

Erika Cecon

**Sistema melatonérgico como alvo do  
peptídeo  $\beta$ -amiloide**

**The melatonergic system as a target of  
amyloid- $\beta$  peptide**

São Paulo

2014

Erika Cecon

**Sistema melatonérgico como alvo do  
peptídeo  $\beta$ -amiloide**

**The melatonergic system as a target of  
amyloid- $\beta$  peptide**

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

Orientadora:

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Regina Pekelmann Markus

São Paulo

2014

## FICHA CATALOGRÁFICA

---

Cecon, Erika

Sistema Melatonérgico como Alvo do Peptídeo  $\beta$ -Amiloide / Erika Cecon ; orientadora Dra. Regina P. Markus. -- São Paulo, 2014.  
157 f.

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

1. Glândula pineal. 2. Doença de Alzheimer. 3. Melatonina. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia. II. Título.

# COMISSÃO JULGADORA

---

---

Prof.(a) Dr.(a)

---

Prof.(a) Dr.(a)

---

Prof.(a) Dr.(a)

---

Prof.(a) Dr.(a)

---

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

*À minha família e  
à todos que contribuíram  
para a realização deste trabalho.*

---

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser.  
Mas tenho que querer o que for.  
O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito.  
Condições de palácio tem qualquer terra larga,  
mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”

Fernando Pessoa

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço primeiramente a Deus, pelas oportunidades e pelas pessoas que tem colocado em meu caminho e por iluminar minha trajetória.

Agradeço a todos da minha **família**, que sempre me ofereceram apoio e amor incondicionais e compreenderam a distância que por vezes se fez necessária durante a execução deste projeto. Tenho muito orgulho em fazer parte desta família tão unida, vocês são meu porto-seguro. Agradeço principalmente ao meu pai **Antonio Carlos** e à minha mãe **Sueli** por todo incentivo, apoio e por serem meu maior exemplo de que não existem limites nas conquistas quando há esforço e dedicação. À minha irmã **Letícia** e meu cunhado **Chicão**, por serem também exemplos de dedicação e por compartilharem comigo o gosto pela ciência, sempre me apoiando. Ao meu afilhado **Luigi**, por alegrar e iluminar nossas vidas com sua presença. E ao meu noivo **Elton**, por toda a paciência, companheirismo, cumplicidade e compreensão ao longo de todos esses anos.

Agradeço especialmente a todos aqueles que em algum momento participaram desta jornada no **laboratório de Cronofarmacologia**. Aos amigos Pedro, Eduardo, Daiane, Marina, Camila, Marco, Cláudia, Leila, Sanseray, Michelle, Eliana, Flávia, Adriessa, Eugênia, Gabis, Letícia, Luis e Luciana, por todos os momentos compartilhados e pelos diferentes ensinamentos que me proporcionaram. Aos técnicos Eduardo e Débora, por todo o auxílio prestado, pela amizade e por tornarem o laboratório um lugar muito agradável de se trabalhar. A todos os novos membros desta família, obrigada pela compreensão nesses últimos meses. Agradeço ainda a todos do laboratório do **Institut Cochin**, pela hospitalidade e por todo aprendizado durante os 4 meses de convivência, e ao professor **Ralf Jockers**, por todo apoio, orientação, auxílio e contribuição a este trabalho.

Agradeço aos professores Pedro, Luciana e Zulma, pelas contribuições no desenvolvimento deste projeto, por toda orientação e amizade. E agradeço em especial à professora **Regina**, pela orientação ao longo de todos esses anos e também por tantos outros ensinamentos que contribuíram muito para meu crescimento pessoal e profissional, muito obrigada pela amizade e confiança.

Agradeço aos demais laboratórios e funcionários de Dep. de Fisiologia por todo o auxílio prestado e pela ótima convivência.

Agradeço ainda ao apoio financeiro das agências FAPES, CAPES e CNPq, sem o qual este trabalho não teria sido realizado.

# ÍNDICE

---

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1. ANATOMIA E FIOLOGIA DO SISTEMA MELATONÉRGICO.....	14
1.1 A glândula pineal.....	14
1.2 Efeitos da melatonina.....	20
1.3 Mecanismos de ação da melatonina.....	23
2. INTERAÇÕES ENTRE O SISTEMA MELATONÉRGICO E O SISTEMA IMUNOLÓGICO: O EIXO IMUNE-PINEAL.....	28
2.1 Fator de transcrição NFKB.....	32
3. SISTEMA MELATONÉRGICO EM CONDIÇÕES PATOLÓGICAS - DOENÇA DE ALZHEIMER.....	36
3.1 Peptídeo $\beta$ -amiloide.....	39
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>
ANIMAIS.....	47
DROGAS E REAGENTES.....	47
PREPARO DAS DROGAS.....	49
CULTURA DE GLÂNDULAS PINEAIS.....	50
CULTURA DE PINEALÓCITOS.....	50
CULTURA DE CÉLULAS HEK293.....	51
CULTURA DE CÉLULAS PRIMÁRIAS ENDOTELIAIS.....	52
DOSAGEM DE INDOLAMINAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).....	52
ENSAIO DE ELETROMOBILIDADE EM GEL (EMSA OU GEL-SHIFT) E SUPER-SHIFT.....	53
ENSAIOS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	54
EXTRAÇÃO DE RNA.....	56
ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR EM TEMPO REAL.....	57
ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR MATRIZES DE PCR.....	58
DOSAGEM DE TNF.....	60
ENSAIOS DE LIGAÇÃO DA MELATONINA AOS SEUS RECEPTORES.....	60
ENSAIO DE ATIVAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DA ERK 1/2.....	61
ANÁLISE PROTEICA POR WESTERN BLOT.....	61



ENSAIOS DE BRET .....	63
ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RESULTADOS.....	65
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>67</b>
1. EFEITO DO PEPTÍDEO A $\beta$ SOBRE A PRODUÇÃO DE MELATONINA PELA GLÂNDULA PINEAL.....	67
2. ATIVAÇÃO DA VIA NF- $\kappa$ B PELO PEPTÍDEO A $\beta$ EM GLÂNDULAS PINEAIS .....	70
3. PEPTÍDEO A $\beta$ INDUZ RESPOSTA INFLAMATÓRIA MEDIADA PELA VIA TLR/NF- $\kappa$ B EM GLÂNDULAS PINEAIS .....	75
4. MODULAÇÃO DA FUNÇÃO DOS RECEPTORES DE MELATONINA PELO PEPTÍDEO A $\beta$ ..	83
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>95</b>
1. GLÂNDULA PINEAL COMO SENSOR DO ESTADO FISIOPATOLÓGICO DO ORGANISMO.	96
2. EFEITOS MODULATÓRIOS DE A $\beta$ SOBRE RECEPTORES DE MEMBRANA .....	104
3. RELEVÂNCIA DA DISFUNÇÃO DO SISTEMA MELATONÉRGICO.....	111
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	117
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>121</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>122</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>124</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>127</b>
<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>157</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>5-HTP</b>	5-hidroxitriptofano
<b>A<math>\beta</math></b>	peptídeo beta amiloide
<b>APP</b>	proteína precursora amiloide
<b>AA-NAT</b>	enzima arilalquilamina N-acetiltransferase
<b>ACh</b>	acetilcolina
<b>ASMT</b>	enzima acetilserotonina metiltransferase
<b>AD</b>	doença de Alzheimer
<b>AFMK</b>	N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina
<b>AMK</b>	N1-acetil-5-metoxiquinuramina
<b>AMPA</b>	receptor de ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
<b>AMPc</b>	monofosfato cíclico de adenosina
<b>AP-1</b>	proteína ativadora 1
<b>AT<sub>2</sub></b>	receptor de angiotensina II
<b>ATP</b>	adenosina trifosfato
<b>BCG</b>	Bacilo Calmette-Guerin
<b>BRET</b>	transferência de energia bioluminescente por ressonância
<b>COX</b>	enzima ciclooxigenase
<b>CREB</b>	proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc
<b>DAMPs</b>	padrões moleculares associados a dano
<b>DMEM</b>	do inglês, <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>EMSA</b>	ensaio de eletromobilidade em gel
<b>GABA</b>	ácido gama-aminobutírico
<b>GAPDH</b>	enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
<b>GPCR</b>	receptor acoplado à proteína G
<b>GSK3</b>	enzima glicogênio sintase quinase
<b>HIOMT</b>	enzima hidroxindol-O-metiltransferase
<b>HFIP</b>	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
<b>ICAM</b>	molécula de adesão intercelular
<b>I-Mel</b>	2-iodomelatonina
<b>IFN</b>	interferon
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	proteína inibitória kappa B
<b>IKK</b>	enzima quinase de I $\kappa$ B
<b>IL</b>	interleucina
<b>IP<sub>3</sub></b>	inositol trifosfato
<b>iNOS</b>	sintase do óxido nítrico induzível

<b>ISO</b>	Isoproterenol
<b>LPS</b>	lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas
<b>LTP</b>	potenciação de longa duração
<b>MAPK</b>	enzimas quinases ativadas por mitógenos
<b>MEK</b>	enzima MAP quinase-quinase regulada por sinal extracelular
<b>ERK</b>	enzima quinase regulada por sinal extracelular
<b>mACh</b>	receptor colinérgico muscarínico
<b>μM</b>	micromolar
<b>mM</b>	milimolar
<b>MTR</b>	receptor de melatonina
<b>NAS</b>	N-acetilserotonina
<b>nACh</b>	receptor colinérgico nicotínico
<b>NF-κB</b>	fator nuclear kappa B
<b>NK</b>	células <i>natural killers</i>
<b>nM</b>	nanomolar
<b>NMDA</b>	receptor de N-metil D-aspartato
<b>NSQ</b>	núcleo supraquiasmático
<b>PAMPs</b>	padrões moleculares associados a patógenos
<b>PDTC</b>	pirrolidinaditiocarbamato
<b>PKA</b>	proteína quinase dependente de AMPc
<b>PKC</b>	proteína quinase depende de cálcio
<b>PLC</b>	enzima fosfolipase C
<b>pM</b>	picomolar
<b>PVN</b>	núcleo paraventricular hipotalâmico
<b>RNA</b>	ácido ribonucleico
<b>RNAm</b>	RNA mensageiro
<b>RLuc</b>	enzima <i>Renilla</i> luciferase
<b>ROR/RZR</b>	família de receptores nucleares do ácido retinóico
<b>ROS</b>	espécies reativas de oxigênio
<b>SNC</b>	sistema nervoso central
<b>TAD</b>	domínio de transativação
<b>TLR</b>	receptores do tipo <i>toll</i>
<b>TNF</b>	fator de necrose tumoral
<b>VCAM</b>	molécula de adesão de célula vascular
<b>YFP</b>	proteína fluorescente amarela, do inglês <i>yellow fluorescent protein</i>

# INTRODUÇÃO

*“Só sabemos com exatidão quando sabemos pouco; à medida que vamos adquirindo conhecimentos, instala-se a dívida.”*

Johann Wolfgang von Goethe

## INTRODUÇÃO

A melatonina é o hormônio produzido pela glândula pineal de maneira rítmica, em sincronia com a informação luminosa ambiental. A função cronobiótica da melatonina, atuando no ajuste de processos fisiológicos rítmicos ao ciclo claro/escuro ambiental é certamente sua função mais conhecida. No entanto, as propriedades desta molécula vão muito além de seus efeitos cronobióticos, apresentando uma grande variedade de ações, muitas das quais são de grande potencial terapêutico. A glândula pineal, o hormônio melatonina e os receptores específicos que medeiam as ações da melatonina compõem o chamado sistema melatonérgico. Diversos estudos têm demonstrado que este sistema encontra-se alterado em diversas patologias, especialmente no caso da doença neurodegenerativa conhecida como a doença de Alzheimer (AD, do inglês *Alzheimer's disease*), em que é relatada uma redução drástica na produção de melatonina pela glândula pineal desde os primeiros estágios da doença e alteração na expressão dos receptores de melatonina em algumas áreas encefálicas. Ampliar o entendimento dos mecanismos de ação que mediam a disfunção do sistema melatonérgico permitirá não só uma melhor compreensão da fisiopatologia de AD, como também uma caracterização de possíveis marcadores biológicos dos estágios iniciais da doença. Além disso, o conhecimento das alterações do sistema melatonérgico nesta patologia é fundamental para o desenvolvimento de protocolos terapêuticos com o uso coadjuvante de melatonina ou seus análogos no tratamento de pacientes com doença de Alzheimer.

## 1. Anatomia e fisiologia do sistema melatonérgico

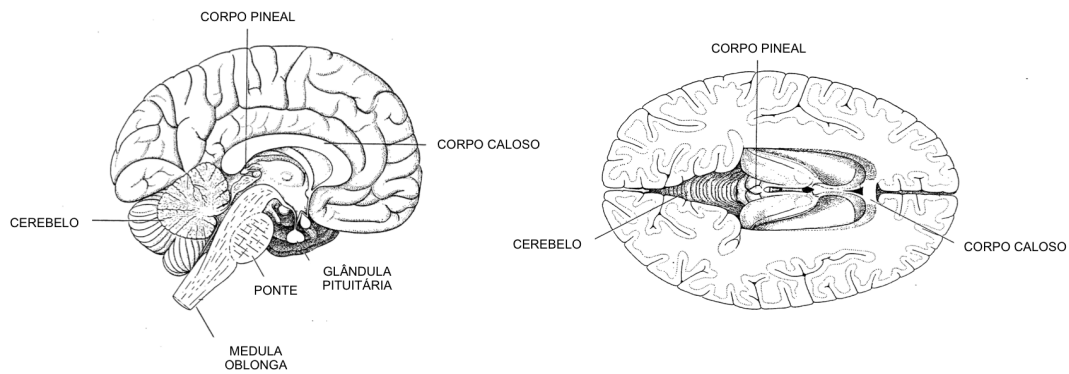
### 1.1 A glândula pineal

A glândula pineal foi primeiramente descrita por Galeno, no século II, com base nas descrições prévias feitas pelo anatomista grego Herophilus (325-280 a.C.). O nome “pineal” advém da descrição de seu formato de pinha, *pineae* em latim. Por ser uma estrutura única no cérebro, contrapondo-se às demais estruturas que são bilaterais, e pela sua posição central no cérebro de humanos, foi postulado que a pineal exercesse um papel também central, controlando o fluxo dos pensamentos entre os hemisférios cerebrais (revisto por Axelrod, 1974). Séculos depois, já em 1662, o filósofo francês René Descartes (1596-1650) também atribuiu à pineal uma função metafísica, segundo a qual este órgão ímpar seria a sede da alma, o local onde o espírito animal se integraria ao corpo físico, controlando seus movimentos e percepções. Seu relato dizia ainda que a glândula pineal recebia as informações provenientes dos nossos olhos sobre o mundo real, gerando e transmitindo ao resto do corpo a resposta adequada que deveria ser executada (revisto por Arendt, 1995). Nota-se que a descrição feita por Descartes pelo método dedutivo estava bem adequada ao que sabemos atualmente sobre a função da pineal, na medida em que a considerou um importante elo de ligação entre o mundo exterior e o meio interno.

Por muito tempo acreditou-se que a pineal de humanos era somente um órgão vestigial, correspondente ao órgão parietal (ou “terceiro olho”) que tem função de fotorrecepção nos vertebrados inferiores (Dandy, 1915; Oksche, 1965). A primeira função da pineal foi descrita em 1917, com a observação de que extratos de pineais de bovinos alterava a coloração da pele de anfíbios. Na década de 50, o dermatologista Aaron B. Lerner isolou o composto ativo presente nestes extratos e o

denominou de melatonina (Lerner *et al.*, 1958, 1960). Estudos subsequentes caracterizaram rapidamente a via de síntese e metabolização desse novo hormônio, os locais onde ocorre sua produção e até mesmo o caráter rítmico com que a pineal o produz (Lerner *et al.*, 1960; Axelrod & Weissbach, 1961; Quay, 1963, 1964; Klein & Weller, 1970).

A glândula pineal é um órgão neuroendócrino, diferenciado durante o desenvolvimento embrionário a partir de uma evaginação do teto do terceiro ventrículo. A pineal corresponde também a um dos órgãos circumventriculares, o que implica que está localizada fora da barreira hematoencefálica. Anatomicamente, a pineal é descrita como parte do epítalamo e, portanto, do diencéfalo. Na maioria dos mamíferos a glândula pineal situa-se dorsalmente à região caudal do diencéfalo, entre as comissuras habenular e posterior, ocupando uma posição bem centralizada no encéfalo, conforme observa-se na figura 1. Nos roedores, a glândula apresenta uma forma mais alongada e localização mais superficial devido a uma migração do órgão na direção dorso-caudal, mas sua porção profunda mantém-se na região circumventricular (Møller & Baeres, 2002). Estruturalmente, a glândula pineal é composta por diversos tipos celulares, sendo que aproximadamente 80% das células são neuroendócrinas, denominadas de pinealócitos. Essas células têm a mesma origem ectodérmica que células neuronais e são responsáveis pela produção de melatonina (Arendt, 1995; Ekström & Meissl, 2003). Também fazem parte da pineal as células gliais, mais especificamente astroglia e microglia (Pedersen *et al.*, 1993; Sato *et al.*, 1996).



**Figura 1 – Posição central da glândula pineal no cérebro humano.** À esquerda, corte sagital com visualização lateral do encéfalo; à direita, corte horizontal e visualização pela face superior (adaptado de Wurtman & Axelrod, 1965).

A glândula pineal é um dos componentes do sistema de temporização interno dos vertebrados, seu hormônio – a melatonina – é uma importante referência do relógio biológico central. Esse sistema garante organização temporal nas funções fisiológicas, permitindo ao organismo antecipação e adaptação aos fenômenos cíclicos ambientais, como o dia e noite e as estações do ano (Menaker *et al.*, 1997). A produção de melatonina pela glândula pineal obedece um ritmo circadiano, apresentando concentrações plasmáticas baixas na fase de claro ambiental e altas na fase de escuro. O pico de melatonina noturno é, portanto, o sinal endócrino que traduz a presença e a duração do escuro ambiental, permitindo que o organismo distinga entre dia e noite e entre as estações do ano.

Anatomicamente, a regulação da atividade da glândula pineal depende de conexões multissinápticas que transmitem a informação fótica ambiental até a pineal. Através do trato retino-hipotalâmico a informação luminosa captada pela retina é transmitida aos núcleos supraquiasmáticos hipotalâmicos (NSQs), que correspondem ao relógio biológico central de mamíferos (Inouye & Kawamura, 1979). Destes, partem fibras conectando-os aos núcleos paraventriculares hipotalâmicos (PVN) que, por sua vez, projetam-se ao gânglio cervical superior,



passando pela coluna intermédio lateral da medula. Essa informação chega então à glândula pineal através das fibras simpáticas que a inervam, provenientes do gânglio cervical superior (Teclerian-Mesbah *et al.*, 1999). Durante a fase de claro ambiental, a sinalização GABAérgica (ácido gama-aminobutírico) entre os neurônios dos NSQs e do PVN inibe a propagação da via neste ponto, enquanto que na fase de escuro este bloqueio deixa de ocorrer e as fibras simpáticas que inervam a glândula liberam os neurotransmissores noradrenalina e ATP (adenosina trifosfato) (Klein *et al.*, 1983; Mortani-Barbosa *et al.*, 2000). A sinalização desencadeada pela noradrenalina nos pinealócitos induz a síntese de melatonina e é responsável pelo caráter rítmico da atividade endócrina da pineal.

A ativação de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos pela noradrenalina, que são receptores de membrana acoplados à proteína G estimulatória ( $G_s$ ), induz aumento nos níveis intracelulares de AMPc (monofosfato cíclico de adenosina), ativando a proteína kinase A (PKA) e o fator de transcrição CREB (do inglês, *cAMP response element binding protein*). Nos pinealócitos de roedores, este fator regula positivamente a transcrição gênica da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT), essencial na via biossintética da melatonina (Baler *et al.*, 1997). Já em primatas, o gene de AA-NAT é constantemente transcrito e a proteína é rapidamente degradada. Neste caso, a cascata de sinalização  $\beta$ -adrenérgica leva à fosforilação da enzima AA-NAT por PKA, possibilitando sua ligação à proteína chaperona 14-3-3, formando um complexo funcionalmente ativo e protegido contra ação proteossomal durante o escuro ambiental (Schomerus *et al.*, 2000). Além da indução da atividade da AA-NAT ocorrer somente no escuro, a luz exerce efeito inibitório sobre esta enzima, visto que exposição à luz durante a fase de escuro induz rapidamente sua degradação na glândula pineal (Klein *et al.*, 1997). O caráter rítmico da produção de melatonina é, portanto, resultante da regulação transcricional (no caso de roedores) ou pós-

traducional (no caso de primatas) da enzima AA-NAT. A noradrenalina pode ainda ativar receptores do tipo  $\alpha_1$ -adrenérgicos que, embora não sejam capazes de induzir a síntese de melatonina por si só, potenciam o efeito induzido pela ativação  $\beta$ -adrenérgica, via sinalização pela proteína  $G_q$  e aumento de cálcio intracelular (Klein *et al.*, 1983; Ho *et al.*, 1988). A ativação de receptores purinérgicos do tipo  $P2Y_1$  pelo co-transmissor ATP também potencia a atividade neuroendócrina da pineal induzida por noradrenalina via aumento de cálcio intracelular (Ferreira *et al.*, 1994, 2003).

A melatonina é uma indolamina derivada do aminoácido triptofano. Sua síntese inicia-se com a captura do triptofano da corrente sanguínea, que é hidroxilado a 5-hidroxitriptofano (5-HTP), cuja descarboxilação dá origem à serotonina (5-hidroxitriptamina), neurotransmissor relevante em várias sinapses centrais e no trato gastrointestinal (revisto por Domínguez-López *et al.*, 2012; Gershon, 2013). Na presença da enzima-chave AA-NAT a serotonina é convertida em N-acetilserotonina (NAS), precursora da melatonina que também é liberada na corrente sanguínea. Por fim, sob ação da enzima acetilserotonina metiltransferase (ASMT), também conhecida como hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT), a NAS é metilada e forma a melatonina (Simonneaux & Ribelayga, 2003). A figura 2 detalha a cascata enzimática que compõe a via de biossíntese de melatonina, apresentando a estrutura bioquímica de cada molécula, enquanto que a figura 3 ilustra o caráter rítmico dessa produção, seja em animais de hábito diurno, como os humanos, ou de hábito noturno, como a maioria dos roedores.

