, sugerindo que, o efeito dessa indolamina sobre a produção de NO ativado por ACh é, provavelmente, um efeito sobre o aumento de Ca^{2+} intracelular. Lipopolissacarídeo da parede de bactéria gram-negativa ativa a transcrição da isoforma induzida NOS. A melatonina inibe a expressão dessa enzima e a produção de NO induzidas pela endotoxina bacteriana. Nossos resultados indicam que esses efeitos são dependentes da inibição da via do fator de transcrição NF κ B. Em resumo, o presente trabalho mostra que a melatonina inibe a atividade da NOS constitutiva e a expressão da NOS induzida. Esses efeitos são dependentes de mecanismos específicos e devem estar relacionados às diferentes funções celulares.

ABSTRACT

Melatonin, a serotonin derivative, is the main product of the pineal gland. Can also be produced by various extra-pineal sites as retina, gastrointestinal tract, immune cells, among others. In mammals it has different roles, and, classically, is known to act as a chemistry mediator of the darkness. The rhythmic release of this hormone into the blood and cerebrospinal fluid marks the light-dark cycle and the seasons to the internal organs. Moreover, melatonin acts as a modulator of the immune system and inflammation, a cytoprotective agent and reduces free radicals formation. The mechanisms of action are also diverse and vary from membrane receptors to intracellular interactions. Here we show that melatonin inhibits the production of NO activated by ACh or BK in cultured cerebellar granule cells. These agonists activate constitutive NOS, which are dependent on increased intracellular Ca^{2+} . Melatonin also blocks acetylcholine-induced Ca^{2+} intracellular increase, suggesting that, this indolamine effects on NO production activated by ACh is, probably, an effect on the increase of intracellular Ca^{2+} . Lipopolysaccharide of gram-negative bacteria wall activates the transcription of inducible NOS isoform. Melatonin inhibits the enzyme expression and NO production in granule cerebellar cells activated with the bacterial endotoxin. Our data shows that these effects are dependent on inhibition of nuclear factor kappa B pathway. In summary, the present work shows that melatonin inhibits constitutive NOS activity and inducible NOS expression. These effects are dependent on specific mechanisms and should be related to different cellular functions.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, C.E., STEVENS, K.E., KEM, W.R. & FREEDMAN, R. (2000). Inhibition of nitric oxide synthase prevents alpha7 nicotinic receptor-mediated restoration of inhibitory auditory gating in rat hippocampus. *Brain Res.*, **877**, 235-344.
- AKIRA, S. & TAKEDA, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.*, **4**, 499-511.
- ALDERTON, W.K., COOPER, C.E. & KNOWLES, R.G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.*, **357**, 593-615.
- ARZUMANIAN, V., STANKEVICIUS, E., LAUKEVICIENE, A. & KEVELAITIS, E. (2003). Mechanisms of nitric oxide synthesis and action in cells. *Medicina*, **39**, 535-541.
- BARGER, S.W. & MATTSON, M.P. (1996). Induction of neuroprotective κ B-dependent transcription by secreted forms of the Alzheimer's β -amyloid precursor. *Brain Research. Molecular Brain Research*, **40**, 116-126.
- BECKMAN, J.S. & KOPPENOL, W.H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiology*, **271**, 1424-1437.
- BENÍTEZ-KING, G. & ANTÓN-TAY, F. (1993). Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia*, **49**, 635-641.
- BENÍTEZ-KING, G., HUERTO-DELGADILLO, L. & ANTÓN-TAY, F. (1991). Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro. *Brain. Res.*, **557**, 289-292.
- BENÍTEZ-KING, G., HUERTO-DELGADILLO, L. & ANTÓN-TAY, F. (1993). Binding of 3H-melatonin to calmodulin. *Life Sci.*, **53**, 201-207.
- BHAKAR, A.L., TANNIS, L.L., ZEINDLER, C., RUSSO, M.P., JOBIN, C., PARK, D.S., MACPHERSON, S. & BARKER P.A (2002). Constitutive nuclear factor-kappa B activity is required for central neuron survival. *J Neuroscience*, **22**, 8466-8475.
- BILLUPS, D., BILLUPS, B., CHALLISS, R.A. & NAHORSKI, S.R. (2006). Modulation of Gq-protein-coupled inositol trisphosphate and Ca^{2+} signaling by the membrane potential. *J Neuroscience*, **26**, 9983-9995.
- BISHOP, A. & ANDERSON, J.E. (2005). NO signalling in the CNS: from the physiological to the pathological. *Toxicology*, **208**, 193-205.
- BLOTTNER, D. & LUCK, G. (2001). Just in Time and Place: NOS/NO System Assembly in neuromuscular Junction Formation. *Microsp Res Tech*, **55**, 171-180.