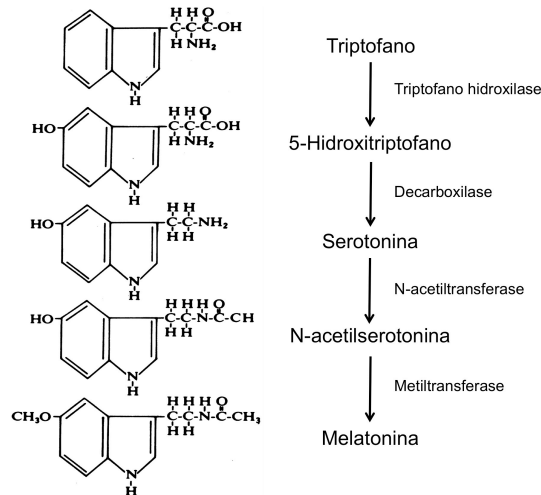


Figura 2 - Via de biossíntese da melatonina. Cascata enzimática da metabolização do aminoácido triptofano até a formação de melatonina.

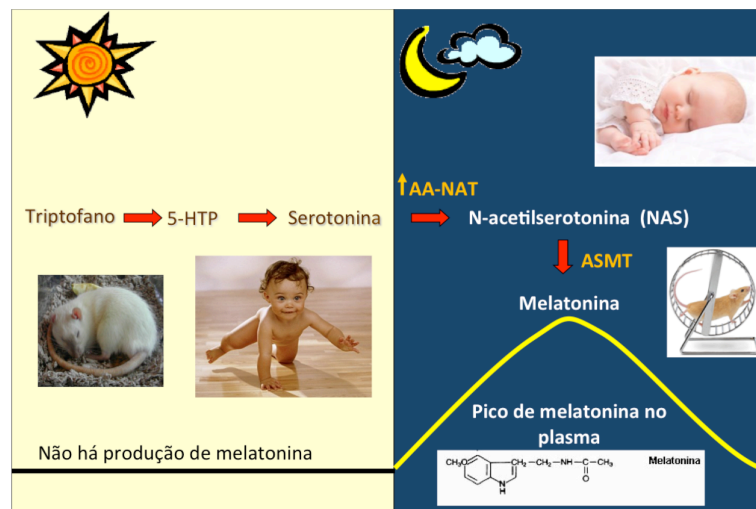


Figura 3 - Ilustração do padrão rítmico de síntese de melatonina pela glândula pineal. Na fase de escuro ambiental, a cascata de sinalização induzida pela noradrenalina liberada pelos terminais simpáticos que inervam a glândula ativa a enzima AA-NAT, levando à formação de NAS e melatonina. O pico de melatonina plasmática ocorre, portanto, em sincronia com a fase de escuro ambiental, independentemente do hábito de vida do animal: diurno, como os humanos, ou noturno, como a maioria dos roedores (adaptado de Markus *et al.*, 2003).

## 1.2 Efeitos da melatonina

Conforme mencionado anteriormente, a melatonina foi primeiramente descrita em 1958, nos estudos sobre a alteração na coloração da pele de anfíbios (Lerner *et al.*, 1958). O primeiro efeito cronobiótico da melatonina foi evidenciado ainda nessa época, com observações de que a exposição de roedores a diferentes fotoperíodos (relação entre o comprimento da fase de claro e da fase de escuro) induzia alterações no tamanho e função das gônadas, e que a extirpação da glândula pineal e/ou administração de melatonina mimetizavam essas alterações (Wurtman & Axelrod, 1965). A atividade reprodutiva desses animais apresenta variação sazonal bem definida e foi então detectado que a melatonina é o hormônio capaz de transduzir humoralmente a informação fótica ambiental e sincronizar a função reprodutiva às estações do ano (Reiter, 1980). Como diferentes espécies apresentam diferentes épocas de reprodução, o efeito da melatonina sobre a reprodução é espécie-específico, podendo ser tanto anti- quanto pró-gonadotrófico. Estabelecia-se, portanto, um dos principais papéis da melatonina: o de sincronizar ritmos endógenos às variações ambientais diárias ou anuais, contribuindo para o sistema de temporização interno.

A melatonina é uma molécula conservada filogeneticamente, sendo encontrada desde organismos unicelulares até vertebrados superiores (revisto por Pandi-Perumal *et al.*, 2006). Acredita-se que sua função mais antiga, evolucionariamente, seja como molécula fotoprotetora, atuando como antioxidante e protegendo os organismos unicelulares, e também tecidos especializados de plantas, contra danos oxidativos causados pela exposição à luz (Tan *et al.*, 2013). A variação rítmica no conteúdo de melatonina e sua função cronobiótica também foram verificados em alguns organismos primitivos, embora os dados a esse respeito sejam

escassos (Hardeland & Poeggeler, 2003). Nos vertebrados não-mamíferos a glândula pineal é fotossensível, sendo a produção de melatonina regulada diretamente pela informação fótica ambiental. A glândula pineal de aves, por exemplo, é um dos componentes do relógio biológico central desses animais, juntamente com a retina e os NSQs, sendo a melatonina importante regulador de funções rítmicas diárias, como o ritmo de atividade/repouso, de funções retinianas, de orientação espacial e de vocalização, assim como funções rítmicas sazonais, como a reprodução e migração (revisto por Cassone, 2014).

Em mamíferos, os efeitos cronobióticos da melatonina incluem a regulação de diversos ritmos fisiológicos, como por exemplo: ritmo comportamental de atividade/repouso, pressão arterial, fotorrecepção retiniana, proliferação celular na medula óssea e no sistema linfoide, e a produção de citocinas por células do sistema imunológico (Haus *et al.*, 1983; revisto por Pandi-Perumal *et al.*, 2006). Em humanos, a produção dessincronizada de melatonina está relacionada a distúrbios como insônia e mal-estar causados por trabalho noturno ou pelo efeito “jet-lag”, referente à adaptação a um novo fuso horário em viagens trans-meridionais.

A melatonina apresenta também diversos outros efeitos que não estão necessariamente relacionados à sincronização de ritmos circadianos ou sazonais e que não dependem da produção hormonal rítmica da pineal. Tais efeitos são, portanto, classificados como efeitos não-cronobióticos e podem ser decorrentes de produção de melatonina extra-pineal. A produção de melatonina por outros órgãos que não a pineal ocorre geralmente de forma não-rítmica e dependente de estímulos específicos. Produção extra-pineal de melatonina já foi detectada em células epidérmicas (Slominski *et al.*, 2005), células imunocompetentes como NK (*natural killers*), timócitos, linfócitos, macrófagos e endoteliais (revisto por Kvetnoy, 1999; Conti *et al.*, 2000), no trato gastrointestinal e na retina (Iuvone *et al.*, 2005; Konturek *et*

*al.*, 2007). A produção local de melatonina pode atingir concentrações na faixa de  $\mu\text{M}$  a  $\text{mM}$ , contrastando com a concentração plasmática de melatonina produzida pela pineal, que ocorre na faixa de  $\text{pM}$  a  $\text{nM}$ . De modo geral, as ações antioxidante, oncostática e imunomodulatória são exemplos de efeitos não-cronobióticos da melatonina.

Como antioxidante, a melatonina possui capacidade tanto de sequestrar diretamente radicais livres quanto de aumentar a expressão e atividade de enzimas antioxidantes, auxiliando também na regeneração dessas enzimas pelos processos redox. Curiosamente, os metabólitos gerados pela oxidação da melatonina, o AFMK (N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina) e o AMK (N1-acetil-5-metoxiquinuramina), são também moléculas com propriedades antioxidantes ainda mais potentes que da própria melatonina (Hardeland *et al.*, 2003, 2006; Silva *et al.*, 2006). Portanto, a melatonina é considerada um potente modulador do estado redox celular.

As ações oncostáticas da melatonina devem-se principalmente às suas propriedades anti-proliferativa e anti-angiogênica (Lissoni *et al.*, 2001; Blask *et al.*, 2002, 2005). Tais efeitos estão relacionados, respectivamente, ao fato da melatonina prolongar o ciclo celular nas células tumorais e inibir as vias de sinalização relacionadas à hipóxia, que normalmente ativam a angiogênese. Além disso, embora seja comumente descrito que a melatonina inibe a apoptose (revisto por Luchetti *et al.*, 2010), o efeito oposto é observado em células tumorais. Estudos demonstraram indução de apoptose por melatonina em vários tipos tumorais, tais como em linfomas, tumores de glândula mamária, colo-retal e de próstata (revisto por Mediavilla *et al.*, 2010). Por fim, sabe-se que o estresse oxidativo pode acarretar em danos ao DNA, tendo efeito altamente carcinogênico. Dessa forma, a característica antioxidante da melatonina também contribui para seu papel protetor no câncer. O uso de antioxidantes, incluindo a melatonina, como coadjuvantes no tratamento

quimioterápico tem demonstrado resultados promissores tanto com relação à maior eficácia do tratamento quanto à diminuição dos efeitos colaterais (Vijayalaxmi *et al.*, 2002; Anisimov *et al.*, 2006; Jung & Ahmad, 2006; revisto por Block *et al.*, 2008).

Um número crescente de estudos têm comprovado o papel da melatonina como importante modulador da resposta imune (revisto por Carrillo-Vico *et al.*, 2013). Foi demonstrado que a melatonina aumenta a proliferação de linfócitos-T, a apresentação de antígenos pelos macrófagos e a atividade fagocitária destes (Carrillo-Vico *et al.*, 2005; Pontes *et al.*, 2006; Pires-Lapa *et al.*, 2013); aumenta ainda a atividade celular no sistema linfoide, no baço e na medula óssea; estimula a síntese de algumas citocinas, como as interleucinas (IL)-2, IL-6, IL-12 e o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) (revisto por Miller *et al.*, 2006); e regula a síntese de óxido nítrico (NO) em células endoteliais vasculares (Tamura *et al.*, 2009), o que pode ser um mecanismo adicional pelo qual a melatonina modula a tensão dos vasos sanguíneos (Geary *et al.*, 1997). Por outro lado, a ausência de melatonina endógena diminui tanto a imunidade celular quanto humoral (Maestroni, 2001).

Pelo exposto acima, nota-se a característica altamente pleiotrópica desta molécula, exercendo importantes papéis moduladores, principalmente no que diz respeito ao sistema de defesa do organismo.

### **1.3 Mecanismos de ação da melatonina**

Uma molécula com tanta variedade de efeitos como a melatonina também apresenta uma grande diversidade de mecanismos de ação. A melatonina exerce seus efeitos principalmente pela ativação de receptores de membrana de alta afinidade, mas também apresenta capacidade de ligação a diversas moléculas intracelulares, acarretando em modulação de cascatas de sinalização. Além disso,

também tem sido sugerida ação nuclear da melatonina, ativando direta ou indiretamente receptores nucleares que regulam a transcrição de genes alvos.

Em mamíferos existem dois tipos de receptores de alta afinidade à melatonina (MTRs, do inglês *melatonin receptors*), sendo ambos receptores de sete domínios transmembrânicos acoplados à proteína G (GPCR), denominados MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub>. Assim como na história da descoberta das funções da melatonina, os anfíbios também tiveram participação importante na história da descoberta destes receptores. Os primeiros indícios da existência de tais receptores vieram dos estudos em melanóforos de sapo, em que tanto indolaminas de estrutura semelhante à melatonina quanto a toxina pertussis inibiram o efeito da melatonina sobre a agregação dos pigmentos nos melanóforos (Heward & Hadley, 1975; White *et al.*, 1987). Esta última observação evidenciou a presença de receptores acoplados à proteína G mediando o efeito da melatonina, pois a toxina pertussis inativa o acoplamento do receptor à proteína G<sub>i</sub>. De forma semelhante, estudos com retina de aves também sugeriram que o efeito inibitório da melatonina sobre a liberação de [<sup>3</sup>H]-dopamina deveria ser mediado por receptor, uma vez que ocorria com baixas concentrações de melatonina e que era mimetizado ou anulado pelo uso de outras moléculas de estrutura similar - agonistas ou antagonistas, respectivamente (Dubocovich, 1985). Nessa mesma época, o desenvolvimento da molécula de melatonina ionizada com <sup>125</sup>I (2-[<sup>125</sup>I]-iodomelatonina) (Vakkuri *et al.*, 1984) possibilitou a detecção de sítios de ligação de alta afinidade à melatonina em diversas áreas do cérebro de mamíferos e na retina e cérebro de aves (Dubocovich & Takahashi, 1987; Vanecek *et al.*, 1987; Duncan *et al.*, 1988; Laudon *et al.*, 1988; Dubocovich *et al.*, 1989; Weaver *et al.*, 1989). Devido às diferenças nas características farmacológicas dos sítios de ligação à melatonina presentes em retinas de coelho ou



aves e as presentes no cérebro de roedores, os receptores de melatonina foram inicialmente subdivididos em duas classes: ML<sub>1</sub> e ML<sub>2</sub> (Dubocovich, 1988).

O receptor de melatonina de sapo, que apresenta características farmacológicas da classe 1 dos receptores de melatonina (ML<sub>1</sub>), foi o primeiro a ser clonado (Ebisawa *et al.*, 1994). Em mamíferos, foram clonados outros dois subtipos de receptores do tipo ML<sub>1</sub> (Reppert *et al.*, 1994, 1995), de modo que essa classe foi subdividida em ML<sub>1a</sub>, ML<sub>1b</sub> e ML<sub>1c</sub> (Dubocovich, 1995). Estudos subsequentes comprovaram que os receptores ML<sub>1a</sub> e ML<sub>1b</sub> estão presentes em diversos mamíferos enquanto que o ML<sub>1c</sub>, o primeiro a ser clonado, é exclusivo de vertebrados não-mamíferos. Essa nomenclatura original foi posteriormente normatizada pela União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica (IUPHAR, do inglês *International Union of Basic and Clinical Pharmacology*), que regulamenta os receptores de mamíferos, de modo que os receptores ML<sub>1a</sub> e ML<sub>1b</sub> são hoje denominados de MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub>, respectivamente, enquanto que o ML<sub>1c</sub> não sofreu alterações em sua nomenclatura (Dubocovich *et al.*, 2000). O receptor ML<sub>2</sub> chegou a ser denominado de MT<sub>3</sub>, porém, ficou demonstrado que não se trata de um receptor acoplado à proteína G, e sim de uma enzima, a quinona redutase 2 (Nosjean *et al.*, 2000). A família de receptores de melatonina de mamíferos conta ainda com um receptor órfão, o GPR50 que, embora não seja capaz de se ligar à melatonina, apresenta 45% de identidade com MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub> na sequência de aminoácidos, além de similaridades filogenéticas e estruturais (Reppert *et al.*, 1996). O GPR50 é encontrado somente em mamíferos e, de acordo com alguns estudos filogenéticos, acredita-se que seja o ortólogo do receptor Mel<sub>1c</sub> de não-mamíferos (Dufourny *et al.*, 2008).

Os receptores MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub> são amplamente distribuídos, tendo sido detectados praticamente em todos os tipos celulares de mamíferos (revisto por Zlotos *et al.*, 2014). Classicamente, ambos receptores sinalizam via proteína G<sub>i</sub> (inibitória),

resultando, portanto, em inibição do segundo mensageiro AMPc e, conseqüentemente, da sinalização mediada pela via AMPc-PKA-CREB. Acoplamento destes receptores à proteína  $G_{q/11}$  também já foi descrito e, neste caso, está relacionado à ativação da via de sinalização mediada pela proteína fosfolipase C (PLC), induzindo aumento nos níveis intracelulares do segundo mensageiro inositol trifosfato ( $IP_3$ ) e de cálcio, e ativação da proteína quinase C (PKC) (Brydon *et al.*, 1999; Mackenzie *et al.*, 2002). Foi também demonstrada a ativação da via das MAP quinases (MAPK, do inglês *mitogen-activated protein kinases*) pelos receptores de melatonina, levando à fosforilação de MEK 1/2 e ERK 1/2 (Chan *et al.*, 2002; revisto por Hardeland, 2009).

Embora as vias de sinalização de  $MT_1$  e  $MT_2$  sejam aparentemente redundantes, não havendo sinalização específica que os diferencie, a distribuição e o padrão de expressão desses dois receptores pode ser tecido-específicos. Foram descritos inclusive papéis antagônicos dos receptores de melatonina, como por exemplo na mediação dos efeitos da melatonina na vasoconstrição e vasodilatação arteriais (Masana *et al.*, 2002). Nos NSQs ambos receptores estão presentes, mas a ativação de PKC induzida por melatonina ocorre somente via  $MT_2$ , e não por  $MT_1$  (Hunt *et al.*, 2001). A melatonina atua na sincronização da atividade rítmica desses neurônios, sendo que sua ação via o receptor  $MT_1$  inibe a taxa de disparos de potenciais de ação nestas células, enquanto que a ação via  $MT_2$  induz adiantamento de fase do ritmo de disparos, o que reflete no adiantamento de fase no ritmo comportamental de atividade/repouso desses animais (Hunt *et al.*, 2001; revisto por Dubocovich & Markowska, 2005). Nas células mononucleares do sistema imunológico, o aumento da atividade fagocitária induzido pela melatonina é mediado pelo receptor  $MT_2$  (Pires-Lapa *et al.*, 2013), enquanto que a indução da expressão de IL-2 ocorre via ativação de receptores  $MT_1$  (Carrillo-Vico *et al.*, 2003). Já

o efeito anti-apoptótico da melatonina sobre as células do sistema imunológico pode ser tanto dependente (Radogna *et al.*, 2007; Maldonado *et al.*, 2013) quanto independente (Hardeland, 2009; Espino *et al.*, 2010) da ativação de receptores de melatonina.

A especificidade tecidual na ação dos MTRs pode também depender da formação de complexos diméricos entre os mesmos. A dimerização ou mesmo oligomerização de GPCRs tem sido cada vez mais descrita e confere maior diversidade e complexidade aos mecanismos de regulação e sinalização desses receptores de membrana (Tadagaki *et al.*, 2012). O desenvolvimento de técnicas como a de transferência de energia bioluminescente por ressonância - BRET (do inglês *bioluminescence resonance energy transfer*) permitiu uma melhor compreensão a respeito das interações dos GPCRs entre si, bem como das interações destes com seus acopladores intracelulares, possibilitando a detecção de alterações nas propriedades farmacológicas e nas sinalizações intracelulares dependendo da conformação em que determinado receptor se encontra (Jockers *et al.*, 2008).

Com relação aos receptores de melatonina, foi demonstrado em células de linhagem derivadas de rim de embrião humano (HEK293), expressando quantidades fisiológicas de MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub> recombinantes, que estes receptores formam preferencialmente heterodímeros (MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub>) ou homodímeros de MT<sub>1</sub>, enquanto que a propensão para formação de homodímeros de MT<sub>2</sub> é de 3 a 4 vezes menor (Ayoub *et al.*, 2004). Mais recentemente, a relevância fisiológica da formação do heterodímero MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub> foi comprovada em células fotorreceptoras da retina (Baba *et al.*, 2013). A melatonina aumenta a fotossensibilidade destas células e este efeito é mediado pela ativação do heterodímero MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub>, que induz cascata de sinalização específica a este complexo, via enzimas PLC e PKC. Por fim, a heterodimerização pode ainda modular a funcionalidade dos receptores. Foi demonstrado em células

HEK293 que a interação de MT<sub>1</sub> com o receptor órfão GPR50 inibe completamente a ligação de alta afinidade dos agonistas a MT<sub>1</sub>, bem como a formação do complexo heterotrimérico entre MT<sub>1</sub> e as subunidades da proteína G, e também sua ligação à  $\beta$ -arrestina (Levoye *et al.*, 2006).

A melatonina também pode atuar diretamente sobre alvos intracelulares e nucleares (Finocchiaro & Glikin, 1998). Por ser uma molécula anfifílica, a melatonina atravessa facilmente as membranas celulares (Shida *et al.*, 1994). Dentre as moléculas intracelulares às quais a melatonina se liga estão a calmodulina (Benítez-King *et al.*, 1991), uma proteína reguladora de diversas enzimas quinases; e os receptores nucleares da família do ácido retinoico (ROR $\alpha$ 1, ROR $\alpha$ 2, RZR $\alpha$ , RZR $\beta$ ), embora ainda existam dúvidas se o efeito da melatonina sobre esses receptores é direto ou indireto (revisto por Hardeland, 2009). A interação da melatonina com a calmodulina inibe a formação do complexo cálcio-calmodulina resultando em inibição da atividade de enzimas dependentes desse complexo, como a adenilil ciclase (de Almeida-Paula *et al.*, 2005) e enzimas quinases (Benítez-King & Antón-Tay, 1993). Embora esta seja uma interação de baixa afinidade, esta via de sinalização da melatonina está envolvida, por exemplo, nos efeitos da melatonina sobre o citoesqueleto (Benítez-King, 2006), sobre a expressão de receptores colinérgicos nicotínicos (de Almeida-Paula *et al.*, 2005), e sobre a sinalização dos receptores de estrógeno em células tumorais (Mediavilla *et al.*, 2010).

## **2. Interações entre o sistema melatonérgico e o sistema imunológico: o eixo imune-pineal**

Desde os primeiros estudos a respeito da função pineal ficou evidenciada a existência de uma relação entre essa glândula e o sistema imunológico. Foi observado que a retirada cirúrgica da glândula pineal gerava alterações em órgãos

relevantes ao sistema imune, como o timo e a glândula adrenal (Vaughan & Reiter, 1971; Csaba & Baráth, 1975). Estudos posteriores confirmaram o papel modulatório do hormônio da pineal sobre os componentes do sistema imunológico, conforme mencionado anteriormente. Entretanto, a detecção da via inversa, ou seja, de uma modulação exercida pelo sistema imune sobre a glândula pineal, é mais recente.

Estudos do nosso grupo da década de noventa demonstraram que o tamanho da pata de camundongo infectada cronicamente com BCG (Bacilo Calmette-Guerin) varia ao longo das 24 horas, sendo menor durante a fase de escuro (Lopes *et al.*, 1997). Este ritmo é imposto pela melatonina, sendo abolido com a retirada da glândula pineal. A retirada da glândula adrenal também abole o ritmo da espessura da pata e reduz a concentração plasmática de melatonina (Lopes *et al.*, 2001). Tais resultados sugeriram, portanto, a existência de uma modulação da atividade da pineal pela glândula adrenal. De fato, estudos posteriores confirmaram que o hormônio da adrenal de roedores, a corticosterona, é capaz de potenciar a síntese de melatonina pela glândula pineal, tanto em condições *in vitro* quanto *in vivo* (Ferreira *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2009). O aumento nos níveis circulantes de corticosterona em resposta a uma condição de estresse moderado também resulta em potenciação da síntese de melatonina (Couto-Moraes *et al.*, 2009).

Como a corticosterona exerce papel anti-inflamatório na resposta imune, questionou-se em seguida se agentes pró-inflamatórios também seriam capazes de modular a atividade da pineal e se teriam efeito oposto ao observado com a corticosterona. Ensaio *in vitro* demonstraram que a citocina pró-inflamatória TNF (*tumor necrosis factor*) inibe a expressão gênica da enzima AA-NAT e, conseqüentemente, a síntese de melatonina (Fernandes *et al.*, 2006). O mesmo efeito inibitório sobre a síntese de melatonina foi observado em pineais incubadas na presença do agente patogênico LPS, um lipopolissacarídeo de membrana de

bactérias gram-negativas, e também em condição *in vivo*, na qual a concentração plasmática noturna de melatonina foi significativamente reduzida em ratos injetados com LPS (da Silveira Cruz-Machado *et al.*, 2010; Tamura *et al.*, 2010). O efeito inibitório de TNF foi corroborado em estudos *in vivo*, analisando respostas inflamatórias em humanos. Mulheres que desenvolvem mastite, um processo inflamatório não infeccioso causado pela sucção durante a amamentação, apresentam altos níveis circulantes de TNF e ausência de ritmo diário de melatonina, sendo este restaurado somente quando os níveis da citocina diminuem (Pontes *et al.*, 2006, 2007). Similarmente, mulheres submetidas a procedimento cirúrgico de retirada do útero (histerectomia) apresentam drástica redução nos níveis plasmáticos noturnos de melatonina no dia da cirurgia e, mesmo quando estes retornam aos valores basais, observa-se que os níveis desse hormônio são menores nas pacientes que apresentam altos níveis de TNF (de Oliveira Tatsch-Dias *et al.*, 2013). Dessa forma, substâncias anti e pró-inflamatórias (corticosterona e TNF, respectivamente) apresentam efeitos antagônicos quanto à modulação da atividade biossintética da glândula pineal. A existência de uma retroalimentação do sistema imunológico sobre a glândula pineal foi inicialmente hipotetizada como um mecanismo relevante à manutenção da homeostase, visto a importância do papel da melatonina sobre os componentes imunológicos (Skwarlo-Sonta, 1996; Skwarlo-Sonta *et al.*, 2003; Tsai *et al.*, 2001).

A continuidade dos estudos por nosso grupo possibilitou uma melhor caracterização do papel da melatonina e da glândula pineal durante uma resposta imune. Um dos efeitos imunomodulatórios da melatonina em concentrações fisiológicas é o de inibir o rolamento e a adesão de leucócitos sobre a camada endotelial dos vasos, limitando a migração celular da circulação sanguínea para os tecidos (Lotufo *et al.*, 2001, 2006). Entretanto, na vigência de uma resposta imune, tais

etapas são necessárias para que as células imunocompetentes circulantes alcancem o local afetado. Analisados em conjunto, esses dados indicam que no início da montagem de uma resposta imune inata, os altos níveis de TNF produzidos inibem a síntese de melatonina pela pineal. Essa inibição transiente condiz com uma ativação apropriada do sistema imunológico, permitindo que as células imunocompetentes migrem para o tecido. Concomitantemente, essas mesmas células passam a produzir melatonina em altas concentrações no local da resposta, o que auxilia na proliferação, atividade fagocitária e apresentação de antígenos por essas células (conforme mencionado no item 1.2). Já na fase anti-inflamatória da resposta, a síntese de melatonina pela pineal é restaurada. Isso ocorre tanto pela diminuição na concentração dos fatores inibitórios (como o TNF, por exemplo), quanto pelo aumento da corticosterona circulante, que potencia a atividade endócrina da pineal. Portanto, além do controle da síntese de melatonina pelo oscilador circadiano central (NSQs), nosso grupo tem demonstrado através de diferentes modelos que a pineal pode ter sua atividade biossintética modulada em determinadas situações de injúria, independentemente do ciclo claro/escuro ambiental. Essas interações entre o sistema imunológico e a glândula pineal formam as bases do conceito do **Eixo Imune-Pineal** (fig. 4) (Markus *et al.*, 2007, 2013; Markus & Ferreira, 2011).

Hoje sabemos que a glândula pineal é de fato instrumentada para responder a moléculas ativadoras da resposta imune e relacionadas ao reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou de substâncias endógenas associadas a dano (DAMPs). Pinealócitos expressam receptores que reconhecem citocinas, como o receptor de TNF (TNFR) (Carvalho-Sousa *et al.*, 2011), e receptores da família *toll* (TLRs, do inglês *toll-like receptors*), como o TLR4 (da Silveira Cruz-Machado *et al.*, 2010, 2012). Os TLRs são receptores especializados no reconhecimento de PAMPs, como polissacarídeos de bactérias e RNA viral, e

também de algumas substâncias endógenas (DAMPs) como as *heat shock proteins*, ácidos graxos, lipoproteínas, ácidos nucleicos, glicosaminoglicanos, ATP, dentre outros, que sinalizam a ocorrência de dano celular ou tecidual (revisto por Bianchi, 2007).

Em resumo, a obtenção de tais dados estabeleceu o conceito de que a síntese de melatonina pela glândula pineal depende não só do fator ambiental, mas também da condição fisiopatológica do organismo.

## **2.1 Fator de transcrição NFKB**

O mecanismo de ação de TNF, LPS e corticosterona na modulação da síntese de melatonina pela pineal, descrito anteriormente, envolve o fator de transcrição NF- $\kappa$ B (do inglês, *nuclear fator kappa B*). A indução da translocação nuclear das subunidades de NF- $\kappa$ B por TNF ou LPS bloqueia a síntese de melatonina, enquanto que sua inibição por corticosterona gera uma potenciação na produção hormonal pela pineal (Ferreira *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2006; da Silveira Cruz-Machado *et al.*, 2010; Carvalho-Sousa *et al.*, 2011).

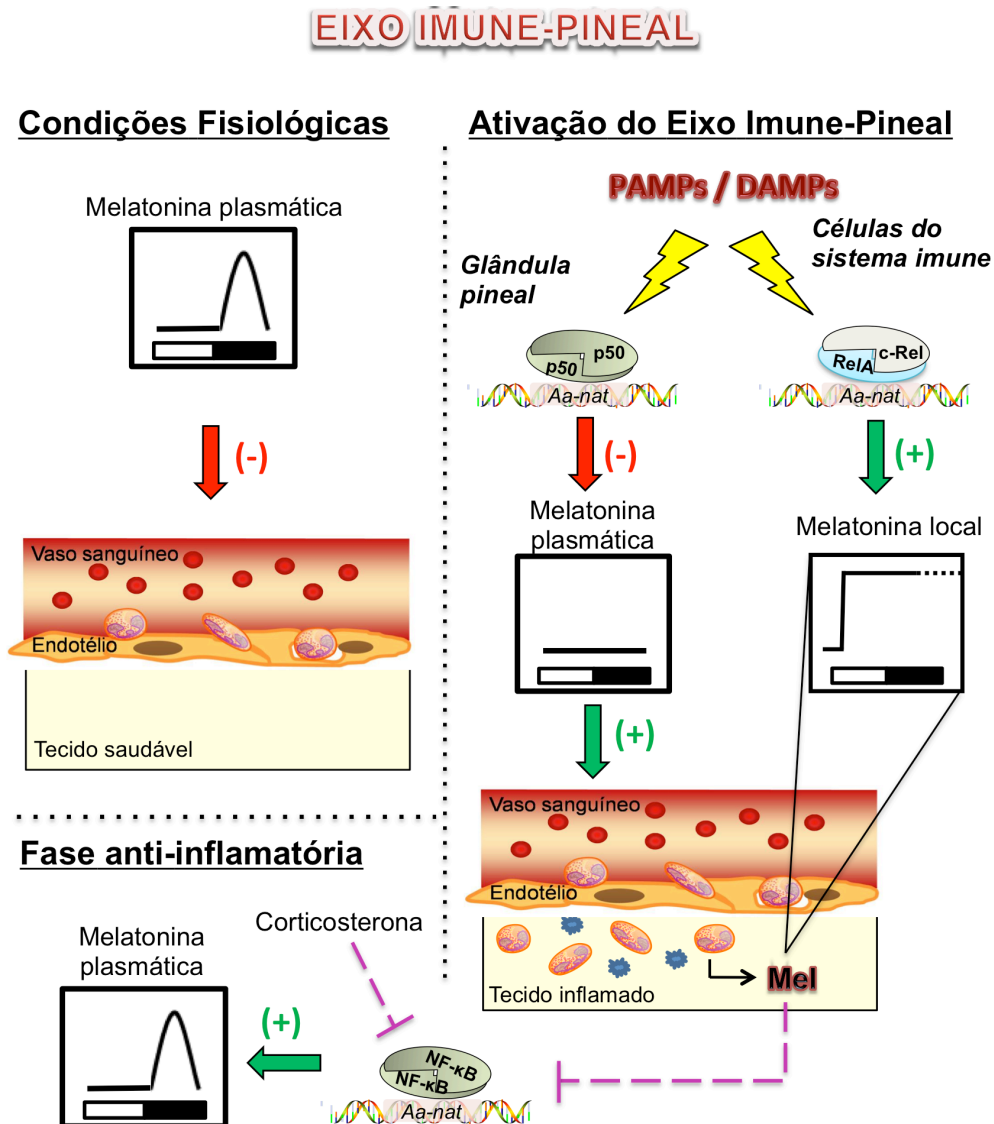
O NF- $\kappa$ B foi descrito primeiramente como fator de transcrição regulador do gene que transcreve a cadeia leve  $\kappa$  de imunoglobulinas em linfócitos B (Sen & Baltimore, 1986), mas atualmente sabe-se que está presente nos mais diversos tipos celulares. Em mamíferos, a família NF- $\kappa$ B engloba 5 proteínas distintas que têm em comum o domínio de homologia REL e que atuam sob a forma de homo- ou heterodímeros. As subunidades de NF- $\kappa$ B são: RelA (ou p65), Rel B, c-Rel, p50 e p52, sendo que p50 e p52 provém do processamento proteassomal de precursores maiores - p105 e p100, respectivamente (Ghosh *et al.*, 1998). As subunidades RelA, c-Rel e Rel B são tidas como ativadoras da transcrição gênica, pois apresentam um domínio de transativação (TAD), enquanto que as demais são tidas como repressoras da



transcrição de seus genes alvos quando na forma de homodímeros (Hayden & Ghosh, 2008, 2012). De modo geral, a via do NF- $\kappa$ B é classicamente ativada por estímulos imunogênicos, como bactérias e vírus, ou moléculas sinalizadoras como citocinas, sinais apoptóticos, fatores de crescimento, dentre outros (Traenckner *et al.*, 1995; Baeuerle & Baltimore, 1996). Quando a via não está ativada, as subunidades do NF- $\kappa$ B encontram-se no citoplasma, ligadas à proteínas inibitórias da família I $\kappa$ B. Frente a um desses estímulos citados, um complexo específico de enzimas quinases (IKK) é ativado, fosforilando a I $\kappa$ B, que é então ubiquitinada e sinalizada para degradação por proteassomas. Com isso, os dímeros de NF- $\kappa$ B livres migram para o núcleo e ligam-se às sequências promotoras responsivas a este fator nos diversos genes-alvo. Classicamente, a translocação nuclear de NF- $\kappa$ B obedece a um padrão oscilatório ao longo do tempo, sendo caracterizada como uma resposta de ativação rápida mas que pode reverberar e apresentar fases tardias (Nelson *et al.*, 2004).

Este fator de transcrição compreende uma via central dentro do contexto do eixo imune-pineal, mediando a alteração entre as diferentes fontes de produção de melatonina durante uma resposta imune inata (Markus *et al.*, 2013). Estudos *in silico* (Markus *et al.*, 2007) e de ensaios de gene-repórter (Muxel *et al.*, 2012) demonstraram a presença e a funcionalidade de elementos responsivos ao NF- $\kappa$ B na região promotora e no primeiro intron do gene *Aanat*, enzima-chave na síntese de melatonina. Conforme mencionado anteriormente, a ativação da via NF- $\kappa$ B na glândula pineal resulta em inibição da síntese de melatonina. Por outro lado, a ativação de outras subunidades de NF- $\kappa$ B nas células imunocompetentes tem efeito oposto sobre este mesmo gene, acarretando em indução da expressão de *Aanat* e, conseqüentemente, da síntese de melatonina por estas células (Muxel *et al.*, 2012). Dessa forma, a via NF- $\kappa$ B é diretamente responsável pela alternância entre a

produção pineal e extra-pineal de melatonina na presença de um mesmo estímulo patogênico ou inflamatório, conforme esquematizado na figura 4.



**Figura 4 - Esquema representativo do eixo imune-pineal.** Em condições fisiológicas (lado esquerdo), a melatonina plasmática noturna exerce efeito inibitório sobre a migração de células imunocompetentes da circulação para os tecidos, agindo sobre a camada endotelial dos vasos. Durante uma resposta inflamatória (lado direito), DAMPs ou PAMPs ativam receptores TLRs tanto nas células imunocompetentes quanto na glândula pineal, caracterizando a ativação do eixo imune-pineal. Na pineal, a ativação de NF-κB resulta em inibição da síntese de melatonina, o que permite a migração apropriada das células do sistema imunológico ao tecido afetado. Já a ativação de NF-κB nestas células resulta em produção local de melatonina, que auxilia na resolução da resposta. Na fase anti-inflamatória, tanto a corticosterona quanto a própria melatonina inibem a ação de NF-κB e a produção de melatonina pela pineal é restaurada (modificado de Markus *et al.*, 2013).

A via do NF- $\kappa$ B é uma via clássica na mediação da resposta imune inata, sendo que seus principais genes-alvos são aqueles que codificam proteínas relacionadas a respostas inflamatórias, como os de citocinas (TNF, IL-2, IL-6) e seus respectivos receptores, moléculas de adesão (VCAM, ICAM), além de enzimas que também participam da resposta imune inata, como a sintase de óxido nítrico induzida (iNOS) e a ciclooxigenase 2 (COX-2) (O'Neill & Kaltschmidt, 2007). Além disso, as próprias proteínas I $\kappa$ Bs são reguladas positivamente pelo NF- $\kappa$ B, constituindo um mecanismo de retroalimentação negativa, essencial para finalizar e limitar a resposta inflamatória (Hayden & Ghosh, 2008).

O crescente estudo desta via de sinalização constatou que diversos tipos celulares apresentam ativação constitutiva de NF- $\kappa$ B, o que ampliou a gama de funções dessa família de fatores de transcrição, não mais restringindo-os às células do sistema imunológico. Essa ativação basal tem função na diferenciação e maturação de células plasmáticas, macrófagos, linfócitos B e até mesmo em mecanismos de neuroproteção (Ghosh *et al.*, 1998; Kaltschmidt & Kaltschmidt, 2000; Bhakar *et al.*, 2002; O'Neill & Kaltschmidt, 2007). Na própria glândula pineal foi constatada a ativação constitutiva de homodímeros da subunidade p50 de NF- $\kappa$ B, exibindo um padrão rítmico de maneira inversa ao de produção de melatonina, o que sugere um papel fisiológico desta via na atividade da glândula (Cecon *et al.*, 2010). A importância dos processos fisiológicos nos quais o NF- $\kappa$ B participa requer um controle fino de sua atividade. De fato, qualquer alteração na ativação desta via, seja para mais ou para menos, pode acarretar em níveis patológicos de NF- $\kappa$ B que têm sido relacionado com diversas patologias, como doenças neurodegenerativas e câncer (Mattson & Camandola, 2001; Tergaonkar, 2006; Sun & Zhang, 2007; Morais *et al.*, 2011).

No sistema nervoso central, as respostas neuroinflamatórias são mediadas pela ativação e proliferação de células gliais, principalmente microglia, e o NF- $\kappa$ B é um fator central nessas respostas. A ativação do NF- $\kappa$ B em células neuronais desafiadas com estímulo tóxico tem papel neuroprotetor (Kaltschmidt *et al.*, 1999; 2005), ativando vias anti-apoptóticas. Já a ativação de NF- $\kappa$ B em microglia e em astrócitos está relacionada à produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios que, em última instância, podem ser nocivos às células neuronais (Qin *et al.*, 1998).

A maioria das patologias neurodegenerativas envolve um componente inflamatório, claramente evidenciado pela detecção morfológica de microglia ativada nas análises *post-mortem* de cérebros humanos e de modelos animais (Terai *et al.*, 1996). Embora essas primeiras observações tenham induzido a interpretação de que a ativação microglial seja uma das causas da morte neuronal em tais patologias, hoje sabe-se que essas células são essenciais à manutenção do tecido cerebral, removendo debris celulares e modulando as conexões sinápticas (revisto por Aguzzi, 2013). Por outro lado, a prolongação da resposta neuroinflamatória e sua não-resolução resulta em acúmulo de moléculas neurotóxicas, levando então à morte neuronal (Mattson & Camandola, 2001). Essa resposta neuroinflamatória intermitente, mediada pelo NF- $\kappa$ B nas células gliais, tem sido considerada um dos fatores causais dos processos neurodegenerativos em diversas patologias (Glass *et al.*, 2010).

### **3. Sistema melatonérgico em condições patológicas - Doença de Alzheimer**

Dentre as doenças neurodegenerativas relacionadas ao envelhecimento, as mais comuns são: doença de Alzheimer (AD), Parkinson, Huntington e a esclerose lateral amiotrófica, sendo que todas elas têm em comum uma vulnerabilidade neuronal em áreas cerebrais específicas e depósitos de proteínas em conformações

anormais em neurônios ou no espaço extracelular (revisto por Ross & Poirier, 2004). A doença de Alzheimer é o tipo de demência mais comumente observado em todo o mundo, afetando mais de 40 milhões de pessoas atualmente ([www.who.int](http://www.who.int)). Por ser uma patologia relacionada ao envelhecimento, o risco de desenvolver AD chega a ser de quase 50% para indivíduos acima de 85 anos, sendo que o número de casos deverá dobrar nos próximos 20 anos, conforme aumenta a expectativa de vida da população. Embora não haja estudos epidemiológicos no Brasil, sabe-se que a prevalência de AD é maior nos países em desenvolvimento e isso tende a aumentar ainda mais nos próximos anos ([www.alz.co.uk/research/statistics](http://www.alz.co.uk/research/statistics)).

A doença de Alzheimer foi primeiramente descrita em 1906, pelo médico Alois Alzheimer, que observou a presença de agregados anormais no cérebro de uma paciente, cuja perda de memória progressiva chamou-lhe a atenção. Apesar de ainda hoje não existir método diagnóstico precoce desta doença, os principais sintomas compreendem confusão mental, perda de memória recente e da capacidade de aprendizado, que avançam progressivamente até a demência. Estes sintomas são consequência da neurodegeneração massiva em múltiplas áreas encefálicas, como o hipocampo e amígdala (Choonara *et al.*, 2009). As alterações moleculares características dessa doença e que têm sido relacionadas ao processo de neurodegeneração compreendem a formação das placas senis, compostas por agregados do peptídeo beta-amiloide ( $A\beta$ , do inglês *amyloid-beta peptide*) de diferentes tamanhos (39 a 43 aminoácidos), e a formação de novos neurofibrilares intracelulares constituídos pela proteína tau hiperfosforilada. Esta é uma proteína relacionada aos microtúbulos do citoesqueleto e sua fosforilação anormal gera esses novos que podem estar relacionados à defasagem sináptica da AD (Cárdenas *et al.*, 2012).

Muitos trabalhos relatam que a concentração noturna de melatonina dosada no sangue, no líquor ou ainda na urina (pela dosagem do principal metabólito da melatonina - 6-sulfatoximelatonina) decaem de 20% a 80% com o avançar da idade (Skene *et al.*, 1990; Magri *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999). Por outro lado, também existem autores que defendem que essas alterações não ocorrem em um envelhecimento saudável (Zeitzer *et al.*, 1999; Ackermann & Stehle, 2006). De qualquer forma, há uma redução ainda maior na produção de melatonina em pacientes com AD comparados a indivíduos controle de mesma idade (Liu *et al.*, 1999). O trabalho de Wu e colaboradores (2003) relata que essa redução é observada já nos primeiros estágios da AD, denominados estágios Braak I-II. Esta escala de estagiamento foi desenvolvida por análise *post-mortem* das alterações moleculares observadas no cérebro de pacientes com diferentes graus de comprometimento cognitivo, sendo que os estágio I-II referem-se a indivíduos com as primeiras alterações moleculares mas sem nenhum sintoma de déficit cognitivo, enquanto que os estágios Braak V-VI referem-se aos estágios mais avançados da doença (Braak & Braak, 1995). Como o declínio da produção de melatonina antecede os sintomas da demência, foi ainda sugerido o uso dessa dosagem hormonal como um marcador biológico primário do início da doença (Wu & Swaab, 2005). Além da produção de melatonina reduzida, pacientes de estágios avançados de AD apresentam também considerável redução na expressão dos receptores de melatonina MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub> em algumas áreas cerebrais, como no hipocampo e hipotálamo (Savaskan *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2007).