- BOBBA, A., ATLANTE, A., MORO, L., CALISSANO, P. & MARRA, E. (2007). Nitric oxide has dual opposite roles during early and late phases of apoptosis in cerebellar granule neurons. *Apoptosis*, **12**, 1597-1610.
- BRENMAN, J.E., CHRISTOPHERSON, K.S., CRAVEN, S.E., MCGEE, A.W. & BREDT, D.S. (1996). Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein. *J. Neuroscience*, **16**, 7407-7415.
- BRYAN, N.S., BIAN, K. & MURAD, F. (2009). Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Frontiers in Bioscience*, **14**, 1-18.
- BUBENIK, G.A. (2002). Gastrointestinal Melatonin Localization, Function, and Clinical Relevance. *Digestive Diseases and Sciences*, **47**, 2336-2348.
- BUBENIK, G.A., PANG, S.F., COCKSHUT, J.R., SMITH, P.S., GROVUM, L.W., FRIENDSHIP, R.M. & HACKER, R.R. (2000). Circadian variation of portal, arterial and venous blood levels of melatonin in pigs and its relationship to food intake and sleep. *J Pineal Research*, **28**, 9-15.
- BUBENIK, G.A., PANG, S.F., HACKER, R.R. & SMITH, P.S. (1996). Melatonin concentrations in serum and tissues of porcine gastrointestinal tract and their relationship to the intake and passage of food. *J Pineal Research*, **21**, 251-256.
- BURGOYNE, R. & CAMBRAY-DEAKIN, M. (1988). The cellular neurobiology of neuronal development: the cerebellar granule cell. *Brain Research*, **472**, 77-101.
- CARNEIRO, R.C., MARKUS, R.P. (1990). Presynaptic nicotinic receptors involved in release of noradrenaline and ATP from the prostatic portion of the rat vas deferens. *J Pharmacol Exp Ther.*, **255**, 95-100.
- CARLBERG, C. & WIESENBERG, I. (1995). The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: An unexpected relationship. *J. Pineal Research*, **18**, 171-178.
- CARRILLO-VICO, A., CALVO, J.R., ABREU, P., LARDONE, P.J., GARCIA-MAURINO, S., REITER, R.J. & GUERRERO, J.M. (2004). Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.*, **18**, 537-539.
- CECON, E., FERNANDES, P.A., PINATO, L., FERREIRA, Z.S. & MARKUS, R.P. (2010). Daily variation of constitutively activated nuclear factor kappa B (NFkB) in rat pineal gland. *Chronobiology International*, **27**, 52-67.
- CHEN, E.Y., EMERICH, D.F., BARTUS, R.T. & KORDOWER, J.H. (2000). B2 bradykinin receptor immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol.*, **427**, 1-18.

- CHIK, C., HO, A.K. & BROWN, G.M. (1987). Effect of food restriction on 24-h serum and pineal melatonin content in male rats. *Acta Endocrinology*, **115**, 507-513.
- CHUANG, J.G., MOHAN, N., MELTZ, M.L. & REITER, R.J. (1996). Effect of melatonin on NF-KB DNA-binding activity in the rat spleen. *Cell Biology International*, **20**, 687-692.
- CHUN, K.S., CHA, H.H., SHIN, J.W., NA, H.K., PARK, K.K., CHUNG, W.Y. & SURH, Y.J. (2004). Nitric oxide induces expression of cyclooxygenase-2 in mouse skin through activation of NF-kappaB. *Carcinogenesis*, **25**, 445-454.
- CHUNG, D.W., YOO, K.Y., HWANG, I.K., KIM, D.W., CHUNG, J.Y., LEE, C.H., CHOI, J.H., CHOI, S.Y., YOUN, H.Y., LEE, I.S. & WON, M.H. (2009). Systemic Administration of Lipopolysaccharide Induces Cyclooxygenase-2 Immunoreactivity in Endothelium and Increases Microglia in the Mouse Hippocampus. *Cell Mol Neurobiol.*, no prelo.
- CIANI, E., GUIDI, S., BARTESAGHI, R. & CONTESTABILE, A. (2002). Nitric oxide regulates cGMP-dependent cAMP-responsive element binding protein phosphorylation and Bcl-2 expression in cerebellar neurons: implication for a survival role of nitric oxide. *J Neurochem.*, **82**, 1282-1289.
- COELHO, M.M., OLIVEIRA, C.R., PAJOLLA, G.P., CALIXTO, J.B. & PELÁ, I.R. (1997). Central involvement of kinin B1 and B2 receptors in the febrile response induced by endotoxin in rats. *Br J Pharmacol.*, **121**, 296-302.
- COON, S.L., WELLER, J.L., KORF, H.W., NAMBOODIRI, M.A., ROLLAG, M. & KLEIN, D.C. (2001). cAmp regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT, EC 2.3.1.87): a new cell line (1E7) provides evidence of intracellular AANAT activation. *J Biol Chem*, **276**, 24097-24107.
- de ALMEIDA-PAULA, L.D., COSTA-LOTUFO, L.V., FERREIRA, Z.S., MONTEIRO, A.E.G., ISOLDI, M.C., GODINHO, R.O. & MARKUS, R.P. (2005). Melatonin modulates rat myotube-acetylcholine receptors by inhibiting calmodulin. *Eur. J. Pharmacol.*, **525**, 24-31.
- DELATORRE, A., SCHROEDER, R.A., PUNZALAN, C. & KUO, P.C. (1999). Endotoxin-mediated S-nitrosylation of p50 alters NF-kappa B-dependent gene transcription in ANA-1 murine macrophages. *J Immunol.*, **162**, 4101-4108.
- DENNINGER, J.W. & MARLETTA, M.A. (1999). Guanylate cyclase and the cNO/cGMP signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1411**, 334-350.

- DÍAZ-CAZORLA, M., PÉREZ-SALA, D. & LAMAS, S. (1999). Dual effect of nitric oxide donors on cyclooxygenase-2 expression in human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.*, **10**, 943-952.
- DINERMAN, J.L., DAWSON, T.M., SCHELL, M.J., SNOWMAN, A. & SNYDER, S.H. (1994). Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 4214-4218.
- DUBOCOVICH, M.L. & MARKOWSKA, M. (2005). Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*, **27**, 101-110.
- DUBOCOVICH, M.L. (1983). Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature (Lond)*, **306**, 782-784.
- EBISAWA, T., KARNE, S., LERNER, M.R. & REPPERT, S.M. (1994). Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 6133-6137.
- ESPLUGUES, J.V. (2002). NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br J Pharmacol.*, **135**, 1079-1095.
- FERNANDES, P.A., BOTHOREL, B., CLESSE, D., MONTEIRO, A.W., CALGARI, C., RAISON, S., SIMONNEAUX, V. & MARKUS, R.P. (2009). Local corticosterone infusion enhances nocturnal pineal melatonin production in vivo. *J. Neuroendocrinol.*, **21**, 90-97.
- FERNANDES, P.A., CECON, E., MARKUS, R.P. & FERREIRA, Z.S. (2006). Effect of TNF-alpha on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a 'feedback' of the immune response on circadian timing. *J. Pineal Res.* **41**, 344-350.
- FERNYHOUGH, P., SMITH, D.R., SCHAPANSKY, J., PLOEG, R.V.D., GARDINER, N.J., TWEED, C.W., KONTOS, A., FREEMAN, L., PURVES-TYSON, T.D. & GLAZNER, G.W. (2005). Activation of Nuclear Factor-B via Endogenous Tumor Necrosis Factor α regulates survival of axotomized adult sensory neurons. *The Journal of Neuroscience*, **25**, 1682-1690.
- FERREIRA, Z.S. & MARKUS, R.P. (2001). Characterisation of P2Y(1)-like receptor in cultured rat pineal glands. *Eur J Pharmacol*, **415**, 151-156.
- FERREIRA, Z.S., CIPOLLA-NETO, J. & MARKUS, R.P. (1994). Presence of P₂-purinoceptors in the rat pineal gland. *Brit J Pharmacol*, **112**, 107-110.
- FERREIRA, Z.S., FERNANDES, P.A.C.M., DUMA, D., ASSREUY, J., AVELLAR, M.C.W. & MARKUS, R.P. (2005). Corticosterone modulates noradrenaline-induced

- melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappaB. *J Pineal Res*, **38**, 182-188.
- FERREIRA, Z.S., GARCIA, C.R., SPRAY, D.C. & MARKUS, R.P. (2003). P2Y(1) receptor activation enhances the rate of rat pinealocyte-induced extracellular acidification via a calcium-dependent mechanism. *Pharmacology*, **69**, 33-37.
- FINOCCHIARO, L.M., ARTZ, E.S., FERNÁNDES, S., CRISCUOLO, M., FINKIELMAN, S. & NAHMOD, V.E. (1988). Serotonin and melatonin synthesis in peripheral blood mononuclear cells: Stimulation by interferon-gamma as part of the immunomodulatory pathway. *J. Interferon Research*, **8**, 705-716.
- FUKUNAGA, K., HORIKAWA, K., SHIBATA, S., TAKEUCHI, Y. & MIYAMOTO, E. (2002). Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II-Dependent Long-Term Potentiation in the Rat Suprachiasmatic Nucleus and Its Inhibition by Melatonin. *Journal of Neuroscience Research*, **70**, 799-807.
- FURCHGOTT R.F. & VANHOUTTE, P.M. (1989). Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.*, **3**, 2007-2018.
- FURCHGOTT, R.F., & ZAWADZKI, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**, 373-376.
- GANGULY, S.; GASTEL, J.A.; WELLWE, J.L.; SCHAWARTZ, C., JAFFE, H., NAMBOODIRI, M.A., COON, S.L., HICHMAN, B., ROLLAG, M., OBSIL, T., BEAUVERGER, P., FERRY, G., BOUTIN, J.A. & KLEIN, D.C. (2001). Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 8083-8088.
- GARTHWAITE, J. (2008). Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci.*, **27**, 2783-802.
- GASTEL, J.A., ROSEBOOM, P.H., RINALDI, P.A., WELLER, J.L. & KLEIN, D.C. (1998). Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin n-acetyltransferase regulation. *Science*, **279**, 1358-1360.
- GILAD, E., WONG, H.R., ZINGARELLI, B., VIRÁG, L., O'CONNOR, M., SALZMAN, A.L. & SZABÓ, C. (1998). Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFkappaB activation. *FASEB J*, **12**, 685-693.
- GOVERS, R. & RABELINK, T.J. (2001). Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **280**, F193-F206.

- GRILLI, M. & MEMO, M. (1999). Nuclear Factor-kB/Rel Proteins: A point of convergence of signalling pathway relevant in neuronal function and dysfunction. *Biochemical Pharmacology*, **57**, 1-7.
- GUERRINI, L., BLASI, F. & DENIS-DONINI, S. (1995). Synaptic activation of NF-kappa B by glutamate in cerebellar granule neurons in vitro. *PNAS*, **92**, 9077-9081.
- HABERBERGER, R.V., HENRICH, M., LIPS, K.S. & KUMMER, W. (2003). Nicotinic receptor alpha7- subunits are coupled to the stimulation of nitric oxide synthase in rat dorsal root ganglion neurons. *Histochem Cell Biol.*, **120**, 173-181.
- HARDELAND, R. (2005). Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine*, **27**, 111-118.
- HARE, J.M., COLUCCI, W.S. (1995). Role of nitric oxide in the regulation of myocardial function. *Prog Cardiovasc Dis.*, **38**, 155-166.
- HAYDEN, M.S. & GHOSH, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*, **132**, 344-362.
- HECKER, M., MÜLSCH, A. & BUSSE, R. (1994). Subcellular localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase. *J. Neurochem.*, **62**, 1524-1529.
- HOBBS, A.J. (1997). Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol Sci.*, **18**, 484-491.
- HOFFMAN, B.B. & TAYLOR, O. (2001). Neurotransmission: The autonomic and somatic motor nervous system. In: *Goodman & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics*. The McGraw-Hill Companies, Inc., **10th ed.**, pp. 140.
- HUANG, C.C. & HSU, K.S. (2010). Activation of muscarinic acetylcholine receptors induces a nitric oxide-dependent long-term depression in rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex*, **20**, 982-996.
- IGNARRO, L.J. (1991). Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem. Pharmacology*, **41**, 485-490.
- IGNARRO, L.J., BUGA, G.M., WOOD, K.S., BYRNS, R.E. & CHAUDHURI G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, **84**, 9265-9269.
- JETTEN, A.M. (2009). Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl Recept Signal*, **7**, e003.
- JOHNSON, B.J., LE, T.T., DOBBIN, C.A., BANOVIC, T., HOWARD, C.B., FLORES, FDE, M., VANAGS, D., NAYLOR, D.J., HILL, G.R., & SUHRBIER, A. (2005). Heat