A administração de melatonina a pacientes de AD tem-se mostrado efetiva em amenizar alguns dos sintomas da doença, como problemas relacionados ao sono e alterações comportamentais (Brusco *et al.*, 2000; Mahlberg *et al.*, 2004; Wang & Wang, 2006; Wu & Swaab, 2007). Em modelos animais da doença, a melatonina também foi capaz de melhorar parâmetros cognitivos (Feng *et al.*, 2004a,b; Cheng *et*

*al.*, 2006; Olcese *et al.*, 2009). Entretanto, existem também estudos que não foram bem sucedidos na demonstração dos efeitos benéficos da melatonina (Serfaty *et al.*, 2002; Singer *et al.*, 2003; Dowling *et al.*, 2008; Gehrman *et al.*, 2009; Cardinali *et al.*, 2010), o que pode ser devido ao estágio avançado do comprometimento do sistema melatonérgico nestes pacientes.

Em face do conceito do eixo imune-pineal, no qual este sistema está intimamente relacionado à processos inflamatórios, levantamos a hipótese de que o sistema melatonérgico poderia compreender um dos primeiros alvos das alterações moleculares desencadeadas em AD.

### 3.1 Peptídeo $\beta$ -amiloide

Uma das hipóteses mais aceitas atualmente quanto à etiologia da AD considera como fator principal a resposta neuroinflamatória induzida pela produção exacerbada e má conformação dos peptídeos  $A\beta$  (Hardy & Selkoe, 2002; Mucke, 2009; Glass *et al.*, 2010). O peptídeo  $A\beta$  origina-se a partir da clivagem da proteína precursora amiloide (APP, do inglês *amyloid precursor protein*), uma proteína transmembrânica encontrada preferencialmente nas terminações nervosas. Os fragmentos de  $\beta$ -amiloide compostos de 40 a 42 aminoácidos ( $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{1-42}$ , respectivamente) são os produtos predominantemente formados no cérebro pelo processamento proteolítico da APP por um complexo de enzimas secretases ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ). Estes fragmentos diferem entre si não só quanto ao comprimento como também com relação a algumas propriedades conformacionais e citotóxicas, sendo que o fragmento  $A\beta_{1-42}$  tem maior propensão a formar agregados fibrilares e é frequentemente reportado como mais tóxico do que  $A\beta_{1-40}$  às células neuronais (Hardy & Selkoe, 2002). Mutações nos genes que codificam tanto APP quanto as subunidades do complexo enzimático que cliva esta proteína são fatores de risco

para o desenvolvimento de AD (Bossy-Wetzel *et al.*, 2004). Entretanto, vale a pena ressaltar que menos de 10% dos casos de Alzheimer são devido a causas genéticas conhecidas, designados como Alzheimer familiar, enquanto que a grande maioria dos casos é designada como esporádica, com causas ainda desconhecidas que envolvem fatores genéticos e ambientais.

A geração de peptídeos amiloide está altamente relacionada à atividade neuronal (Cirrito *et al.*, 2005; Cavallucci *et al.*, 2012), o que indica um importante papel fisiológico tanto da APP quanto dos produtos de sua clivagem no controle da excitabilidade neuronal por mecanismo de retroalimentação negativa. Em um outro estudo foi demonstrado que o efeito de A $\beta$  sobre a excitabilidade neuronal pode ser dual, dependendo da concentração do peptídeo, já que aplicação de baixas concentrações de A $\beta$  (na faixa de pM) potenciou a transmissão sináptica, enquanto que concentrações mais elevadas (na faixa de nM) induziram depressão sináptica (Puzzo *et al.*, 2008). Por fim, a observação de que animais transgênicos deficientes quanto à produção de A $\beta$  apresentam déficits cognitivos (Seabrook *et al.*, 1999; Saura *et al.*, 2004) corrobora a ideia de que concentrações bem reguladas deste peptídeo são necessárias para um bom funcionamento cognitivo, reforçando sua relevância fisiológica.

O desequilíbrio entre a síntese e degradação de A $\beta$  resulta em aumento na concentração extracelular deste peptídeo e prejuízo das interações sinápticas (revisito por Kim & Tsai, 2009; Palop & Mucke, 2010; Aydin *et al.*, 2012). Existem também evidências de que A $\beta$  possa acumular intracelularmente, mas os mecanismos envolvidos e as consequências desse acúmulo não são bem conhecidas (Mucke & Selkoe, 2012). Com relação à toxicidade de A $\beta$ , acredita-se que os efeitos neurotóxicos sejam exercidos pelo peptídeo ainda sob a forma solúvel, e não pelas placas senis formadas por agregados fibrilares (Kirkitadze *et al.*, 2002; Berthelot *et al.*,



2013). Apesar de grandes investimentos e esforços nos estudos científicos desta doença, ainda pouco se sabe a respeito dos mecanismos de ação de A $\beta$  que se correlacionam com os primeiros estágios da patologia de Alzheimer.

Diversos mecanismos tem sido relacionados aos processos de neurodegeneração por A $\beta$ , embora ainda seja difícil estabelecer uma relação causa/consequência entre tais processos e a patologia em si. Dentre estes mecanismos estão: ativação microglial exacerbada em resposta ao excesso de A $\beta$ , com liberação de citocinas neurotóxicas (Stewart *et al.*, 1997); liberação excessiva de aminoácidos excitotóxicos, como o glutamato (Bossy-Wetzel *et al.*, 2004); estresse oxidativo acompanhado de disfunção mitocondrial (Anandatheerthavarada *et al.*, 2003); e perda na densidade sináptica e na transmissão colinérgica, fenômenos observados desde os estágios iniciais de AD (Coyle *et al.*, 1983; Nordberg, 2001; Selkoe, 2002). Sabe-se que a transmissão sináptica excitatória é diretamente relacionada à neurotransmissão colinérgica e glutamatérgica, envolvendo receptores colinérgicos nicotínicos (nACh) e muscarínicos (mACh), e receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA (N-metil D-aspartato) e AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico). Atuando direta ou indiretamente sobre estes receptores, foi demonstrado que A $\beta$  é capaz de induzir a dessensibilização e internalização de receptores de glutamato NMDA (Snyder *et al.*, 2005), modular a atividade de receptores nACh do tipo  $\alpha$ 7 (Nordberg, 2001; Pettit *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2006; Jürgensen & Ferreira, 2010), e de inibir a potenciação de longa duração (LTP, do inglês *long-term potentiation*) (Li *et al.*, 2011), mecanismo essencial à plasticidade sináptica envolvida nos processos de memória e aprendizado.

De modo geral, o mais provável é que todos esses mecanismos atuem em conjunto, estando inter-relacionados e até interdependentes. Assim, o estresse oxidativo e a produção de citocinas, naturalmente aumentados no tecido cerebral de

idosos (revisto por Norden & Godbout, 2013), podem fazer parte de um ciclo vicioso juntamente com A $\beta$ , na medida em que irão regular positivamente a transcrição gênica de outros marcadores inflamatórios, como IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-18 e iNOS (Shi & Gibson, 2007), ativando ainda mais a microglia que, por sua vez, é também uma importante fonte de ROS (espécies reativas de oxigênio) (Jekabsone *et al.*, 2006). Outro ponto sinérgico é o fato de que tanto ROS quanto as citocinas pró-inflamatórias gliais e o próprio peptídeo A $\beta$  são capazes de ativar a via do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (Bales *et al.*, 1998; He *et al.*, 2012), o que eleva ainda mais a transcrição de genes inflamatórios.

Embora a ativação da microglia seja necessária para que ocorra a remoção fagocítica de A $\beta$ , a cronificação dessa resposta faz com que esse processo passe a ser neurotóxico. Foi demonstrado que a ativação glial é resultante da interação direta de A $\beta$  com o receptor TLR4 (Fassbender *et al.*, 2004; Walter *et al.*, 2007; Salminen *et al.*, 2009), sendo que camundongos deficientes para este receptor apresentam menor produção de NO induzida tanto por A $\beta$  quanto por LPS. Já camundongos transgênicos modelo de Alzheimer apresentam uma maior expressão de TLR4, o que também é observado em materiais *post-mortem* de cérebros humanos de AD (Walter *et al.*, 2007). Em suma, uma série de evidências indicam que o processo inflamatório crônico e progressivo é um dos componentes de AD e que, independentemente da relação causa/consequência, certamente contribui para os processos neurodegenerativos que levam à demência (Schwab & Mcgeer, 2008; Schwab *et al.*, 2010).

O fato de A $\beta$  atuar por vias de sinalização presentes na glândula pineal (TLR/NF- $\kappa$ B), aliado ao conceito do eixo imune-pineal, levaram-nos à formulação da hipótese de que a inibição da síntese de melatonina observada em AD possa ser devido a uma ação direta do peptídeo A $\beta$  sobre a pineal. Além disso, devido à

capacidade de  $A\beta$  em interferir na função de receptores de membrana, e com base na expressão reduzida de MTRs observada no cérebro de pacientes com AD, também investigamos as ações diretas de  $A\beta$  sobre a função dos MTRs.

# OBJETIVOS

*“Quem não sabe o que busca, não identifica o que acha.”*

Immanuel Kant

## OBJETIVOS

O objetivo geral do presente projeto é investigar se o peptídeo  $\beta$ -amiloide atua diretamente sobre o sistema melatonérgico, inibindo a síntese de melatonina pela glândula pineal e/ou afetando a sinalização da melatonina mediada por seus receptores de membrana.

### Objetivos específicos:

- 1 - Avaliar o efeito dos peptídeos  $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{1-42}$  sobre a produção de melatonina por glândulas pineais de ratos em cultura;
  - 1.1 Analisar as vias de sinalização ativadas por  $A\beta$ , com ênfase na via TLR/NF- $\kappa$ B e na expressão das enzimas AA-NAT e HIOMT.
- 2 - Avaliar o efeito dos peptídeos  $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{1-42}$  sobre a função dos receptores de melatonina  $MT_1$  e  $MT_2$ ;
  - 2.1 Investigar alterações nas propriedades farmacológicas desses receptores na presença de  $A\beta$ ;
  - 2.2 Analisar o efeito de  $A\beta$  sobre a propensão à formação de dímeros entre os MTRs.
  - 2.3 Investigar se  $A\beta$  interfere nas vias de sinalização intracelular induzidas pela melatonina;

# *MATERIAL E MÉTODOS*

*“A persistência é o caminho do êxito.”*

Charles Chaplin

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Animais*

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar de cerca de 2 meses de idade. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro 12h00/12h00, com comida e água *ad libitum*. Em todos os experimentos os animais foram eutanasiados por decapitação sem a administração de anestésicos. Este projeto foi realizado sob a licença da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências das USP (licença n° 111/2010), em concordância com a regulamentação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

### **Drogas e Reagentes**

As drogas e reagentes utilizados tiveram as seguintes procedências:

- 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA);
- 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonina (Perkin Elmer; Boston, MA, EUA);
- 2-iodomelatonina (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA);
- A $\beta$ <sub>1-40</sub> e A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Tocris Bioscience; Bristol, UK);
- A $\beta$ <sub>1-40</sub>-FAM (A $\beta$  conjugado à FAM) (Ana-Spec; Fremont, CA, EUA);
- Ácido polideoxinosínico-deoxicidídico [poli(dIdC)] (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA);
- Adenosina 5' - trifosfato, [<sup>32</sup>P]Easy Tides® (Perkin Elmer; Boston, MA, EUA);
- Acrilamida (Bio-Rad; Richmond, CA, EUA);
- Albumina bovina (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA);
- Anticorpo policlonal de coelho anti-iNOS (NOS2 - conjugado à TRITC; sc-651); anticorpos policlonais de coelho anti-subunidades de NF- $\kappa$ B: p50 (sc-114X), p52 (sc-298X), RelA (sc-109X), RelB (sc-226X) e c-Rel (sc-70X); anticorpos policlonais de cabra anti-Mel-1A-R (sc-13186) e anti-Mel-1B-R (sc-13177); anticorpo policlonal de coelho anti-ERK 2 (sc-154); anticorpo monoclonal de camundongo anti-p-ERK (sc-7383) (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, EUA);

- Anticorpo policlonal de coelho anti-P-AA-NAT (N-terminal, S-0814) e anticorpo secundário anti-coelho conjugado à FITC (F7512) (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA);
- Anticorpo secundário anti-cabra conjugado à FITC (Ab6881) (Abcam; Cambridge, UK);
- Anticorpo secundário anti-camundongo IRDye 680LT (827-11080) e anticorpo secundário anti-coelho 800CW (827-08365) (LI-COR Bioscience; Nebraska, EUA)
- Bisacrilamida (N, N'-metilenebisacrilamida) (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA);
- Ditiotreitól (DTT) (Invitrogen - Life Technologies; Grand Island, NY, EUA);
- Enzima DNase (Invitrogen - Life Technologies; Grand Island, NY, EUA);
- Enzima T4 quinase; (Invitrogen - Life Technologies; Grand Island, NY, EUA);
- Fenilmetanesulfonilfluorido (PMSF) (Invitrogen - Life Technologies; Grand Island, NY, EUA);
- Glicerol (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA)
- JetPEI (Polyplus-transfection; New York, NY, EUA)
- L-glutamina (Corning Cellgro; Manassas, VA, EUA)
- Meio de cultura DMEM - Dulbecco's modified Eagle Medium (GIBCO BRL - Life Technologies; Grand Island, NY, EUA);
- Meio de cultura BGJb (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA)
- Membrana de nitrocelulose e solução de bloqueio (LI-COR Bioscience; Nebraska, EUA);
- Nonidet-p40 (NP-40) (Calbiochem; Darmstadt, Alemanha);
- Noradrenalina (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA);
- Nucleotídeos (mix dNTP) (Invitrogen - Life Technologies; Grand Island, NY, EUA);
- Oligonucleotídeo consenso para NF- $\kappa$ B (Promega; Madison, WI, EUA);
- Oligonucleotídeos para PCR (Eurofin MWG Operon; Alabama, EUA);
- Penicilina/estreptomicina (GIBCO BRL - Life Technologies; Grand Island, NY, EUA);
- Poli-L-lisina (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA);
- PDTC (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA);
- Random primers (Invitrogen - Life Technologies; Grand Island, NY, EUA);
- Soro fetal bovino (GIBCO BRL - Life Technologies; Grand Island, NY, EUA);



- Superscript III (Invitrogen - Life Technologies; Grand Island, NY, EUA);
- SYBR Green PCR mix (Invitrogen - Life Technologies; Grand Island, NY, EUA);
- Tripsina e inibidor de tripsina (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA);
- Triton X-100 (Amresco; Ohio, EUA);
- Trizol (Life Technologies; Grand Island, NY, EUA);

Todos os demais reagentes utilizados apresentavam grau de pureza analítico.

### ***Preparo das drogas***

O peptídeo liofilizado A $\beta$ <sub>1-40</sub> foi inicialmente dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) a 1 mM, e em seguida diluído em solução salina-fosfato (PBS - NaCl 125 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM e KCl 5 mM) para fazer uma solução-estoque a 100  $\mu$ M (10% DMSO), que foi alíquotada e estocada a -20°C. As demais diluições foram feitas em PBS ou em meio de cultura no momento do uso. Os grupos controles foram tratados com solução veículo (PBS e DMSO) de modo que a concentração final de DMSO fosse a mesma em todos os grupos (máximo de 0,1%).

O peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub>, por ter maior propensão a formar agregados fibrilares, foi preparado segundo protocolo previamente descrito (Dahlgren *et al.*, 2002; Chromy *et al.*, 2003) para gerar oligômeros solúveis de A $\beta$ <sub>1-42</sub>. O peptídeo liofilizado foi primeiramente dissolvido a 5 mg/mL em 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (HFIP) para garantir o estado não-agregado e monomérico do peptídeo. Essa solução foi separada em alíquotas e os tubos permaneceram abertos até o dia seguinte para total evaporação de HFIP, sendo então estocados como filmes de peptídeo -80°C. Um dia antes do uso, a alíquota era descongelada em gelo e o filme de peptídeo dissolvido em DMSO, fazendo uma solução a 5 mM. Logo em seguida essa solução é diluída a 100  $\mu$ M pela adição de PBS, e incubada a 4°C por 24 horas. Após centrifugação para remoção de possíveis agregados (14000 x g, 10 min), a solução-estoque a 100  $\mu$ M (10% DMSO) estava pronta para uso, sendo as demais diluições feitas em PBS ou

meio de cultura. Para o preparo da solução de veículo, todas as etapas foram realizadas da mesma maneira, porém na ausência de peptídeo.

O peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub>-FAM foi diluído a 1 mg/mL em solução de hidróxido de amônio 1% em PBS e estocado em alíquotas. As demais diluições foram feitas em PBS ou em meio de cultura.

A noradrenalina foi inicialmente diluída a 10 mM em ácido clorídrico 0,01 M, seguida de diluição seriada em solução aquosa de ácido ascórbico (50 mg/L).

Os demais reagentes foram todos diluídos em água deionizada e purificada por sistema Milli-Q, ou conforme especificado em cada protocolo experimental.

### *Cultura de glândulas pineais*

As glândulas recém retiradas dos animais foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços contendo 200  $\mu$ l de meio de cultura BGJb, suplementado com glutamina (2 mM) e antibiótico (penicilina - 100 U/ml, e estreptomicina - 100  $\mu$ g/ml), e mantidas em estufa à 37°C em uma atmosfera saturada de carbogênio (95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>). Após 48h, as pineais estão completamente desnervadas e em condições de receberem os tratamentos. Ao final do período de incubação, as glândulas e os meios de cultura foram coletados e imediatamente armazenados a -80°C para posterior análise.

### *Cultura de pinealócitos*

A dispersão de células da glândula pineal foi realizada conforme método descrito por Buda & Klein (1978). Assim que retiradas dos animais, as glândulas pineais foram imediatamente dissociadas por incubação com tripsina (0,25%, 37°C, 15 min) em solução fisiológica (NaCl 120 mM, KCl 5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, glicose 12 mM, 0,1% albumina bovina). Em seguida, essa dissociação foi

interrompida pela adição de inibidor de tripsina (0,3%) e iniciou-se a dispersão mecânica. Após centrifugação (1000 g, 15 min, 25°C), o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado com soro fetal bovino (10%) e antibiótico (penicilina - 100 U/ml, e estreptomicina - 100 µg/ml). A quantidade de células viáveis obtidas foi estimada pelo método de exclusão por Trypan blue e cerca de 0,5 a 1x10<sup>5</sup> células foram plaqueadas em cada poço de placas de 8 poços específicas para ensaios de imunofluorescência (*chamber slide*, Merck Millipore; Billerica, MA, EUA), previamente tratadas com poli-L-lisina para aderência das células. Após 18h de estabilização da cultura mantida em estufa (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), iniciaram-se os tratamentos.

### ***Cultura de células HEK293***

Nos experimentos referentes aos receptores de melatonina, realizados na França (laboratório do Prof. Dr. Ralf Jockers, Institut Cochin - Université Paris Descartes, Paris, França), foram utilizadas células da linhagem HEK293, cultivadas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino (10%) e antibiótico (penicilina - 100 U/ml, e estreptomicina - 100 µg/ml), mantidas em estufa (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Para os ensaios de ligação de melatonina e de ativação da via de sinalização da ERK foram utilizadas células HEK293 transfectadas para expressar de maneira estável os receptores humanos MT<sub>1</sub> ou MT<sub>2</sub>, previamente estabelecidas pelo grupo do Prof. Jockers. Para os ensaios de BRET, as células HEK293 foram transfectadas a cada experimento para expressar de maneira transiente os receptores MT<sub>1</sub> ou MT<sub>2</sub>, conjugados às moléculas RLuc (*Renilla luciferase*) ou YFP (do inglês, *yellow fluorescent protein*).

***Cultura de células primárias endoteliais***

Células endoteliais foram obtidas a partir do cremaster, músculo que recobre os testículos, segundo adaptação do protocolo de Chen e colaboradores (1995). Ratos Wistar foram eutanasiados por decapitação e o músculo cremaster foi removido e lavado em PBS. O tecido foi seccionado em pequenos pedaços de aproximadamente 2x2 mm e cerca de 40 a 50 pedaços foram distribuídos pela garrafa de cultura (superfície com área de 75 cm<sup>2</sup>), preenchida com 20 mL de meio DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino e antibiótico (penicilina - 100 U/ml, e estreptomicina - 100 µg/ml). As garrafas foram mantidas em estufa (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) por 48 horas, período no qual ocorre a migração espontânea das células endoteliais dos explantes do músculo cremaster para a garrafa. Após este período, os tecidos foram retirados e as garrafas permaneceram em estufa até que as células endoteliais atingissem confluência (cerca de 16 dias), sendo o meio de cultura trocado três vezes por semana. Para os ensaios de ativação da via de sinalização da ERK 1/2 as células foram replaqueadas em placas de 24 poços e utilizadas após atingirem nova confluência. Para os ensaios de imunofluorescência as células foram replaqueadas (aproximadamente 10<sup>4</sup> células/poço) em placas de 8 poços específicas para este ensaio (*chamber slide with cover permanox*, Thermo Scientific; Rochester, NY, EUA).