- shock protein 10 inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory mediator production. *J Biol Chem.*, **280**, 4037-4047.
- KALTSCHMIDT, B., WIDERA, D. & KALTSCHMIDT, C. (2005). Signaling via NF- κ B in the nervous system. *Biochemica et Biophysica Acta*, **1745**, 287-299.
- KALTSCHMIDT, C., KALTSCHMIDT, B. & BAEUERLE, P.A. (1995). Stimulation of ionotropic glutamate receptors activates transcription factor NF-kappa B in primary neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 9618-9622.
- KALTSCHMIDT, C., KALTSCHMIDT, B., NEUMANN, H., WEKERLE, H. & BAEUERLE, P.A. (1994). Constitutive NF-kappa B activity in neurons. *Mol Cell Biol.*, **14**, 3981-3992.
- KAWASHIMA, K. & FUJII, T. (2003). The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Science*, **74**, 675-696.
- KLEIN, D.C. (1985). Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. In Everet, D. & Clark, D. (eds), *Photoperiodism, Melatonin and the Pineal. Ciba Foundation Symposium 117*. Pittman Press, London, pp. 38-56.
- KLEIN, D.C., COON, S.L.; ROSEBOOM, P.H., WELLER, J.L., BERNARD, M., GASTEL, J.A., ZATZ, M., IUVONE, M., RODRIGUEZ, I.R., BÉGAY, V., FLCON, J., CAHILL, G.M., COSSONE, V.M. & BALER, R. (1997). The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin n-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Progress in Hormone Res*, **52**, 307-358.
- KLEIN, D.C., GANGULY, S., COON, S., WELLER, J.L., OBSIL, T., HICKMAN, A. & DYDA, F. (2002). 14-3-3 Proteins and photoneuroendocrine transduction: role in controlling the daily rhythm in melatonin. *Biochem Soc Trans*, **30**, 365-73.
- KOGLIN, M., VEHSE, K., BUDAEUS, L., SCHOLZ, H. & BEHREND, S. (2001). Nitric oxide activates the beta 2 subunit of soluble guanylyl cyclase in the absence of a second subunit. *J Biol Chem.*, **276**, 30737-30743.
- KOKUBO, M., NISHIO, M., RIBAR, T.J., ANDERSON, K.A., WEST, A.E. & MEANS, A.R. (2009). BDNF-mediated cerebellar granule cell development is impaired in mice null for CaMKK2 or CaMKIV. *J Neuroscience*, **29**, 8901-8913.
- KORTEZOVA, N., SHIKOVA, L. & PAPASOVA, M. (1998). Participation of M1 receptors in NO pathway in cat ileum. *Acta Physiol Pharmacol Bulg.*, **23**, 1-4.
- KUHR, F., LOWRY, J., ZHANG, Y., BROVKOVYCH, V. & SKIDGEL, R.A. (2010). Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. *Neuropeptides*, **44**, 145-154.

- LANZAFAME, A.A., CHRISTOPOULOS, A. & MITCHELSON, F. (2003). Cellular signaling mechanisms for muscarinic acetylcholine receptors. *Receptors Channels.*, **9**, 241-260.
- LAX, P. (2008). Melatonin inhibits nicotinic currents in cultured rat cerebellar granule neurons. *J Pineal Res.*, **44**, 70-77.
- LEE, S.J., LIU, T., CHATTORAJ, A., ZHANG, S.L., WANG, L., LEE, T.M., WANG, M.M. & BORJIGIN, J. (2009). Posttranscriptional regulation of pineal melatonin synthesis in *Octodon degus*. *J Pineal Res.*, **47**, 75-81.
- LERNER, A., CASE, J.D., TAKAHASHI, Y., LEE, T.H. & MORI, W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *Journal American Chemical Society*, **80**, 2587.
- LILIENBAUM, A. & ISRAËL, A. (2003). From Calcium to NF- κ B Signaling Pathways in Neurons. *Molecular and cellular biology*, **23**, 2680-2698.
- LIN, L.H., TAKTAKISHVILI, O. & TALMAN, W.T. (2007). Identification and localization of cell types that express endothelial and neuronal nitric oxide synthase in the rat nucleus tractus solitarii. *Brain Res.*, **1171**, 42-51.
- LIU, LY., HOFFMAN, G.E., FEI, XW., LI, Z., ZHANG, ZH. & MEI, YA. (2007). Delayed rectifier outward K⁺ current mediates the migration of rat cerebellar granule cells stimulated by melatonin. *Journal of Neurochemistry*, **102**, 333-344.
- LLINAS, R.R., WALTON, K.D. & LANG, E.J. (2004). "Ch. 7 Cerebellum". in Shepherd GM. *The Synaptic Organization of the Brain*. update Edition. New York: Oxford University Press.
- LOVENBERG, W., JEQUIER, E. & SJOERDSMA, A. (1967). Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor. *Science*, **155**, 217-9.
- LÜCK, G., HOCH, W., HOPF, C., & BLOTTNER, D. (2000). Nitric oxide synthase (NOS-1) coclustered with agrin-induced AChR-specializations on cultured skeletal myotubes. *Mol Cell Neurosci.*, **16**, 269-281.
- MAESTRONI, G.J., CONTI, A. & PIERPAOLI, W. (1986). 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 Neuroimmunology*, **13**, 19-30.
- MCCORD, C.L. & ALLEN, F.P. (1917). Evidence associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J Exp Zool.*, **23**, 207-224.

- MARKUS, R.P. & TAMURA, E.K. (2009). G protein-coupled receptors and others mechanisms that translate melatonin effects. *In: G protein-coupled receptors: comparative perspectives*. Kerala: Ed. Research Signpost, v. 37, p.93-11.
- MARKUS, R.P., FERREIRA, Z.S., FERNANDES, P.A.C.M. & CECON, E. (2007). The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *Neuroimmunomodulation*, **14**, 126-133.
- MARKUS, R.P., SANTOS, J.M., ZAGO, W. & RENÓ, L.A. (2003). Melatonin nocturnal surge modulates nicotinic receptors and nicotinic induced [3H]glutamate release in rat cerebellum slices. *J Pharmacol Exp Ther.*, **305**, 525-530.
- MARTINS, E., FERREIRA, A.C.F., SKORUPA, A.L., AFECHÉ, S.C., CIPOLLA-NETO, J. & COSTA-ROSA, L.F.B.P. (2004). Tryptophan consumption and indoleamines production by peritoneal cavity macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, **75**: 1116-1121.
- MASON, R.P., LEEDS, P.R., JACOB, R.F., CHRISTOPHER, J.H., ZHANG, K-G., MASON, P.E. & CHUANG, D-M. (1999). Inhibition of Excessive Neuronal Apoptosis by the Calcium Antagonist Amlodipine and Antioxidants in Cerebellar Granule Cells. *Journal of Neurochemistry*, **72**, 1448-1456.
- MATTSON, M.P. & CAMANDOLA, S. (2001). NF- κ B in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *The Journal of Clinical Investigation*, **107**, 247-254.
- MEANS, A.R., CHAFOULEAS, J.G., & TASH, J.S. (1982). Physiological implications of the presence, distribution and regulation of calmodulin in eukaryotic cells. *Physiological Review*, **62**, 1-39.
- MEFFERT, M.K. & BALTIMORE, D. (2005). Physiological functions for brain NF- κ B. *TRENDS in Neurosciences*, **28**, 27-43.
- MEFFERT, M.K., CHANG, J.M., WILTGEN, B.J., FANSELOW, M.S. & BALTIMORE, D. (2003). NF- κ B functions in synaptic signaling and behavior. *Natural Neuroscience*, **6**, 1072-1078.
- MEZGHANI-ABDELMOULA, S., KHÉMIRI, A., LESOUHAITIER, O., CHEVALIER, S., ORANGE, N., CAZIN, L. & FEUILLOLEY, M.G.J. (2004). Sequential activation of constitutive and inducible nitric oxide synthase (NOS) in rat cerebellar granule neurons by *Pseudomonas fluorescens* and invasive behaviour of the bacteria. *Microbiological Research* 159: 355 – 363.
- MILANSKI, M., DEGASPERI, G., COOPE, A., MORARI, J., DENIS, R., CINTRA, D.E., TSUKUMO, D.M., ANHE, G., AMARAL, M.E., TAKAHASHI, H.K., CURI, R., OLIVEIRA, H.C., CARVALHEIRA, J.B., BORDIN, S., SAAD, M.J. & VELLOSO, L.A.

- (2009). Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neuroscience*, **29**, 359-370.
- MISITI, F., CLEMENTI, E., TRINGALI, G., VAIRANO, M., ORSINI, F., PEZZOTTI, M., NAVARRA, P., GIARDINA, B. & POZZOLI, G. (2006). Fragment 31-35 of b-amyloid peptide induces neurodegeneration in rat cerebellar granule cells via bax gene expression and caspase-3 activation. A crucial role for the redox state of methionine-35 residue. *Neurochemistry International*, **49**, 525-532.
- MONCADA, S. & HIGGS, A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.*, **329**, 2002-2012.
- MONCADA, S., HIGGS, A. & FURCHGOTT, R. (1997). International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol. Rev.*, **49**, 137-142.
- MONCADA, S., PALMER, R.M. & HIGGS, E.A. (1989). Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacology*, **38**, 1709-1715.
- MORTANI BARBOSA, E.J., FERREIRA, Z.S. & MARKUS, R.P. (2000). Purinergic and noradrenergic cotransmission in the rat pineal gland. *Eur J Pharmacol.*, **401**, 59-62.
- NAGANO, I., TAKAO, T., NANAMIYA, W., TAKEMURA, T., NISHIYAMA, M., ASABA, K., MAKINO, S., DE SOUZA, E.B. & HASHIMOTO, K. (1999). Differential effects of one and repeated endotoxin treatment on pituitary-adrenocortical hormones in the mouse: role of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. *Neuroimmunomodulation*, **6**, 284-292.
- NEUMANN, M. & NAUMANN, M. (2007). Beyond IkappaBs: alternative regulation of NF-kappaB activity. *FASEB J.*, **21**, 2642-2654.
- NOSJEAN, O., FERRO, M., COGE, F., BEAUVERGER, P., HENLIN, J.M., LEFOULON, F., FAUCHERE, J.L., DELAGRANGE, P., CANET, E. & BOUTIN, J.A. (2000). Identification of the melatonin binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem.*, **275**, 31311-31317.
- OZAKI, Y. & LYNCH, H.J. (1976). Presence of melatonin in plasma and urine of pinealectomized rats. *Endocrinology*, **99**, 641-644.
- PALMER, R.M., FERRIGE, A.G. & MONCADA, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**, 524-526.