***Dosagem de indolaminas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)***

Glândulas pineais em cultura foram incubadas com os peptídeos A $\beta$ <sub>1-40</sub> (0,03 µM) e A $\beta$ <sub>1-42</sub> (1 µM), ou com seus respectivos veículos, por tempos variados (24h a 72h). Nas 5 horas finais de cultura, as glândulas foram estimuladas com 100 nM de noradrenalina com o intuito de induzir a produção de melatonina. O conteúdo de NAS e de melatonina foi dosado no meio de cultura dessas glândulas por HPLC com detecção eletroquímica, segundo método padronizado em nosso laboratório (Ferreira

*et al.*, 2005). O sistema cromatográfico utilizado é composto de uma bomba LC-6A (Shimadzu), injetor Reodyne 7125 com loop de 20µl, coluna C18 fase reversa em temperatura ambiente e detector eletroquímico L-ECD-6A (Shimadzu) acoplado a um computador para integração dos dados. Para a dosagem de NAS a fase móvel foi composta de acetato de sódio (0,1 M), ácido cítrico (0,1 M), EDTA (0,15 mM) e metanol (7%), enquanto que a fase móvel para dosagem de melatonina continha 25% de metanol. Foram realizadas curva-padrão de NAS e de melatonina para interpolação dos cromatogramas. Soluções estoques a 1 mM de cada composto foram preparadas em solução de ácido clorídrico (0,1 M), metabissulfito de sódio (0,02%) e EDTA dissódico (0,02%), sendo posteriormente diluídas em ácido perclórico 0,1 M.

#### ***Ensaio de eletromobilidade em gel (EMSA ou Gel-Shift) e super-shift***

O conteúdo nuclear de NF-κB foi analisado em glândulas pineais tratadas com Aβ<sub>1-40</sub> e Aβ<sub>1-42</sub> ou com veículo em concentrações e tempos variados. Após os tratamentos, as pineais foram processadas para extração de proteínas nucleares, sendo homogeneizadas e incubadas em tampão de lise celular (HEPES 10 mM, KCl 10 mM, EDTA 0,1 mM pH 8,0, glicerol 10%, NP40 0,1%, DTT 1 mM e PMSF 0,1 mM; 15 min, 4°C). Após centrifugação (12000 × g; 1 min; 4 °C), o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 50 µl do mesmo tampão de lise, sendo então submetido a nova centrifugação (12000 × g; 1 min; 4 °C). Em seguida, o precipitado foi ressuscitado e incubado em 20 µl de tampão de extração nuclear (HEPES 10 mM, KCl 0,5 M, EDTA 1 mM pH 8,0; glicerol 10%, DTT 1 mM e PMSF 0,1 mM; 15 min, 4°C, sob agitação). Após centrifugação (20000 × g; 5 min; 4°C), o sobrenadante contendo o extrato proteico nuclear foi coletado e armazenado a -80°C até seu uso no ensaio de *gel-shift*. O conteúdo de proteína foi quantificado pelo espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 a 280 nm (Nanodrop, Wilmington, DE, EUA).

Cerca de 6 µg de proteína nuclear de cada amostra foram incubados em tampão de ensaio (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaCl 50 mM, DTT 0,5 mM, EDTA 0,5 mM pH 8,0, glicerol 4%, poli-dIdC 1 µg) com sonda de oligonucleotídeo dupla fita de sequência consenso a NF-κB (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'), previamente marcada com fósforo radioativo [<sup>32</sup>P]-ATP (de 25000 a 40000 c.p.m.) pela atividade da enzima T4 quinase. O complexo DNA-proteína foi analisado por eletroforese (a 150 V, 1,5h) em gel não-desnaturante de poli-acrilamida 6% (acrilamida:bisacrilamida, 37,5:1) em tampão Tris-borato/EDTA (TBE 0,25x). Após a eletroforese o gel foi seco a vácuo (Gel Dryer Vacuum System – Fisher Biotech, Wembley, Austrália), exposto ao filme XAR-5 (Kodak – Rochester, NY, EUA) por 48h a -80°C. O filme foi então revelado por imersão em solução reveladora (Kodak; 5 min) e fixadora (Kodak; 10 min) e os complexos de proteína-DNA foram quantificados densitometricamente utilizando o programa ImageJ (*Image Processing and Analysis in Java*, [www.imagej.nih.gov](http://www.imagej.nih.gov)).

Os ensaios de *super-shift* consistiram na mesma técnica descrita acima, com a inclusão de uma etapa inicial de incubação dos extratos protéicos com anticorpos específicos para cada subunidade de NF-κB (2 µg/µl, 2 µl por amostra, 30 min, temperatura ambiente).

### ***Ensaio de imunofluorescência***

Tanto para a análise da expressão proteica das enzimas AA-NAT fosforilada (P-AANAT) e iNOS quanto para análise da translocação nuclear da subunidade p50 de NF-κB e nos ensaios da interação celular do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> fluorescente (Aβ-FAM, AnaSpec), foram utilizadas culturas de pinealócitos dispersos. Após os tratamentos com Aβ<sub>1-40</sub> (0,03 µM, 15min + noradrenalina 100 nM, 30 min, para P-AANAT; Aβ<sub>1-40</sub> 0.1 µM, 1h para iNOS e Aβ<sub>1-40</sub> 0,01 a 1 µM, 5 a 30 min para p50) ou

A $\beta_{1-42}$  (1  $\mu$ M, 15 min + noradrenalina 100 nM, 30min, para P-AANAT) as células foram lavadas com PBS e fixadas em solução acetona:etanol (1:1 - 15 min, -20°C). Em seguida, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 (0,2% em PBS, 30 min, temperatura ambiente), seguido de incubação com o anticorpo anti-iNOS conjugado ao fluoróforo TRITC (diluição 1:50, 16h - 20h, 4 °C) ou com o peptídeo A $\beta_{1-40}$  conjugado à molécula fluorescente FAM (10  $\mu$ M, 24h, 4 °C). No caso da análise de P-AANAT e de p50, após a permeabilização as células foram primeiramente incubadas com solução de bloqueio (albumina bovina 1% e glicina 0,3 M em PBS, 1h, temperatura ambiente) e, em seguida, incubadas com anticorpo primário anti-P-AANAT (diluição 1:200, 16h - 20h, 4°C) ou anti-p50 (diluição 1:100, 16h - 20h, 4°C) e então com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado à molécula fluorescente FITC (diluição 1:200, 1h, temperatura ambiente). Após as incubações com os respectivos anticorpos as células foram lavadas várias vezes, incubadas com DAPI para coloração do núcleo celular (diluição 1:3000, 5 min, temperatura ambiente) e as lâminas foram montadas com solução PBS:glicerol (1:1).

Para a análise dos receptores de melatonina em células de cultura primária de endotélio foi utilizado o mesmo protocolo descrito acima, porém as células não foram permeabilizadas com Triton X-100, pois o intuito era detectar os receptores expostos na membrana plasmática. Neste caso foram utilizados os anticorpos primários anti-MT<sub>1</sub> (Mel-1A-R; diluição 1:100) ou anti-MT<sub>2</sub> (Mel-1B-R; diluição 1:100), e o anticorpo secundário anti-cabra conjugado à FITC (diluição 1:100).

A fluorescência foi analisada em microscopia confocal (LSM 500, Carl Zeiss, New York, NY, EUA) em objetiva de imersão em óleo com aumento de 40 vezes, ou com objetiva de imersão em água com aumento de 63 vezes, utilizando o laser argônio (488 nm) para excitação de FITC e de FAM (emissão a 521 nm), o laser HeNe (543 nm) para excitação de TRITC (emissão a 560-615 nm) e o laser UV (364 nm) para

excitação de DAPI (emissão a 435-485 nm). Alternativamente, algumas lâminas foram analisadas no microscópio de fluorescência (Axion, Carl Zeiss, New York, NY, EUA), utilizando os mesmo filtros e lasers descritos, com objetiva de aumento de 40 vezes. As imagens foram adquiridas em diferentes campos (3 a 4 por poço) e todos os parâmetros, incluindo abertura do *pinhole*, velocidade de escaneamento e potência do laser permaneceram os mesmos durante a análise de todo o experimento. A fluorescência foi quantificada somente nos pinealócitos (diferenciados das células gliais pela morfologia), utilizando o programa ImageJ. Os dados quantificados representam a média da fluorescência detectada em cerca de 5 a 7 células por campo, selecionadas aleatoriamente em 2 a 3 campos por poço, sendo cada tratamento realizado em duplicatas, em experimentos realizados de duas a três vezes de maneira independente.

### *Extração de RNA*

O ácido ribonucleico (RNA) total foi extraído das glândulas pineais tratadas com A $\beta$ <sub>1-40</sub> (0,03  $\mu$ M, 48h + noradrenalina 100 nM, 5h, para análise dos genes *Aanat* e *Hiomt*; e A $\beta$ <sub>1-40</sub> 0,1  $\mu$ M, 2h, para análise dos genes relacionados à via TLR/NF- $\kappa$ B), utilizando-se o reagente Trizol, conforme instruções do fabricante. Resumidamente, as glândulas foram homogeneizadas em Trizol e o RNA foi isolado pela adição de clorofórmio, seguida de centrifugação (12000 x g; 15 min; 4°C). O RNA foi precipitado com isopropanol, submetido à centrifugação (12000 x g; 10 min; 4 °C) e, após remoção do sobrenadante, foi lavado duas vezes com etanol 75% seguido de centrifugação (7500 x g; 5 min; 4 °C). O etanol foi removido e o RNA foi solubilizado em água de injeção estéril (Beker, Brasil). A determinação da quantidade de RNA foi feita no espectrofotômetro Nanodrop ND-1000, e a solução foi tratada com DNase de



acordo com as instruções do fabricante, para remoção de possível contaminação com DNA.

### *Análise da expressão gênica por RT-PCR em tempo real*

A técnica de reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR) em tempo real foi realizada para quantificação da expressão relativa de RNA mensageiro (RNAm) das enzimas AA-NAT e HIOMT, bem como da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), cuja expressão foi utilizada para normalização dos dados. Após a extração, 0,5 a 1 µg de RNA total de cada amostra foi utilizado para a síntese de cDNA (ácido desoxirribonucleico - DNA, complementar) em reação catalisada pela enzima transcriptase reversa Superscript III (200U, Invitrogen), em tampão específico contendo primers randômicos (50 ng) e dNTPs (10 mM). A reação foi realizada em termociclador (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), nas condições indicadas pelo fabricante da enzima. Posteriormente, o PCR em tempo real foi realizado incubando-se 1 µL de cDNA com primers específicos para cada gene de interesse (tabela 1), nas concentrações de 400 nM para os primers senso e anti-senso de *Aanat* e *Hiomt*, e de 200 nM para *Gapdh*, em solução do reagente SYBR Green, utilizando-se o termociclador iCycler (BioRad). Os resultados foram calculados pelo método  $\Delta\Delta Ct$  (*delta-delta cycle threshold*), no qual Ct refere-se ao número de ciclos necessários para a detecção do amplicon; o primeiro delta é a diferença entre o Ct do gene de interesse e o Ct do gene normalizador (no caso, o *Gapdh*), e o segundo delta refere-se à diferença entre os delta-Ct da amostra experimental e da média das amostras controle. Assim, através da fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , os valores obtidos indicam a magnitude da alteração na expressão gênica do grupo tratado com relação ao grupo controle (*fold-change*). Ao final de todas as reações foi

realizada a curva de dissociação (*melting curve*) para verificar a especificidade da reação.

**Tabela 1** – Sequência dos primers utilizados para análise da expressão gênica

Gene	Sentido do primer	Sequência
<i>Aanat</i>	Senso	5' - AGCGCGAAGCCTTTATCTCA - 3'
	Antisenso	5' - AAGTGCCGGATCTCATCCAA - 3'
<i>Hiomt</i>	Senso	5' - AGCGCCTGCTGTTTCATGAG - 3'
	Antisenso	5' - GGAAGCGTGAGAGGTCAAAGG - 3'
<i>Gapdh</i>	Senso	5' - TTCTTGTGCAGTGCCAGCC - 3'
	Antisenso	5' - GTAACCAGGCGTCCGATACG - 3'

#### *Análise da expressão gênica por matrizes de PCR*

As alterações na expressão de genes relacionados à via TLR em glândulas pineais tratadas com o peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> (0,1  $\mu$ M, 2h) com relação à glândulas controle foram avaliadas através de kit comercial de matrizes de PCR (*Rat Toll-Like receptor signaling pathway PCR array*, cat. PARN-018; SABioscience, Qiagen; Hilden, Alemanha). O kit consiste de uma placa de 96 poços, sendo que cada poço contém primers específicos para um determinado gene, o que permite a análise simultânea de diversos genes em uma mesma amostra em um único PCR. Foi utilizada uma matriz composta de 84 genes relacionados à via de sinalização dos receptores TLR, 5 genes de referência para normalização dos dados (*genes housekeeping*), 1 controle negativo para verificação de contaminação com DNA genômico, 3 controles positivos da reação de PCR e 3 controles negativos da enzima transcriptase reversa. Glândulas pineais dos grupos tratado e controle foram processadas para extração de RNA total e síntese de cDNA, seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente. Em seguida, 200 ng de cDNA de cada amostra foi aplicado em cada poço da placa (uma placa por amostra), adicionou-se o reagente específico do kit e a reação de PCR em tempo real foi realizada no termociclador iCycler (BioRad), nas condições indicadas pelo fabricante do kit. Os 84 genes relacionados à via inflamatória mediada

por TLRs estão designados a seguir, agrupado de acordo com suas funções (o nome de algumas proteínas está designado entre parênteses, nos casos em que o nome da proteína difere do gene):

- 10 genes dos receptores TLRs: *Cd14*, *Cd180*, *Tlr1*, *Tlr2*, *Tlr3*, *Tlr4*, *Tlr5*, *Tlr6*, *Tlr7*, *Tlr9*;
- 21 genes da via de sinalização de TLRs: *Btk*, *Hmgb1*, *Hras*, *Hspa1a* (HSP70), *Hspd1* (HSP60), *Ly96* (MD-2), *Mal*, *Map4k4*, *Mapk8ip3*, *Myd88*, *Peli1*, *Pglyrp1* (PGRP-S), *Ripk2*, *Rnf138* (TRIF), *Sarm1*, *Tbk1*, *Ticam2* (TRAM), *Tnip2*, *Tollip*, *Tradd*, *Traf6*;
- 14 genes de moléculas efetoras: *Casp8* (FLICE), *Cd80*, *Cd86*, *Cebpb*, *Clec4e*, *Eif2ak2*, *Fadd*, *Irak1*, *Irak2*, *Nr2c2*, *Ppara*, *Ptgs2* (COX-2), *Ube2n*, *Ube2v1*;
- 10 genes ligados à via NF- $\kappa$ B: *Chuk* (IKK- $\alpha$ ), *Ikkb* (IKK- $\beta$ ), *Nfkb1* (p50/p105), *Nfkb2* (p52/p100), *Nfkbia* (IKB $\alpha$ ), *Nfkbib* (IKB $\beta$ ), *Nfkbil1*, *Nfrkb*, *Rel*, *Rela*;
- 14 genes relacionados à citocinas: *Ccl2* (MCP-1), *Csf2* (GM-CSF), *Csf3* (G-CSF), *Il1a*, *Il1b*, *Il1r1*, *Il2*, *Il6*, *Il6ra*, *Il10*, *Il12a*, *Lta*, *Tnf*, *Tnfrsf1a*;
- 9 genes ligados à via de sinalização das MAP quinases: *Fos*, *Jun*, *Kcnh8* (ELK1), *Map2k3* (MEK3), *Map2k4* (JNKK1), *Map3k1* (MEKK), *Map3k7* (TAK1), *Mapk8* (JNK1), *Mapk9* (JNK2);
- 6 genes ligados à via de sinalização IRF: *Cxcl10*, *Ifna1*, *Ifnb*, *Ifng*, *Irf1*, *Irf3*;

Dentre os cinco genes de referência disponíveis (proteínas ribossomais *Rplp1* e *Rpl13a*; enzima fosforibosiltransferase - *Hprt1*; enzima lactato desidrogenase - *Ldha*; e beta-actina - *Actb*) foi escolhido o gene *Hprt1* para a normalização dos dados pelo método  $\Delta\Delta C_t$  pelo fato deste ter sido o que apresentou menor variação em sua expressão entre todas as amostras (média  $\pm$  desvio padrão do  $C_t$  de todas as amostras independentemente do tratamento =  $24,2 \pm 0,04$ ). Em seguida, cada gene teve sua expressão normalizada com relação ao grupo controle, de modo que o

resultado representa a magnitude da alteração na expressão gênica do grupo tratado com relação ao grupo controle (*fold-change*).

### *Dosagem de TNF*

As concentrações da citocina TNF presentes no meio de cultura de glândulas pineais tratadas com A $\beta$ <sub>1-40</sub> (0,1  $\mu$ M; 2h - 6h) foram determinadas pela técnica de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizando-se kits comerciais (cat. 88-7340, eBioscience, San Diego, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Limite de detecção do kit: 16 pg/mL.

### *Ensaio de ligação da melatonina aos seus receptores*

Para analisar se os peptídeos A $\beta$  alteram as características farmacológicas dos receptores de melatonina foram realizados ensaios de ligação em células HEK293 transfectadas para expressar de maneira estável os receptores MT<sub>1</sub> ou MT<sub>2</sub> humanos, e previamente incubadas com A $\beta$ <sub>1-40</sub> (1  $\mu$ M, 24h) ou A $\beta$ <sub>1-42</sub> (1  $\mu$ M, 24h) ou ainda com seus veículos (grupo controle). Também foram realizadas curvas concentração-resposta de A $\beta$ <sub>1-42</sub> (0,03  $\mu$ M a 5  $\mu$ M, 24h) em células HEK293 expressando MT<sub>1</sub>. Após os respectivos tratamentos das células em confluência em placas de 24 poços, as células foram lavadas, coletadas em PBS e imediatamente utilizadas no ensaio. Nos ensaios de competição, as células foram incubadas (2h, 37°C) com concentrações crescentes de melatonina (10<sup>-12</sup> a 10<sup>-6</sup> M), na presença de melatonina marcada radioativamente com <sup>125</sup>I (2-[<sup>125</sup>I] iodomelatonina, 400 pM). Em seguida, o conteúdo de cada tubo foi rapidamente filtrado por filtros de fibra de vidro GF/F (Whatman, Clifton, NJ, EUA) e os filtros foram analisados quanto ao conteúdo de radioatividade retido em contador gama LB2111 (Berthold Technologies; Bad Wildbad, Alemanha). Os valores de IC<sub>50</sub> obtidos foram transformados em K<sub>i</sub> pela equação de Cheng-

Prussof:  $K_i = IC_{50} / [1 + (L/K_d)]$ . Em todos os ensaios a ligação específica foi definida pela ligação deslocada por 10  $\mu$ M de melatonina e os resultados foram normalizados pela quantidade de proteína presente no *pool* de células para compensar eventuais diferenças no número de células entre os grupos.

### ***Ensaio de ativação da via de sinalização da ERK 1/2***

Células HEK293 transfectadas para expressar de maneira estável os receptores MT<sub>1</sub> ou MT<sub>2</sub> humanos, ou células primárias endoteliais de ratos expressando MTRs endogenamente, foram cultivadas em placas de 24 poços e incubadas com A $\beta$ <sub>1-40</sub> (1  $\mu$ M, 18h) ou A $\beta$ <sub>1-42</sub> (1  $\mu$ M, 18h) ou ainda com seus respectivos veículos (grupo controle). As células, mantidas em meio DMEM sem soro fetal bovino durante a incubação, foram então estimuladas com 2-iodomelatonina (100 nM, 2 a 20 min) ou com isoproterenol (100 nM, 2 a 20 min). Optamos pelo uso de 2-iodomelatonina neste ensaio pelo fato desta molécula não atravessar a membrana plasmática, ao contrário da melatonina, de modo a ativar exclusivamente os receptores expostos na membrana. Ao final deste período, as células foram rapidamente lavadas com PBS (acrescido de ortovanadato de sódio 0,1 mM) e imediatamente lisadas com tampão de amostra Laemmli 2x (Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 125 mM, glicerol 20%, SDS 10%, DTT 100 mM, azul de bromofenol 0,004%). Os lisados foram coletados e imediatamente processados para análise do conteúdo de ERK 1/2 fosforilada (P-ERK) e ERK1/2 total por Western blot.