- PANDI-PERUMAL S.R., SRINIVASAN, V., MAESTRONI, G.J.M., CARDINALI, D.P., POEGGELER, B. & HARDELAND, R. (2006). Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS Journal*, **273**, 2813-2838.
- PAPADOPOLOU, S., HARTMANN, P., LIPS, K.S., KUMMER, W. & HABERBERGER, R.V. (2004). Nicotinic receptor mediated stimulation of NO-generation in neurons of rat thoracic dorsal root ganglia. *Neurosci Lett.*, **3611**, 32-35.
- PENG, H.B., LIBBY, P., & LIAO, J.K. (1995). Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem.*, **270**, 14214-14219.
- PESQUERO, J.B., ARAUJO, R.C., HEPPENSTALL, P.A., STUCKY, C.L., SILVA, J.A.JR., WALTHER, T., OLIVEIRA, S.M., PESQUERO, J.L., PAIVA, A.C., CALIXTO, J.B., LEWIN, G.R. & BADER, M.P. (2000). Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 8140-8145.
- PIZZI, M. & SPANO, P. (2006). Distinct roles of diverse nuclear factor-kB complexes in neuropathological mechanisms. *European Journal of Pharmacology*, **545**, 22-28.
- PONTES, G.N., CARDOSO, E.C., CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S. & MARKUS RP (2006). Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) - melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. *J. Pineal Res.*, **41**, 136-141.
- POZO, D., REITER, R.J., CALVO, J.R. & GUERRERO, J.M. (1994). Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Science.*, **55**, 455-460.
- POZO, D., REITER, R.J., CALVO, J.R. & GUERRERO, J.M. (1997). Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J. Cell. Biochem.*, **65**, 430-442.
- RAO, P.J. & BHATTACHARYA, S.K. (1988). Hyperthermic effect of centrally administered bradykinin in the rat: role of prostaglandins and serotonin. *Int J Hyperthermia*, **4**, 183-189.
- REGOLI, D., ALLOGHO, S.N., RIZZI, A. & GOBEIL, F.J. (1998). Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur. J. Pharmacol.*, **348**: 1-10.
- REITER, R.J., CALVO, J.R., KARBOWNIK, M., QI, W. & TAN, D.X. (2000) Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci.*, **917**, 376-386

- RENÓ, L.A., ZAGO, W. & MARKUS, R.P. (2004). Release of [³H]-L-glutamate by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in rat cerebellar slices. *Neuroscience*, **124**, 647-653.
- RODI, D., COUTURE, R., ONGALI, B. & SIMONATO, M. (2005). Targeting Kinin Receptors for the Treatment of Neurological Diseases. *Current Pharmaceutical Design*, **11**, 1313-1326.
- ROLLS, A., SHECHTER, R., LONDON, A., ZIV, Y., RONEN, A., LEVY, R. & SCHWARTZ, M. (2007). Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nat Cell Biol.*, **9**, 1081-1088.
- RUSSWURM, M., BEHREND, S., HARTENECK, C. & KOESLING, D. (1998). Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. *The Biochemical Journal*, **335**, 125-130.
- SABBAN, E.L., NANKOVA, B.B., SEROVA, L.I., KVETNANSKY, R. & LIU X. (2004). Molecular regulation of gene expression of catecholamine biosynthetic enzymes by stress: sympathetic ganglia versus adrenal medulla. *Ann N Y Acad Sci*, **1018**, 370-377.
- SAKUMA, I., STUEHR, D.J., GROSS, S.S., NATHAN, C. & LEVI, R. (1988). Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 8664-8667.
- SALTER, M., KNOWLES, R.G. & MONCADA, S. (1991). Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett.*, **291**, 145-149.
- SARGENT, P.B. (1993). The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu Rev Neurosci.*, **16**, 198-201.
- SATO, I., HIMI, T. & MUROTA, S. (1996). Lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase activity in cultured cerebellar granule neurons. *Neuroscience Letters*, **205**, 45-48.
- SATTLER, R., XIONG, Z., LU, W. Y., HAFNER, M., MACDONALD, J. F. & TYMIANSKI, M. (1999). Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science*, **284**, 1845-1848.
- SCHWANINGER, M., SALLMANN, S., PETERSEN, N., SCHNEIDER, A., PRINZ, S., LIBERMANN, T.A. & SPRANGER, M. (1999). Bradykinin induces interleukin-6 expression in astrocytes through activation of nuclear factor-kappaB. *J Neurochem.*, **73**, 1461-1466.

- SEROVA, L.I., GUEORGUIEV, V., CHENG, S.Y. & SABBAN, E.L. (2008). Adrenocorticotrophic hormone elevates gene expression for catecholamine biosynthesis in rat superior cervical ganglia and locus coeruleus by an adrenal-independent mechanism. *Neuroscience*, **153**, 1380-1389.
- SHIDA, C.S., CASTRUCCI, A.M., LAMY-FREUND, M.T. (1994). High melatonin solubility in aqueous medium. *J. Pineal Res.*, **16**, 198-201.
- SILVA, C.L., TAMURA, E.K., MACEDO, S.M., CECON, E., BUENO-ALVES, L., FARSKY, S.H., FERREIRA, Z.S. & MARKUS, R.P. (2007). Melatonin inhibits nitric oxide production by microvascular endothelial cells in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol.*, **151**, 195-205.
- SIMONNEAUX, V. & RIBELAYGA, C. (2003). 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**, 325-395.
- SIMPSON, C.S. & MORRIS, B.J. (1999). Activation of nuclear factor kappaB by nitric oxide in rat striatal neurones: differential inhibition of the p50 and p65 subunits by dexamethasone. *J Neurochem.*, **73**, 353-361.
- SKINNER, D.C. & MALPAUX, B. (1999). High melatonin concentrations in third ventricular cerebrospinal fluid are not due to Galen vein blood recirculating through the choroid plexus. *Endocrinology*, **140**, 4399-4405.
- SNYDER, S.H. & AXELROD, J. (1964). A sensitive assay for 5-hydroxytryptophan decarboxylase. *Biochem Pharmacol*, **13**, 805-806.
- SNYDER, S.H. (1980). Brain peptides as neurotransmitters. *Science*, **209**, 976-983.
- STAGLIANO, N.E., DIETRICH, W.D., PRADO, R., GREEN, E.J. & BUSTO, R. (1997). The role of nitric oxide in the pathophysiology of thromboembolic stroke in the rat. *Brain Res.*, **759**, 32-40.
- STEINHILBER, D., BRUNGS, M., WERZ, O., WIESENBERG, I., DANIELSSON, C., KAHLEN, J.P., NAYERI, S., SCHRÄDER, M. & CARLBERG, C. (1995). The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J Biol Chem.*, **270**, 7037-7040.
- SZCZEPANIK, M. (2007). Melatonin and its influence on immune system. *J Physiol Pharmacol.*, **58**, 115-124.
- TAKEDA, K., KAISHO, T. & AKIRA, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.*, **21**, 335-376.

- TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.*, **17**, 1-14.
- TAMURA, E.K., CECON, E., MONTEIRO, A.W.M., SILVA, C.L.M. & MARKUS, R.P. (2009). Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells. *J. Pineal Res.*, **46**, 268-274.
- TAMURA, E.K., SILVA, C.L.M. & MARKUS, R.P. (2006). Melatonin inhibits endothelial nitric oxide production *in vitro*. *J. Pineal Res.*, **41**, 267-274.
- TAN, D.X., MANCHESTER, L.C., REITER, R.J., PLUMMER, B.F., HARDIES, L.J., WEINTRAUB, S.T., VIJAYALAX, M.I. & SHEPHERD, A.M. (1998). A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochem Biophys Res Commun.*, **253**, 614-620.
- TAN, D.X., MANCHESTER, L.C., TERRON, M.P., FLORES, L.J., TAMURA, H., REITER, R.J. (2007). Melatonin as a naturally occurring co-substrate of quinone reductase 2, the putative MT3 melatonin membrane receptor: hypothesis and significance. *J Pineal Res.*, **43**, 317-320.
- TANG, S.C., LATHIA, J.D., SELVARAJ, P.K., JO, D.G., MUGHAL, M.R., CHENG, A., SILER, D.A., MARKESBERY, W.R., ARUMUGAM, T.V. & MATTSON, M.P. (2008). Toll-like receptor-4 mediates neuronal apoptosis induced by amyloid beta-peptide and the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Exp Neurol.*, **213**, 114-121.
- TANNENBAUM, S.R., FETT, D., YOUNG, V.R., LAND, P.D., & BRUCE, W.R. (1978). Nitrite and nitrate are formed by endogenous synthesis in the human intestine. *Science*, **200**, 1487-1488.
- TOBIN, V.A., MCCANCE, I., COLEMAN, H.A. & PARKINGTON, H.C. (2002). How important is stimulation of alpha-adrenoceptors for melatonin production in rat pineal glands? *J Pineal Res*, **32**, 219-224.
- TRICOIRE, H., LOCATELLI, A., CHEMINEAU, P. & MALPAUX, B. (2002) Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology*, **143**, 84-90.
- TURNBULL, A.V. & RIVIER, C.L. (1999). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev.*, **79**, 1-71.
- TZAVARA, E.T., POUILLE, Y., DEFER, N. & HANOUNE, J. (1996). Diurnal variation of the adenylyl cyclase type 1 in the rat pineal gland. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 11208-11212.

- UDAN, M.L., AJIT, D., CROUSE, N.R., & NICHOLS, M.R. (2008). Toll-like receptors 2 and 4 mediate Abeta(1-42) activation of the innate immune response in a human monocytic cell line. *J Neurochem.*, **104**, 524-533.
- VALENCIA, I., MISHRA, O.P., ZUBROW, A., FRITZ, K., KATSETOS, C.D., DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M., & LEGIDO, A. (2006). The role played by calcium in neuronal injury following neonatal hypoxia or convulsions. *Rev Neurol.*, **42**, 11-15.
- VANECEK, J. (1998). Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev.*, **78**, 687-721.
- WILEY, W.T. (2007). The many faces of nitric oxide: cytotoxic, cytoprotective or both. *Neurogastroenterol Motil*, **19**, 541-544.
- XIAO, W. (2004). Advances in NF- κ B signaling transduction and transcription. *Cellular & Molecular Immunology*, **1**, 425-433.
- YAU, W.M., DORSETT, J.A., YOUTHER, M.L. (1986). Bradykinin releases acetylcholine from myenteric plexus by a prostaglandin-mediated mechanism. *Peptides*, **7**, 289-292.
- ZAGO, W. (2001). Receptores nicotínicos em cerebelo e hipocampo de rato - caracterização e influencia do ciclo claro/escuro ambiental. Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de doutor em farmacologia.
- ZHOU, L. & ZHU, D.Y. (2009). Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide*, **20**, 223-230.

SÚMULA CURRICULAR

Informações pessoais

Nome completo: Daiane Gil Franco

Sexo: feminino

Data e local de nascimento: 24/08/1982; São Caetano do Sul - São Paulo, Brasil

Nacionalidade: brasileira

Endereço eletrônico: daianegfranco@yahoo.com.br

Formação Acadêmica

2008 – 2010: Mestrado do curso de Fisiologia.

Instituição: Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil.

Título Dissertação: Modulação da produção de óxido nítrico por melatonina em cultura de células de cerebelo.

Orientadora: Regina Pekelmann Markus- Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Bolsas: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP/processo: 2007/06423-0).

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES 01/mar/2008 – 31/ago/2008).

2003 – 2007: Bacharel em Ciências Biológicas.

Instituição: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP) - São Paulo, Brasil.

Título da iniciação científica: Melatonina modulando a atividade de colinoceptores nicotínicos em células granulares de cerebelo de rato em cultura.