### ***Análise proteica por Western blot***

A análise das proteínas ERK 1/2 total e P-ERK1/2 foi realizada através de técnica de western blot por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), previamente descrito por Laemmli (1970). Os lisados celulares obtidos tanto de células HEK293 quanto de células endoteliais, conforme descrito na

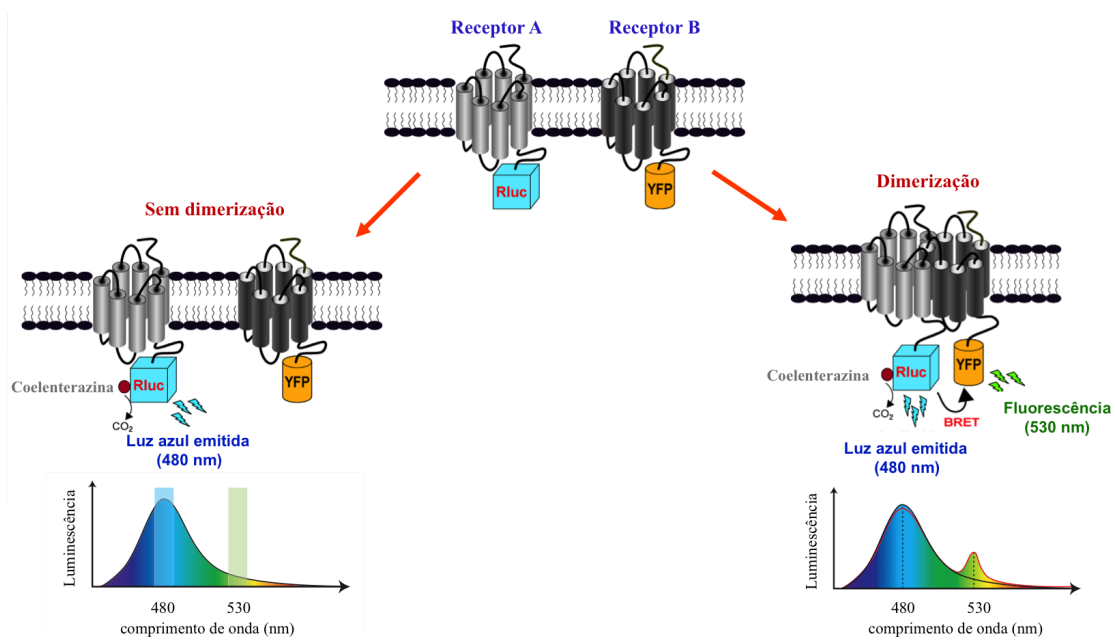
seção anterior, foram analisados em gel de poliacrilamida, sendo o gel de resolução feito a 12% de acrilamida e bisacrilamida (37,5:1) e o gel de concentração (ou empilhamento) a 4,5%. O gel foi montado em aparato de eletroforese vertical (Bio-Rad; Richmond, CA, EUA). Antes de aplicadas ao gel, as amostras foram sonicadas e fervidas (95°C, 5 min). As proteínas migraram sob voltagem de 80 mV durante a passagem pelo gel de concentração, e de 100 mV no gel de resolução, em tampão de corrida (Tris-Glicina 1x, SDS 0,1%) Ao final da corrida, o gel foi retirado e exposto à membrana de nitrocelulose no aparato de transferência semi-seca (10 V, 30 min; Bio-Rad). Tanto o gel quanto a membrana e os papéis de filtro foram previamente equilibrados em tampão de transferência (Tris-Glicina 1x, metanol 20%). A eficiência da transferência foi verificada logo em seguida por coloração das proteínas na membrana com solução Ponceau (5 min, sob agitação). Após uma sequência de lavagens da membrana em soluções Tris-NaCl (TBS 1x) e TBST 1x (TBS 1x acrescido de Tween 20 0,1%), foi feita incubação em solução de bloqueio (leite desnatado 5% em TBST 1x; 1h temperatura ambiente, sob agitação). As membranas foram então incubadas com os anticorpos primários anti-P-ERK e anti-ERK (diluições 1:1000 e 1:3000, respectivamente; 18h, 4°C). Após sequência de lavagens (TBST 1x) as membranas foram incubadas com anticorpos secundários anti-coelho e anti-camundongo, conjugados às moléculas fluorescentes (diluição 1:15000, 45min, temperatura ambiente; LI-COR Bioscience; Nebraska, EUA). Por fim, as membranas foram submetidas a nova série de lavagens e a leitura da fluorescência foi realizada no aparelho Odyssey (LI-COR). As imagens obtidas foram quantificadas utilizando-se o programa ImageJ.

*Ensaio de BRET*

A técnica de transferência de energia bioluminescente por ressonância (BRET, do inglês *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) foi utilizada para verificar os efeitos dos peptídeos A $\beta$  sobre a conformação e interação dos receptores de melatonina na formação de homo- ou heterodímeros entre si. Esta técnica é altamente sensível para a detecção de interações proteína-proteína em células vivas e baseia-se no uso de moléculas doadoras e aceptoras de energia, cada qual conjugada a um dos componentes do dímero que se pretende investigar. Assim, um dos receptores é conjugado à enzima luciferase RLuc (doadora de energia) e o outro receptor é conjugado à molécula fluorescente YFP (aceptora de energia) e ambos são transfectados nas células. A adição do substrato da enzima luciferase (coelenterazina) gera bioluminescência, cujo comprimento de onda pode excitar a molécula YFP por transferência de energia por ressonância, resultando em emissão de fluorescência, desde que RLuc e YFP estejam próximas o suficiente (a uma distância de até 10 nm). O princípio desta técnica está esquematizado na figura 5 a seguir.

No presente estudo, células HEK293 em confluência em placas de 6 poços foram transfectadas para expressar de maneira transiente proteínas recombinantes dos receptores MT<sub>1</sub> ou MT<sub>2</sub>, conjugados às moléculas RLuc ou YFP, nas seguintes configurações: MT<sub>1</sub>-RLuc sozinho; MT<sub>2</sub>-RLuc sozinho; MT<sub>1</sub>-RLuc/MT<sub>1</sub>-YFP; MT<sub>2</sub>-RLuc/MT<sub>2</sub>-YFP; ou MT<sub>1</sub>-RLuc/MT<sub>2</sub>-YFP. Os plasmídeos pcDNA3 contendo a sequência codificante para essas proteínas foram previamente estabelecidos pelo grupo (Ayoub *et al.*, 2002) e as transfecções foram realizadas com o reagente JetPEI, de acordo com as instruções do fabricante. No dia seguinte à transfecção, as células foram transferidas para placas de 96 poços branca previamente tratadas com poli-L-lisina para aderência celular (Optiplat; Perkin Elmer; Boston, MA, EUA), e

incubadas com A $\beta$ <sub>1-40</sub> (1  $\mu$ M, 24h) ou A $\beta$ <sub>1-42</sub> (1  $\mu$ M, 24h). Após a incubação, o meio de cultura foi retirado e os poços lavados e preenchidos com PBS. A coelenterazina foi adicionada (concentração final de 5  $\mu$ M) e a placa foi incubada por 15 min. à temperatura ambiente, protegida da luz. Em seguida, as leituras foram realizadas em um lumino/fluorímetro (Mithras, Berthold Technologies; Bad Wildbad, Alemanha) que faz a análise integrada da luminescência detectada com os filtros para RLuc (475 - 495 nm) e para YFP (517 - 543 nm).



**Figura 5 - Esquema demonstrativo do princípio da técnica de BRET.** A formação de dímeros entre os receptores A e B é avaliada através de células expressando proteínas recombinantes do receptor A acoplado à enzima *Renilla* luciferase (RLuc) e do receptor B acoplado à proteína fluorescente YFP (*yellow fluorescent protein*). Após adição do substrato da enzima RLuc, a coelenterazina, há emissão de luminescência no comprimento de onda de 480 nm. Caso não haja interação entre os dois receptores, YFP não será excitada e, portanto, o único sinal registrado será o de RLuc (lado esquerdo - sem dimerização). Caso haja interação entre os dois receptores, a proximidade entre as proteínas RLuc e YFP é menor do que 10 nm e, portanto, a emissão gerada por RLuc excita a molécula YFP, cujo sinal é emitido em outro comprimento de onda (530 nm). Dessa forma, a detecção de sinal emitido por YFP indica a formação de dímeros (lado direito - dimerização); (modificado de Bacart *et al.*, 2008 e de Jockers *et al.*, 2008).



A propensão à formação de dímeros entre esses diferentes pares foi analisada através de curvas de saturação, em que as células foram transfectadas com quantidade fixa de RLuc e quantidades crescentes de YFP (Mercier *et al.*, 2002; Couturier & Jockers, 2003). Os valores obtidos pela razão entre o sinal YFP emitido e o sinal RLuc x 1000 correspondem ao sinal BRET e os dados foram expressos como porcentagem de BRET<sub>max</sub> (sinal máximo de BRET obtido para determinado par de receptores), enquanto que o eixo X é dado pela razão YFP total / RLuc. Através das curvas de saturação pode-se aferir o valor de BRET<sub>50</sub>, referente à concentração de molécula aceptora capaz de gerar 50% do sinal BRET<sub>max</sub>, o que reflete a afinidade relativa entre os pares, indicando portanto a propensão relativa à formação dos dímeros (Mercier *et al.*, 2002).

### *Análises estatísticas dos resultados*

Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média (e.p.m.) e as análises estatísticas foram feitas por teste t de *Student*, quando comparados dois grupos independentes; ou por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Newman-Keuls, quando todos os grupos foram comparados entre si, ou do teste de Dunnett, quando todos os grupos foram comparados ao grupo controle; ou ainda por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de Tukey. Os grupos foram considerados significativamente diferentes quando a probabilidade de erro foi menor que 5% ( $p < 0,05$ ). O programa computacional utilizado para essas análises foi o GraphPad Prism® versão 5.00 (GraphPad Software, La Jolla California EUA; [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## RESULTADOS

*"O esforço pelo conhecimento é um daqueles objetivos independentes, sem os quais uma afirmação consciente da vida me parece impossível ao homem de pensamento."*

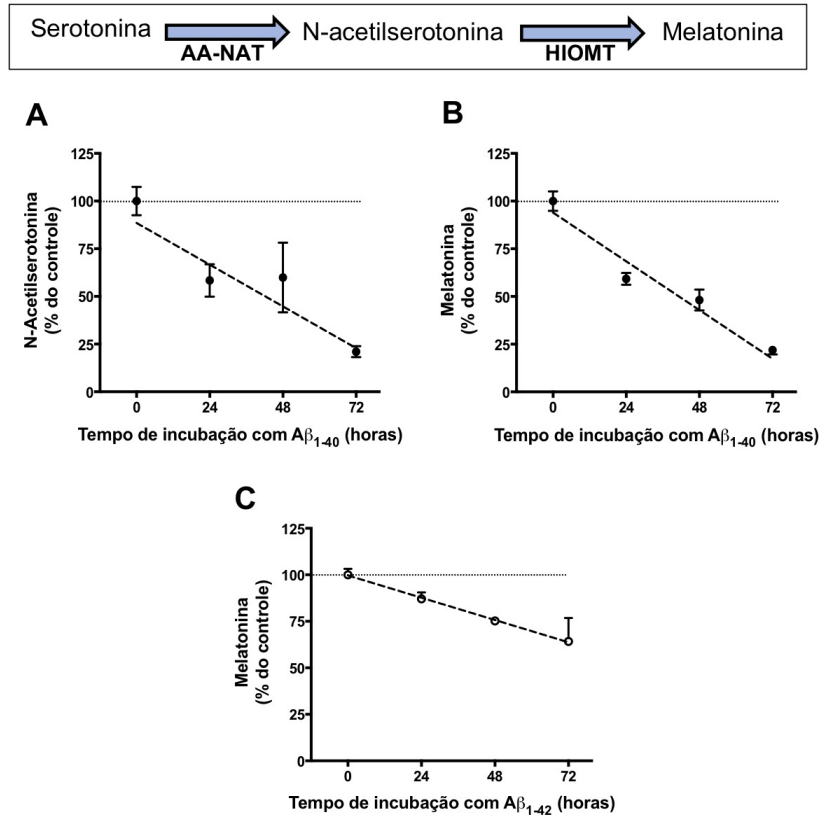
Albert Einstein

## RESULTADOS

### 1. Efeito do peptídeo A $\beta$ sobre a produção de melatonina pela glândula pineal

Para avaliar se o peptídeo A $\beta$  é capaz de atuar diretamente sobre a glândula pineal e modular a síntese de melatonina, foram realizados experimentos *in vitro* nos quais as pineais foram mantidas em cultura na presença ou ausência dos peptídeos A $\beta_{1-40}$  e A $\beta_{1-42}$ . O peptídeo A $\beta_{1-40}$  (0,03  $\mu$ M) inibe com o mesmo perfil (não há diferença na inclinação das retas obtidas por regressão linear, de acordo com teste de ANOVA de retas paralelas) tanto a síntese de melatonina quanto de sua molécula precursora, a N-acetilserotonina, induzida por noradrenalina (100 nM, 5h) (fig. 6A-B). O peptídeo A $\beta_{1-42}$  (1  $\mu$ M) também inibe a síntese de melatonina de maneira tempo-dependente (fig. 6C), mas a magnitude de inibição nas condições testadas foi menor do que a observada com A $\beta_{1-40}$  sugerindo, portanto, um efeito mais lento do que A $\beta_{1-42}$ . Com base neste primeiro resultado, priorizamos o uso de peptídeo A $\beta_{1-40}$  nos experimentos subsequentes a respeito do efeito de A $\beta$  sobre a glândula pineal.

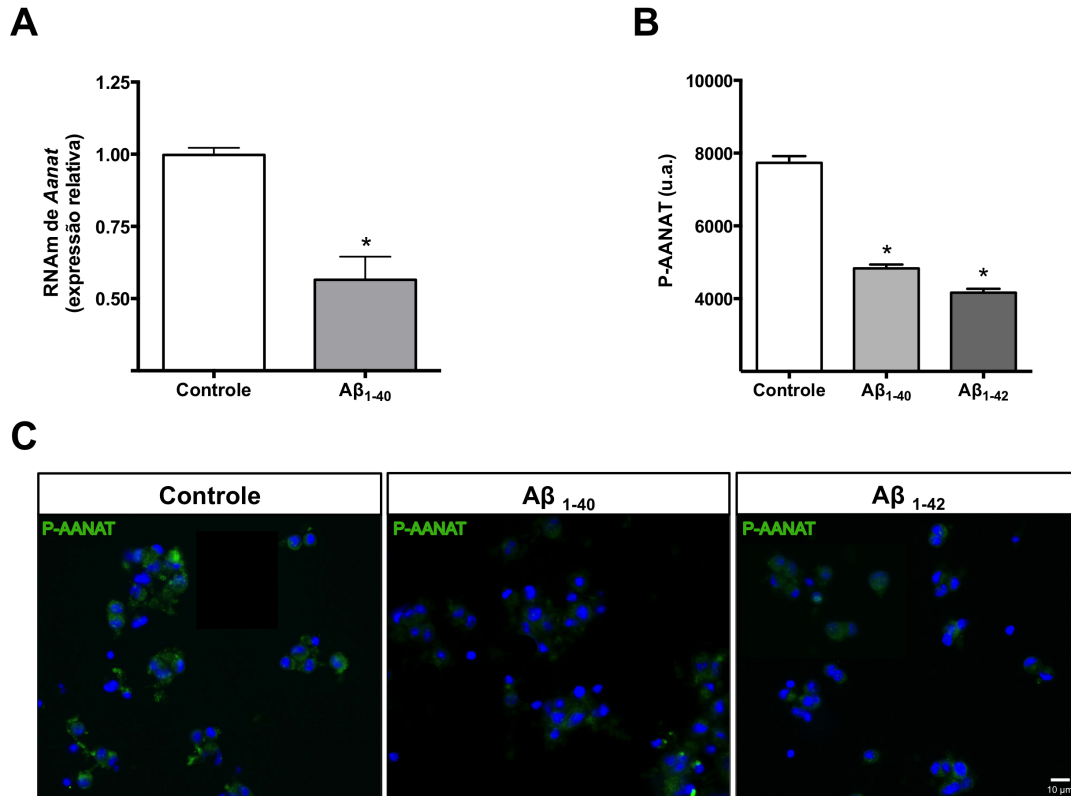
Pelo fato de A $\beta$  apresentar o mesmo padrão de inibição sobre a produção de NAS e de melatonina, deduz-se que o ponto de inibição na cascata biossintética da produção hormonal localiza-se previamente à formação de NAS. A conversão de serotonina em NAS pela enzima AA-NAT é uma etapa chave na regulação da produção de melatonina e foi previamente demonstrado que a inibição da síntese de melatonina pelo TNF ocorre via inibição da expressão de AA-NAT (Fernandes *et al.*, 2006). Desta forma, na etapa seguinte avaliamos a capacidade de A $\beta$  em inibir a expressão do gene *Aanat*.



**Figura 6 – Peptídeos  $\beta$ -amilóide (A $\beta_{1-40}$  e A $\beta_{1-42}$ ) inibem a cascata biossintética hormonal de glândulas pineais em cultura.** Glândulas pineais cultivadas por 72 horas foram tratadas com veículo (linha horizontal designada como 100%) ou com os peptídeos A $\beta_{1-40}$  ou A $\beta_{1-42}$  e estimuladas com noradrenalina (100 nM) nas 5 horas finais de cultura. A $\beta_{1-40}$  (0,03  $\mu$ M) inibe a produção de N-acetilserotonina (**A**) e de melatonina (**B**) de maneira tempo-dependente. **C**) A produção de melatonina é inibida de maneira tempo-dependente por A $\beta_{1-42}$  (1  $\mu$ M). Dados foram normalizados pela média do grupo controle e estão apresentados como média  $\pm$  e.p.m.; n = 4 -10 glândulas por grupo experimental.

A expressão do gene que codifica AA-NAT foi reduzida em cerca de 40% em pineais incubadas com A $\beta_{1-40}$  (0,03  $\mu$ M, 48h; noradrenalina 100 nM, 5h) quando comparadas à expressão em glândulas incubadas com veículo (fig. 7A); enquanto que a expressão do gene que codifica a enzima HIOMT não foi afetada (expressão relativa ao controle: 1,16  $\pm$  0,1; n= 4). Os níveis proteicos de AA-NAT ativada, ou seja, fosforilada (P-AANAT) por estímulo noradrenérgico (100 nM, 30 min), foram analisados em pinealócitos dispersos incubados com A $\beta_{1-40}$  (0,03  $\mu$ M, 15 min) ou

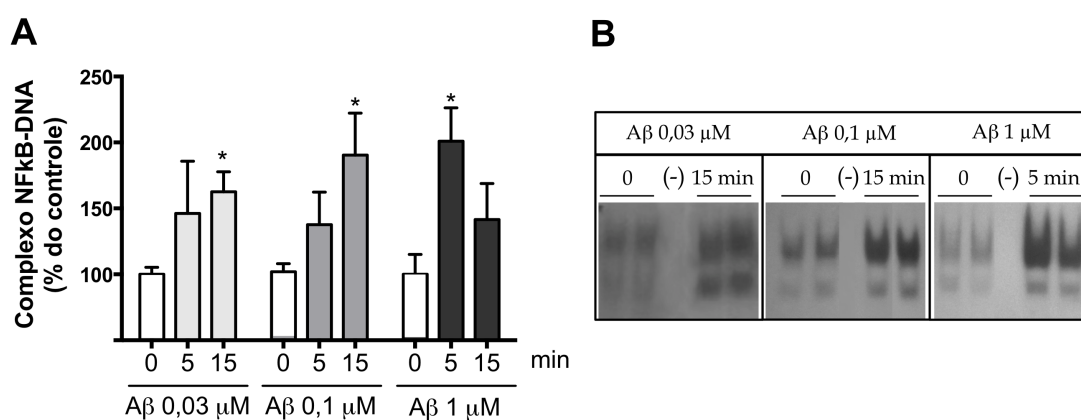
A $\beta_{1-42}$  (1  $\mu$ M, 15 min), previamente à adição de noradrenalina. A expressão de P-AANAT, detectada por imunofluorescência, foi reduzida tanto por A $\beta_{1-40}$  quanto por A $\beta_{1-42}$  (fig. 7B-C).



**Figura 7 - Peptídeo A $\beta$  inibe a expressão gênica e ativação de AA-NAT.** A) Expressão relativa de RNAm de *Aanat*, induzida por noradrenalina (100 nM, 5h) em glândulas pineais tratadas com A $\beta_{1-40}$  (0,03  $\mu$ M, 48h) ou veículo (controle). Expressão relativa à expressão no grupo controle e normalizada pela expressão de *Gapdh*; \* p < 0,05, por teste t de Student; n = 4. B) Expressão proteica de AA-NAT fosforilada (P-AANAT), induzida por noradrenalina (100 nM, 30 min), em pinealócitos dispersos incubados com veículo (controle) ou com os peptídeos A $\beta_{1-40}$  (0,03  $\mu$ M, 15 min) ou A $\beta_{1-42}$  (1  $\mu$ M, 15 min); \* p < 0.05 com relação ao grupo controle, teste t de Student. C) Imagem representativa da detecção de P-AANAT (em verde) por microscopia de fluorescência nos diferentes grupos (controle, A $\beta_{1-40}$ , A $\beta_{1-42}$ ); o núcleo das células foi corado com DAPI (azul); barra de escala: 10  $\mu$ m.

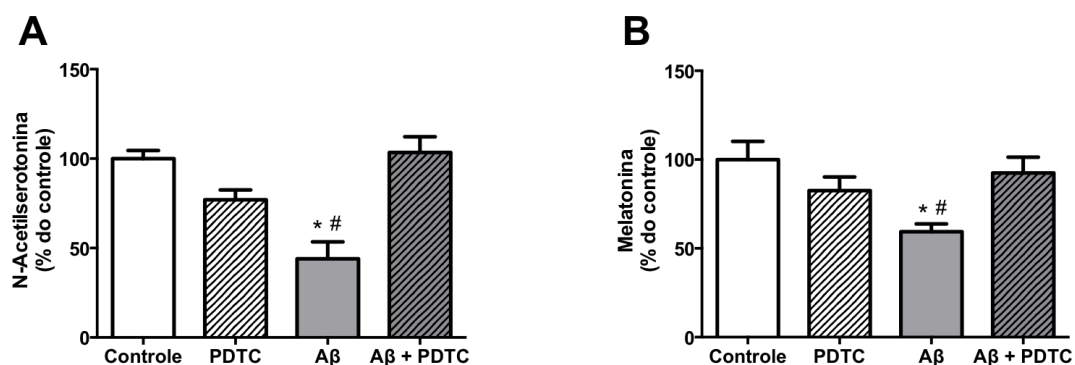
## 2. Ativação da via NF-κB pelo peptídeo Aβ em glândulas pineais

Conforme mencionado na introdução, o fator de transcrição NF-κB é um importante modulador da síntese de melatonina pela glândula pineal (da Silveira Cruz-Machado *et al.*, 2010; Carvalho-Sousa *et al.*, 2011). Dessa forma, avaliamos a capacidade de Aβ em ativar a via do fator de transcrição NF-κB em glândulas pineais de ratos em cultura. Através dos ensaios de *gel-shift* detectamos que Aβ<sub>1-40</sub> ativa rapidamente a via do NF-κB, induzindo a translocação nuclear de suas subunidades (fig. 8). Concentrações crescentes do peptídeo (0,03, 0,1 e 1 μM) apresentam o mesmo efeito máximo quanto ao conteúdo nuclear de NF-κB, mas diferem quanto à velocidade de ativação da via. Enquanto o pico de ativação ocorre aos 15 minutos de incubação com Aβ<sub>1-40</sub> nas concentrações mais baixas, a maior concentração utilizada (1 μM) já induz translocação nuclear de NF-κB após 5 minutos de incubação (fig. 8).