Orientadora: Regina Pekelmann Markus

Bolsa de Iniciação Científica: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP/processo: 05/56481-0), 2005-2006; 2006-2007.

Outras Atividades Acadêmicas com Financiamento

2009-2009 - Estágio de monitoria com bolsa do Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino (PAE), junto à disciplina "Fisiologia para o Ensino Médio" dedicada aos alunos de graduação do Instituto de Biociências. Fomento: CAPES. Supervisão da Profª. Drª. Regina P. Markus.

Outras Atividades Acadêmicas Relevantes

2004-2005 - Estágio no Laboratório de Investigação Médica (LIM-23), participando do projeto temático da FAPESP intitulado Projeto Humor, especificamente no subprojeto: Excreção noturna de 6-sulfatoximelatonina (aMT6s) como um índice preditivo do efeito de clomipramina. Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas, São Paulo/SP. Sob orientação da Profª Drª Regina P. Markus e co-orientação da Profª Drª Clarice Gorenstein.

2007 - Aula ministrada no IV Curso de inverno - Tópicos em Fisiologia Comparada. Título: Aspectos Evolutivos da Melatonina. Departamento de Fisiologia Geral, Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo.

2008 - Aula ministrada no V Curso de inverno - Tópicos em Fisiologia Comparada. Título: Melatonina e seus Diversos Aspectos. Departamento de Fisiologia Geral, Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo.

2008 - Orientação do aluno Chrystian Junqueira Alves no V Curso de inverno - Tópicos em Fisiologia Comparada. Projeto: Avaliação dos Efeitos da Melatonina Sobre os Níveis de Óxido Nítrico em Células Granulares do Cerebelo de Ratos Tratados com Lipopolissacarídeo. Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia Geral - Universidade de São Paulo.

Produções Bibliográficas

Trabalhos publicados

MARKUS, R., FRANCO, D., CARVALHO, L., GENTIL, V., GORENSTEIN, C. (2009). Acute increase in urinary 6-sulfatoximelatonin after clomipramine, as a predictive measure for emotional improvement. *J Psychopharmacology*, no prelo.

Revisões aceitas para publicação

MARKUS, R.P., SILVA, C.L.M., FRANCO, D.G., MORTANI-BARBOSA, E., FERREIRA, Z.S. Is modulation of nicotinic acetylcholine receptors by melatonin relevant for therapy with cholinergic drugs? *Pharmacology & Therapeutics*.

FRANCO, D.G. Fator de transcrição nuclear kappa b no sistema nervoso central: do fisiológico ao patológico. Revista da Biologia.

Trabalhos completos/resumidos em eventos

1. **FRANCO, D.G., FERREIRA, Z.S., MARKUS, R.P.** Effect of clomipramine on melatonin profile of normal subjects. In: 38º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2006, Ribeirão Preto. Anais do 38º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2006. Referências adicionais: Classificação do evento: Nacional; Brasil/ Português; Meio de divulgação: Impresso
2. **FRANCO, D.G., FERREIRA, Z.S., MARKUS, R.P.** Excreção noturna de 6-sulfatoximelatonina (aMT6s) como um índice preditivo do efeito de clomipramina. In: Simpósio de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, 2006, Ribeirão Preto. Anais do Simpósio de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, 2006. Referências adicionais: Classificação do evento: Nacional; Brasil/ Português; Meio de divulgação: Digital
3. **FRANCO, D.G., GOREINSTEIN, C., MARKUS, R.P.** Melatonin as predictive marker for the effect of clomipramine on humor changes in normal subjects. In: FASEB Summer Conference - Melatonin Receptors: Actions and Therapeutics, 2008, Snowmass Village. Melatonin as predictive marker for the effect of clomipramine on humor changes in normal subjects, 2008. Palavras-chave: clomipramine; melatonin; mood; 6-sulfatoximelatonina; norepinephrine uptake. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Farmacologia. Setores de atividade: Saúde e Serviços Sociais. Referências adicionais: Classificação do evento: Internacional; Estados Unidos/ Inglês; Meio de divulgação: Impresso
4. **FRANCO, D.G., FERREIRA, Z.S., MARKUS, R.P.** A putative protective role of melatonin on granule cerebellar cells challenged with lipopolysaccharide. In: 41º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2009, Ribeirão Preto, SP. Neurofarmacologia, 2009. Palavras-chave: melatonin; cerebellum; nitric oxide. Referências adicionais: Classificação do evento: Nacional; Brasil/ Português; Meio de divulgação: Digital

Participações em Eventos

2009 - Apresentação de Poster / Painel no 41º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. "A putative protective role of melatonin on granule cerebellar cells challenged with lipopolysaccharide". Ribeirão Preto, SP.

2008 - Apresentação de Poster / Painel no FASEB Summer Research Conferences Melatonin Receptors: Actions and Therapeutics. (Simpósio). "Melatonin as predictive marker for the effect of clomipramine on humor changes in normal subjects". Snowmass Village, CO. USA

2008 - Ouvinte no 40º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental - SBFTE. Águas de Lindóia, SP.

2007 - Ouvinte no 39º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental - SBFTE. Ribeirão Preto, SP.

2006 - Apresentação de Poster / Painel no Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo. "Efeito da Clomipramina no Perfil de Melatonina de Sujeitos Normais". Ribeirão Preto, SP.

2006 - Apresentação de Poster / Painel no 38º Congresso Brasileiro de Farmacologia Terapêutica e Experimental - SBFTE "Effect of clomipramine on melatonin profile of normal subjects". Ribeirão Preto, SP.

2005 - Ouvinte na XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia experimental - FESBE. Águas de Lindóia, SP.

Prêmio

2009 - Menção Honrosa ao poster "FRANCO DG, MARKUS RP - A putative protective role of melatonin on granule cerebellar cells challenged with lipopolysaccharide" no 41º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. Ribeirão Preto, SP.