**Figura 8 - Peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> induz a translocação nuclear de NF-κB em pineais em cultura. A)** Quantificação de NF-κB nuclear em glândulas pineais cultivadas por 48 horas e incubadas com veículo (0 min, barras brancas) ou com o peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> (0,03, 0,1 ou 1 μM; 5 ou 15 min; barras cinzas). Dados foram normalizados pela média do grupo controle; n = 4-9 glândulas por grupo experimental; \* p < 0,05 vs respectivos grupos controle, ANOVA. **B)** Imagem representativa da análise de NF-κB nuclear por *gel-shift*, demonstrando a translocação nuclear máxima de NF-κB em cada grupo experimental; (-) = controle negativo, sem extrato proteico.

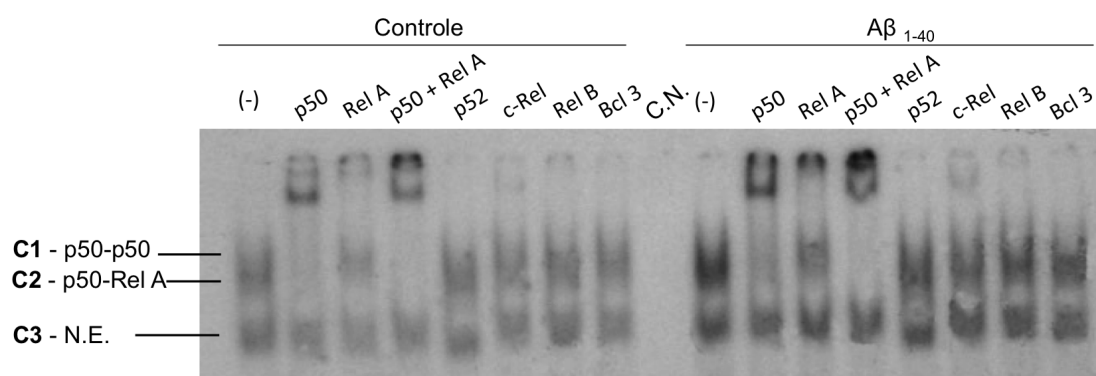
Para confirmar o envolvimento do fator de transcrição NF- $\kappa$ B no efeito inibitório de A $\beta$  sobre a produção de melatonina, foi utilizado um bloqueador da interação de NF- $\kappa$ B com os sítios  $\kappa$ B presentes em seus genes-alvo - o PDTC (pirrolidinaditiocarbamato). Nestes experimentos as glândulas foram incubadas com PDTC (25  $\mu$ M) por 48 horas e com o peptídeo A $\beta$  (0,03  $\mu$ M), adicionado nas últimas 24 horas. As glândulas de todos os grupos foram estimuladas com noradrenalina (100 nM) nas 5 horas finais da cultura para indução da síntese de melatonina. Podemos observar na figura 9 que a presença de PDTC bloqueia o efeito inibitório de A $\beta_{1-40}$  sobre a síntese de NAS e melatonina (fig. 9A-B).



**Figura 9 - Inibição da produção hormonal da pineal pelo peptídeo A $\beta_{1-40}$  é dependente da via do fator de transcrição NF- $\kappa$ B.** Glândulas pineais cultivadas por 48 horas foram tratadas com veículo (controle; barras brancas) ou com A $\beta_{1-40}$  (0,1  $\mu$ M, 24h; barras cinzas), na presença (barras hachuradas) ou ausência do inibidor da via NF- $\kappa$ B (PDTC, 25  $\mu$ M, 48h). PDTC impede o efeito inibitório de A $\beta$  tanto sobre a produção de N-acetilserotonina (A) quanto de melatonina (B), induzidas por noradrenalina (100 nM, 5h). Dados foram normalizados pela média do grupo controle; n = 4-8 glândulas por grupo; \* p < 0,05 vs grupo controle e # p < 0,05 vs grupo A $\beta$ +PDTC.

A caracterização das subunidades envolvidas na ativação de NF- $\kappa$ B induzida por A $\beta$  foi realizada através da técnica de *super-shift*, na qual anticorpos específicos de cada subunidade são incubados com os extratos proteicos nucleares. Os anticorpos para p50, RelA e, em menor extensão, c-Rel, são eficazes em retardar a

migração dos complexos de NF- $\kappa$ B-DNA, diminuindo a intensidade das bandas observadas na ausência de anticorpos (fig. 10). Este perfil de resposta indica que os complexos contêm as proteínas aos quais os anticorpos se ligaram. Esse resultado foi observado em ambos os grupos, controle e tratado com A $\beta$ <sub>1-40</sub>, sendo que, no grupo tratado, os níveis de NF- $\kappa$ B nuclear estão nitidamente aumentados, confirmando os resultados anteriores. Devido à posição das bandas que sofreram deslocamento em relação às amostras sem anticorpo [fig. 10, (-)] é possível concluir que a primeira banda observada no gel compreende na verdade dois complexos muito próximos entre si (C1 e C2), correspondentes aos dímeros p50/p50 e p50/RelA, respectivamente. Isso torna-se evidente ao utilizarmos simultaneamente os anticorpos contra p50 e RelA, o que acarreta em remoção total dos complexos C1 e C2 (fig. 10, p50 + RelA). O terceiro complexo observado (C3) foi considerado não-específico (N.E.) devido ao fato de não ser alterado na presença de nenhum anticorpo.

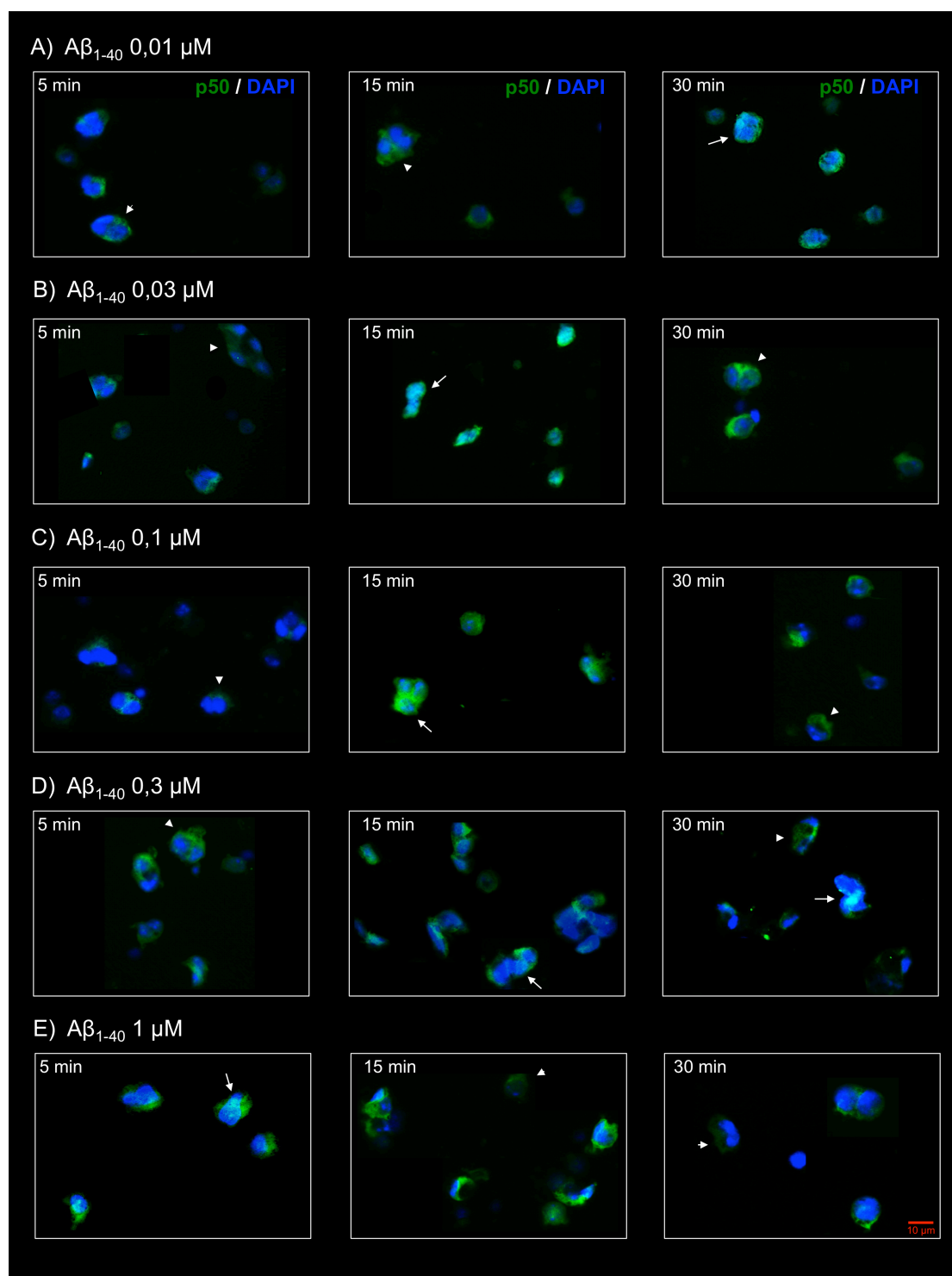


**Figura 10 - Peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> induz a translocação nuclear dos dímeros de NF- $\kappa$ B p50/p50 e p50/RelA em pineais em cultura.** Gel representativo do ensaio de *super-shift*, no qual os extratos nucleares de pineais incubadas com veículo (Controle) ou A $\beta$ <sub>1-40</sub> (1  $\mu$ M, 5 min) foram analisados na presença de anticorpos contra as subunidades de NF- $\kappa$ B p50, RelA, p52, c-Rel, Rel B e Bcl 3. O complexo C1 é constituído, predominantemente, por dímeros p50/p50; C2 por dímeros p50/RelA, e C3 não foi alterado por nenhum anticorpo, sendo considerado uma ligação não específica à sonda de NF- $\kappa$ B (N.E.). Em glândulas tratadas com A $\beta$  há uma maior translocação nuclear de NF- $\kappa$ B, sem alteração nas subunidades que compõem os complexos. (-) = ausência de anticorpo; C.N. = controle negativo (ausência de extrato proteico).



Conforme descrito na introdução, as subunidades p50 e RelA diferem entre si quanto à presença do domínio TAD, sendo que homodímeros de p50 atuam como repressores da expressão gênica (Hayden & Ghosh, 2008). A observação de que A $\beta$ <sub>1-40</sub> exerce efeito inibitório sobre a expressão de AA-NAT e a produção de melatonina sugere que este peptídeo induz a translocação nuclear da subunidade p50 nas células neuroendócrinas da pineal. Como as análises anteriores por *gel-shift* foram realizadas em glândulas inteiras, que são compostas não só por pinealócitos mas também por células da glia, utilizamos a cultura de pinealócitos dispersos para confirmar essa expectativa.

Através da técnica de imunofluorescência constatamos que, de fato, A $\beta$ <sub>1-40</sub> induz a translocação nuclear da subunidade p50 nas células neuroendócrinas da pineal, os pinealócitos (fig. 11). O resultado obtido incubando-se a cultura de pinealócitos dispersos com concentrações crescentes de A $\beta$ <sub>1-40</sub> e por tempos de incubação diferentes foi semelhante ao observado previamente no *gel-shift* (fig. 8). A localização nuclear de p50 induzida por A $\beta$ <sub>1-40</sub> a 0,01  $\mu$ M só foi observada após 30 minutos da adição de A $\beta$  (fig. 11A), enquanto que nas concentrações intermediárias de 0,03, 0,1 e 0,3  $\mu$ M o pico de translocação ocorreu aos 15 minutos (fig. 11B-D). Já a concentração de 1  $\mu$ M foi a única que resultou na presença de p50 no núcleo aos 5 minutos de incubação (fig. 11E). Concluímos, portanto, que de fato o peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> atua nos pinealócitos e induz a translocação nuclear da subunidade repressora de transcrição gênica - p50.



**Figura 11 – Peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> induz translocação nuclear de p50 em pinealócitos.** Microscopia de fluorescência mostrando o perfil de translocação nuclear da subunidade de NF-κB p50 (em verde) em pinealócitos incubados com Aβ<sub>1-40</sub> de 0,01 a 1 μM (A-E), por 5 a 30 minutos (da esquerda para a direita). Cabeças de setas indicam a presença de p50 no compartimento citoplasmático e as setas indicam a localização nuclear de p50. O núcleo dos pinealócitos foi marcado com DAPI (em azul); barra de escala: 10 μm.

### 3. Peptídeo A $\beta$ induz resposta inflamatória mediada pela via TLR/NF- $\kappa$ B em glândulas pineais

Tendo em vista que A $\beta$  ativa a via NF- $\kappa$ B na pineal e que uma grande variedade de genes são regulados por este fator de transcrição, buscamos avaliar quais os efeitos de A $\beta$  sobre a expressão gênica na glândula pineal. Com o intuito de fazer uma análise mais ampla, investigamos as alterações na expressão gênica induzidas por A $\beta_{1-40}$  utilizando matrizes de PCR em tempo real (*PCR array*), o que permite a detecção simultânea da expressão de diversos genes em uma mesma amostra. Foi utilizada uma matriz que permite a análise de 84 genes relacionados à via dos receptores TLR, visto que a interação entre A $\beta$  e o receptor TLR4 já foi previamente demonstrada (Walter *et al.*, 2007), assim como a presença deste receptor na pineal (da Silveira Cruz-Machado *et al.*, 2010). Dos 84 genes analisados (descritos na seção Material e Métodos), 55 tiveram sua expressão afetada pelo peptídeo A $\beta_{1-40}$  (0,1  $\mu$ M, 2h), sendo que a expressão de 52 genes aumentou e a de 3 genes diminuiu (fig. 12A). Dentre todos os genes analisados, somente não estão apresentados nos gráficos da figura 12 o resultado de seis genes (*Il1b*, MAP quinases *Map2k3*, *Map2k4*, *Map3k1* e *Map4k4*, e da enzima *Ube2n* - *ubiquitin-conjugating enzyme E2N*), pois os resultados apresentaram grande variação entre as amostras.

É interessante notar que todos os genes pertencentes à família dos receptores TLR tiveram sua expressão aumentada pelo peptídeo A $\beta_{1-40}$  (fig. 12B). A expressão do receptor TLR-5 é a que apresenta maior aumento, porém, isso se deve ao fato de que este é o único receptor dentre os TLRs que não apresenta níveis basais de expressão na glândula pineal, de modo que para os demais a diferença com relação ao grupo controle é menor por já existir uma expressão basal.

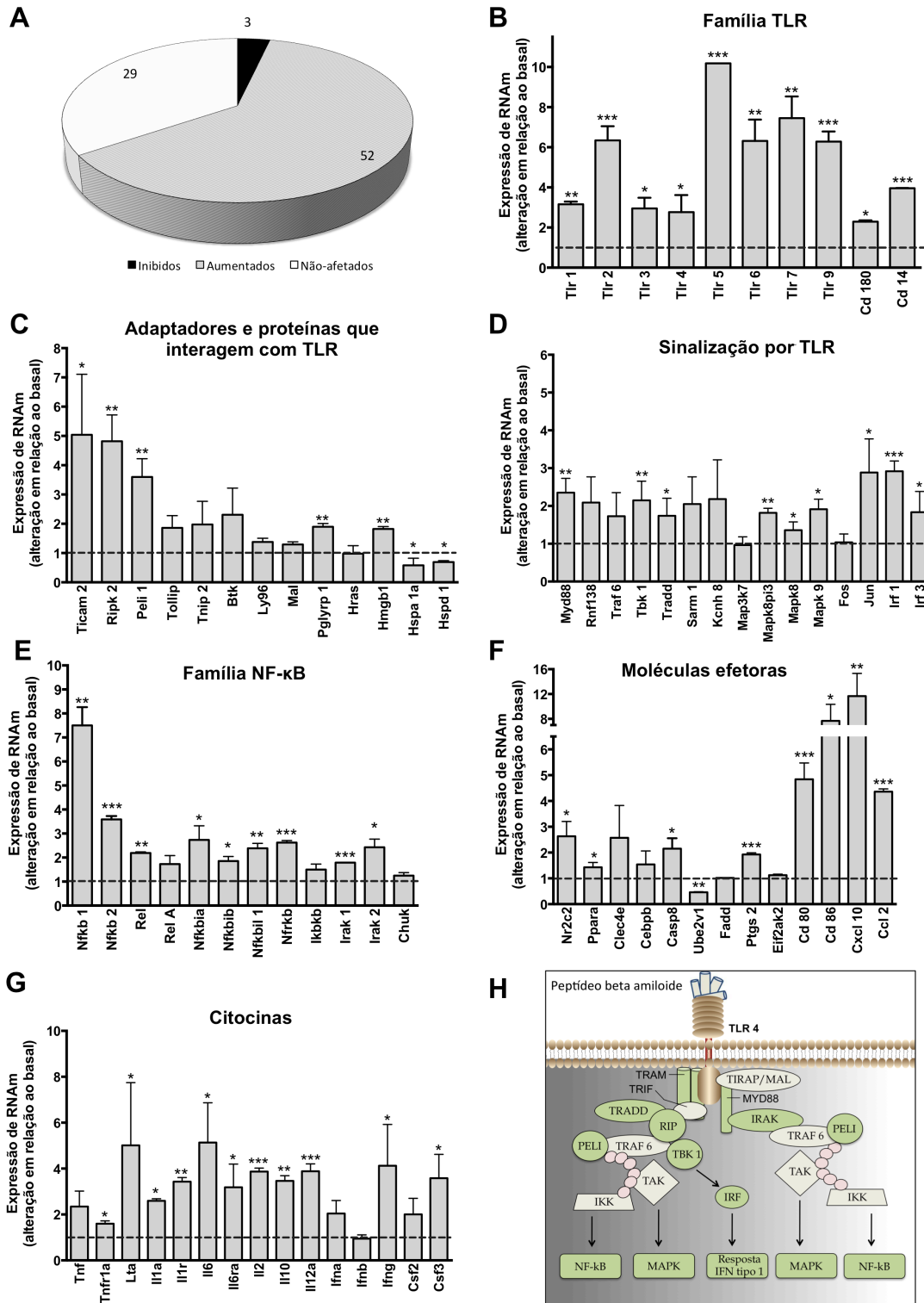


Figura 12 - Peptídeo  $A\beta_{1-40}$  modula a transcrição de genes associados a via dos receptores do tipo Toll (TLRs) em pineais em cultura. Expressão relativa de RNAm detectada por RT-PCR em tempo real em glândulas pineais cultivadas por 48 horas e tratadas com veículo ou com  $A\beta_{1-40}$  (0,1  $\mu$ M, 2h). O gene *Hprt1* foi utilizado como normalizador interno e a expressão de cada gene foi quantificada com relação à expressão no grupo controle (basal, linha horizontal tracejada); n = 3 por grupo; \* p < 0,05; \*\* p < 0,005; \*\*\* p < 0,0005 com relação ao

basal, teste *t* de Student. **A)** Dos 84 genes analisados, A $\beta_{1-40}$  aumentou a expressão da grande maioria (52), inibiu a expressão de três genes, e não alterou a expressão dos demais 29 genes. **B-F)** A expressão relativa dos genes analisados em pineais tratadas com A $\beta_{1-40}$  está apresentada por grupos funcionais (vide texto). **H)** Esquema das vias de sinalização ativadas pela interação A $\beta$ /TLR, destacando em verde as moléculas que tiveram sua expressão aumentada nas pineais tratadas com A $\beta_{1-40}$ .

A ativação dos TLRs é transduzida intracelularmente por duas vias de sinalização: uma dependente (via clássica) da proteína de ancoragem MYD88 (do inglês, *myeloid differentiation factor 88*), e uma MYD88-independente (revisto por Jeong & Lee, 2011). Esse recrutamento inicial ocorre através do domínio TIR, e pode incluir outras proteínas adaptadoras além da MYD88, tais como TIRAP (*TIR-domain-containing adaptor protein*, ou “mal” - *myd88-adaptor like*), TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing IFN $\beta$* , ou TICAM 1, codificado pelo gene *Rnf138*), TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*, ou TICAM 2) e SARM (*sterile  $\alpha$  and HEAT-Armadillo motifs-containing protein*). No presente estudo, observamos que tanto o gene *Myd88* quanto o *Ticam 2* (TRAM) tiveram sua expressão significativamente aumentada nas glândulas tratadas com A $\beta_{1-40}$  (fig. 12C-D), o que pode indicar que ambas as vias - MYD88-dependente e TRIF-dependente - possam estar ativadas na pineal na presença de A $\beta_{1-40}$ . Embora a expressão do gene que codifica TRIF (*Rnf138*) não tenha sido alterada por A $\beta_{1-40}$ , o aumento na transcrição de outros genes associados à via TRIF-dependente, como *Tradd* (*tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein*) e *Ripk 2* (*receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2*), reforça essa sugestão do envolvimento de ambas as vias de sinalização. O gene *Ripk2*, assim como o *Tbk 1* (*TANK-binding kinase*), codificam enzimas serina/treonina quinases que participam da ativação de NF- $\kappa$ B (Pomerantz & Baltimore, 1999). *Peli 1* codifica uma enzima ubiquitina ligase que participa da sinalização por ambas as vias e sua expressão também foi aumentada por A $\beta_{1-40}$  (fig. 12C-D).

Pineais incubadas com A $\beta$ <sub>1-40</sub> apresentaram maior expressão de *Hmgb 1* (*high-mobility group B1*) e *Pglyrp 1* (*peptidoglycan recognition protein 1*) (fig. 12C). Ambas são proteínas que interagem extracelularmente com os TLRs, podendo também ser caracterizadas como efetoras, pois a liberação dessas moléculas e consequente ativação de TLR potencia a resposta inflamatória inicial (Maroso *et al.*, 2010; Mittal *et al.*, 2010). Dentre as vias de sinalização alteradas por A $\beta$ <sub>1-40</sub> está a via das MAP quinases (*mitogen-activated protein kinase*), pois foi detectado aumento na expressão gênica das quinases pertencentes à família c-Jun N-terminal (JNK), mais especificamente das MAPK 8 e 9 e da proteína que interage com a MAPK8 (*Mapk8ip3*) (fig. 12D). Os genes que codificam os fatores de transcrição c-JUN, IRF 1 e IRF 3 também estão mais expressos nas glândula tratadas com A $\beta$ <sub>1-40</sub> (fig 12D). C-JUN atua sob a forma de dímero com c-FOS, formando o fator de transcrição AP-1 (proteína ativadora 1), que regula diversos processos fisiológicos (Raivich & Behrens, 2006). Os fatores de transcrição IRF-1 e IRF-3, por sua vez, também participam da resposta imune inata, assim como o NF- $\kappa$ B, e são mediadores da sinalização do IFN- $\gamma$  (Taniguchi *et al.*, 2001).

Com relação aos genes da via do NF- $\kappa$ B, a grande maioria teve sua expressão aumentada por A $\beta$ <sub>1-40</sub> na pineal (fig. 12E). Com exceção de *RelA*, todos os genes das demais subunidades de NF- $\kappa$ B avaliadas tiveram sua expressão aumentada pelo tratamento com A $\beta$ <sub>1-40</sub>, principalmente p50 (*Nfkb1*). Vale ressaltar que as subunidades p50 e RelA de NF- $\kappa$ B são expressas constitutivamente na pineal em cultura, e que a ativação da via envolve a translocação ao núcleo de proteínas já sintetizadas e, portanto, não depende necessariamente de neo-síntese proteica. Isso é evidenciado pelo fato de detectarmos RelA no núcleo de pineais estimuladas com A $\beta$ <sub>1-40</sub> (fig. 10), mesmo que sua expressão gênica não tenha sido alterada nas condições testadas neste experimento. As proteínas inibitórias I $\kappa$ B $\alpha$  (*Nfkbia*), I $\kappa$ B $\beta$  (*Nfkbib*) e NFKBIL 1

(*NF-κB inhibitor-like 1, Nfkbil1*) tiveram sua expressão gênica aumentada por Aβ<sub>1-40</sub> e são reguladas pelo próprio NF-κB, compreendendo uma retroalimentação negativa sobre a via (Hayden & Ghosh, 2008). NFRKB e as IRAKs 1 e 2, que também apresentaram expressão gênica aumentada (fig. 12E), são enzimas quinases relacionadas à ativação de NF-κB.

O conjunto de moléculas classificadas como efetoras também apresentaram aumento significativo em suas expressões gênicas nas pineais tratadas com Aβ<sub>1-40</sub> (fig. 12F). Dentre essas moléculas estão dois receptores nucleares: **i.** o receptor nuclear órfão membro 2 da subfamília 2, grupo C (*Nr2c2*), que codifica a proteína também conhecida como TR4 (*testicular receptor 4*) e que atua como fator de transcrição na regulação de diversas funções fisiológicas tanto no sistema nervoso central quanto nos órgãos periféricos (Liu *et al.*, 2011); **ii.** o PPARα (*peroxisome proliferator activated receptor alpha*), fator de transcrição relacionado a vias metabólicas e que também participa de respostas inflamatórias, contrabalanceando a ativação de NF-κB (Ramanan *et al.*, 2008; Kauppinen *et al.*, 2013). Outros efetores de maior expressão nas glândulas tratadas com Aβ<sub>1-40</sub> incluem a protease caspase 8, classicamente envolvida na via de apoptose, embora também tenha função não-apoptótica e participe da sinalização do NF-κB (Lemmers *et al.*, 2007), e a enzima ciclooxigenase 2 (COX-2, gene *Ptgs2*), que metaboliza o ácido araquidônico em prostaglandina, importante modulador da resposta imune (Kalinski, 2012).

Dentre todos os genes analisados, o tratamento com Aβ<sub>1-40</sub> diminuiu a expressão somente de 3 genes, sendo eles: os que codificam as proteínas de choque térmico (*heat-shock proteins*) D1 e A1a, e o gene da enzima UBE2v1 (*ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1*), envolvida na sinalização por ubiquitinação (fig. 12C e 12F). Houve aumento na transcrição gênica de moléculas co-estimulatórias de células T - CD80 e CD86 - provavelmente na população de células gliais presente na

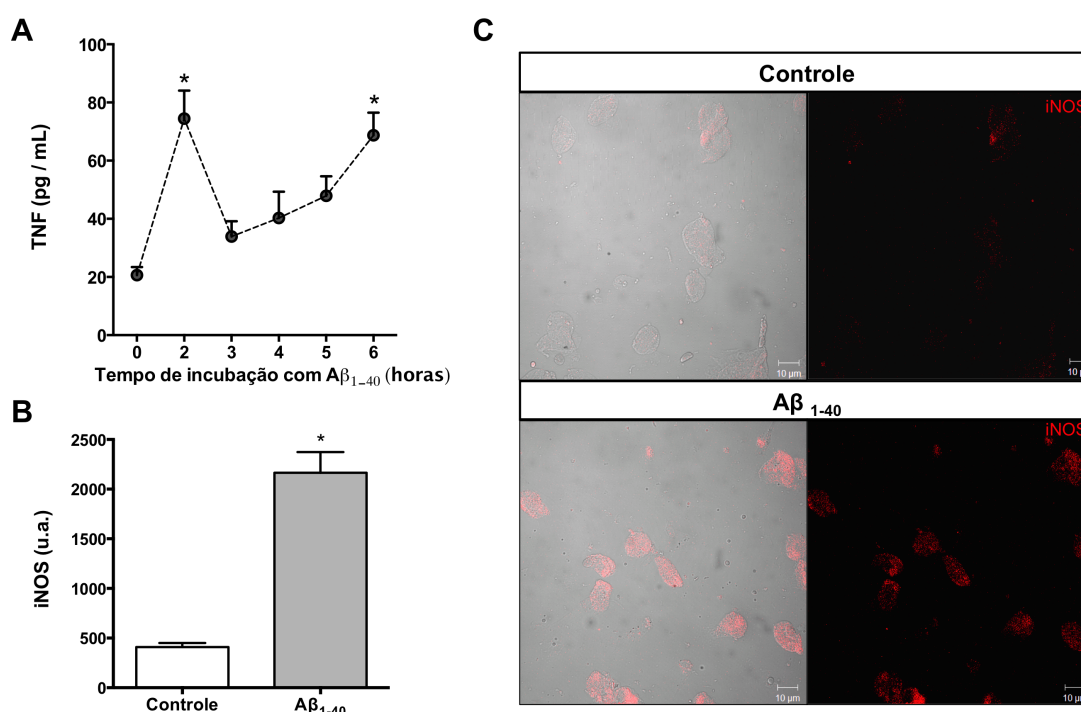
glândula. Essas células provavelmente contribuíram também para a detecção do aumento na expressão das quimiocinas de motivo C-X-C (*Cxcl 10*) e motivo C-C (*Ccl 2*), que atuam na atração de linfócitos T, monócitos e células NK (Robertson, 2002; Adler & Rogers, 2005).

As citocinas também compõem um dos principais grupos de genes-alvos da regulação por NF- $\kappa$ B e, no caso da pineal, podemos observar que praticamente todas as citocinas avaliadas têm sua expressão aumentada pelo peptídeo A $\beta_{1-40}$ , incluindo os genes das citocinas pró-inflamatórias LT $\alpha$  (*lymphotoxin alpha*), das interleucinas IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-12 $\alpha$  e o IFN- $\gamma$  (fig. 12G), bem como dos genes de seus receptores (TNFR, IL-1R e IL-6R). A citocina anti-inflamatória IL-10, que controla e limita a resposta inflamatória, também teve sua expressão aumentada nas glândulas tratadas com A $\beta_{1-40}$ , assim como o gene *Csf 3* (*granulocyte colony stimulating factor*), que codifica a proteína G-CSF e cujo papel como anti-inflamatória já foi demonstrado (Jeon *et al.*, 2011). Por fim, a figura 12H apresenta um esquema exemplificando as vias intracelulares desencadeadas pela ativação de TLR, destacando na cor verde algumas das moléculas cuja expressão gênica foi aumentada em pineais tratadas com A $\beta_{1-40}$ . Os resultados obtidos nesta etapa indicam, portanto, que A $\beta_{1-40}$  induz cascatas de sinalização intracelulares na glândula pineal relacionadas às vias TLR/NF- $\kappa$ B que resultam na transcrição gênica de diversas moléculas mediadoras de resposta inflamatória.

O fato de a citocina TNF não apresentar um aumento estatisticamente significativo em sua transcrição gênica nas glândula estimuladas com A $\beta_{1-40}$  pode ser devido ao tempo de incubação utilizado, de 2 horas, tempo este em que o RNAm já pode estar em fase de degradação, uma vez em que TNF é uma das primeiras citocinas a serem produzidas após ativação da via NF- $\kappa$ B. A mesma hipótese pode ser aplicada para explicar a grande variação obtida na expressão de IL-1 $\beta$ , que



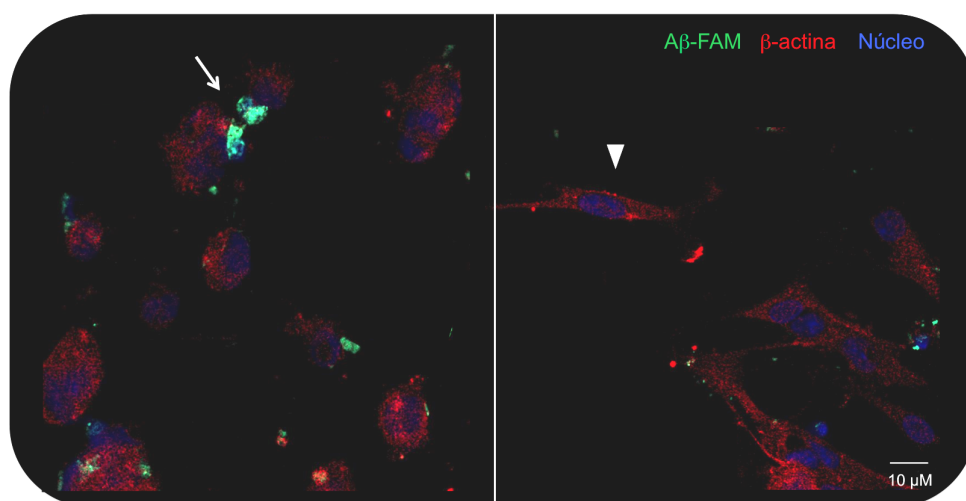
também é uma das primeiras moléculas sintetizadas na resposta inflamatória. Para confirmar esta hipótese quanto ao TNF e corroborar a nível proteico a existência de uma resposta inflamatória em glândulas pineais tratadas com  $A\beta_{1-40}$ , foi feita a dosagem de TNF no meio de cultura de pineais incubadas por 2 a 6 horas com  $A\beta_{1-40}$  (0,1  $\mu$ M) e também a análise da expressão da enzima inflamatória iNOS em pinealócitos tratados com  $A\beta_{1-40}$  (0,1  $\mu$ M, 1h). Glândulas pineais incubadas com  $A\beta_{1-40}$  secretam a citocina TNF, cujo conteúdo máximo é detectado após 2 horas de incubação, sendo seguido de um declínio e um novo pico após 6 horas (fig. 13A).



**Figura 13 - Peptídeo  $A\beta_{1-40}$  aumenta a expressão de TNF e iNOS em glândulas pineais e em pinealócitos, respectivamente.** **A)** Contéudo de TNF presente no meio de cultura de glândulas pineais tratadas com  $A\beta_{1-40}$  (0,1  $\mu$ M; 2 - 6h) ou com veículo (tempo 0); n = 4 glândulas por grupo experimental; \* p < 0,05 comparado ao controle, ANOVA. **B)** Quantificação da expressão da enzima iNOS detectada por imunofluorescência em pinealócitos tratados com  $A\beta_{1-40}$  (0,1  $\mu$ M; 1h) ou veículo (controle); \* p < 0,05, teste t de Student. **C)** Imagens de microscopia confocal representativas de cada grupo, em campo claro (à esquerda) e na ausência de luz branca (à direita), mostrando a expressão de iNOS por imunorreatividade. Barra de escala: 10  $\mu$ m.

A produção de TNF segue, portanto, o mesmo padrão oscilatório descrito para o NF- $\kappa$ B (Nelson *et al.*, 2004). A detecção de aumento induzido por  $A\beta_{1-40}$  na expressão proteica da enzima iNOS por imunofluorescência em pinealócitos dispersos não só confirmou que  $A\beta$  induz uma resposta inflamatória na pineal, como também revelou que esta resposta não é exclusiva das células gliais, ocorrendo também nos pinealócitos (fig. 13B-C)

Por fim, o uso de peptídeo  $A\beta_{1-40}$  conjugado a uma molécula fluorescente ( $A\beta$ -FAM) possibilitou a visualização da interação entre  $A\beta$  e as células da pineal, em cultura de pinealócitos dispersos. Curiosamente, observamos que essa interação é mais frequente entre  $A\beta$  e pinealócitos do que  $A\beta$  e astrócitos, presentes na mesma cultura e diferenciados morfologicamente (fig. 14).



**Figura 14 - Interação entre peptídeos  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) e pinealócitos.** Imagem representativa de microscopia confocal de pinealócitos em cultura incubados com peptídeo  $A\beta_{1-40}$ -FAM (10  $\mu$ M, 24h). Seta branca indica a interação entre o peptídeo e a membrana dos pinealócitos (lado esquerdo), e a cabeça de seta branca mostra a ausência de interação entre  $A\beta_{1-40}$ -FAM e astrócitos, presentes na mesma cultura (lado direito). Para visualização e análise morfológica das células foi feita marcação do citoesqueleto com anticorpo para  $\beta$ -actina (vermelho) e o núcleo foi corado por DAPI (azul). Barra de escala: 10  $\mu$ m.

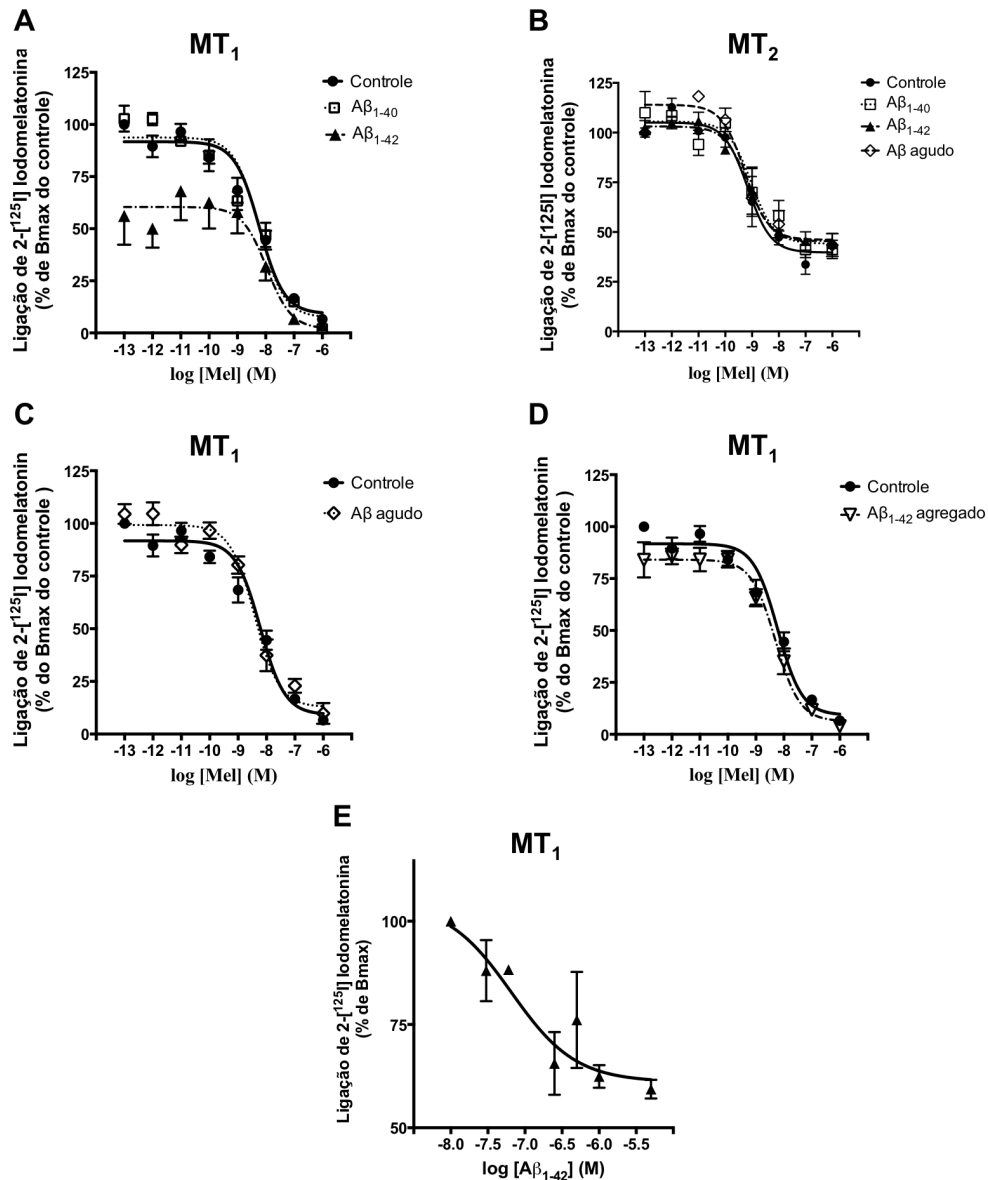
Em resumo, o conjunto dos dados indicam que A $\beta$  é capaz de interagir com os pinealócitos, induzindo uma resposta inflamatória mediada pela via de sinalização TLR/NF- $\kappa$ B que culmina na inibição da cascata biossintética de melatonina.

#### 4. Modulação da função dos receptores de melatonina pelo peptídeo A $\beta$

Para estudar o efeito de A $\beta$  sobre os receptores de melatonina acoplados à proteína G - MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub> - optamos por utilizar células de linhagem HEK293 transformadas para expressar estavelmente ou transientemente cada um desses receptores. Os efeitos de A $\beta$  sobre a ligação da melatonina aos MTRs foram analisados através de curvas de competição entre melatonina marcada radioativamente (2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonina) e melatonina fria em células expressando de forma estável MT<sub>1</sub> ou MT<sub>2</sub> e previamente incubadas com A $\beta$ <sub>1-40</sub> ou A $\beta$ <sub>1-42</sub> (1  $\mu$ M, 24h).

Nestes ensaios foram analisados os valores de ligação máxima ( $B_{max}$ ), que indica o número de sítios de ligação ao ligante, e os valores da constante  $K_i$ , que reflete a afinidade do receptor ao seu ligante. Após detectar a ausência de efeito entre os grupos com os veículos dos respectivos fragmentos de A $\beta$  os dados foram agrupados para formar um único grupo controle. Os resultados demonstraram que o peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub>, mas não A $\beta$ <sub>1-40</sub>, induz uma redução de cerca de 40% no número de sítios de ligação à melatonina ( $B_{max}$ ) com relação ao grupo controle (veículos) nas células expressando o receptor MT<sub>1</sub> (fig. 15A; tabela 2). Já nas células expressando o receptor MT<sub>2</sub> não foi observada nenhuma alteração entre as curvas obtidas com células incubadas com veículo (controle) ou com os peptídeos A $\beta$ <sub>1-40</sub> e A $\beta$ <sub>1-42</sub> (fig. 15B; tabela 2). Ambos os tipos celulares (MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub>) foram ainda tratados com peptídeos A $\beta$ <sub>1-40</sub> e A $\beta$ <sub>1-42</sub> adicionados juntos no momento do ensaio de ligação, grupo designado como A $\beta$  agudo, com o intuito de verificar se os peptídeos competem com a

melatonina pelo mesmo sítio de ligação. A curva obtida não difere da curva do grupo controle de cada grupo, não existindo, portanto, ligação de A $\beta$  no mesmo sítio de ligação da melatonina (fig. 15B-C). Nas células que expressam receptores MT<sub>1</sub>, nas quais A $\beta$ <sub>1-42</sub> diminuiu o número de sítios de ligação à melatonina, verificamos se a forma agregada do peptídeo exerce esse mesmo efeito inibitório. O resultado obtido (fig. 15D) mostra que a forma agregada não tem efeito sobre a ligação melatonina ao receptor MT<sub>1</sub>. Portanto, o efeito observado de redução de B<sub>max</sub> nas células MT<sub>1</sub> é exclusivo de A $\beta$ <sub>1-42</sub> sob a conformação de oligômeros solúveis. Tanto nas células expressando MT<sub>1</sub> quanto nas MT<sub>2</sub> não houve alteração da afinidade dos receptores à melatonina em nenhum dos grupos tratados, conforme evidenciado pelas curvas de competição e pelos valores de K<sub>i</sub> obtidos (fig. 15; tabela 2).



**Figura 15 - Ensaio de ligação de 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonina em células HEK293.** A) Ensaio de competição de ligação de 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonina e melatonina em células HEK293 expressando receptor MT<sub>1</sub> incubadas com veículo (controle) ou com Aβ<sub>1-40</sub> ou Aβ<sub>1-42</sub> (1 μM, 24h). B) Ensaio de competição de ligação de 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonina e melatonina em células expressando MT<sub>2</sub>, incubadas com veículo (controle) ou com Aβ<sub>1-40</sub> ou Aβ<sub>1-42</sub> (1 μM, 24h) ou ambos adicionados no momento do ensaio (Aβ agudo, 1 μM). C) Ensaio de competição de ligação de 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonina e melatonina em células expressando MT<sub>1</sub>, incubadas com veículo (controle) ou com peptídeos Aβ adicionados no momento do ensaio (Aβ agudo, 1 μM). D) Ensaio de competição de ligação de 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonina e melatonina em células expressando MT<sub>1</sub>, incubadas com veículo (controle) ou com agregados de peptídeo Aβ<sub>1-42</sub> (1 μM, 24h). E) Curva concentração-resposta de Aβ<sub>1-42</sub> (24h) sobre a ligação de 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonina em células expressando MT<sub>1</sub>. Dados apresentados como média ± e.p.m. de dois a cinco experimentos independentes, cada um realizado em duplicata.

Para melhor caracterizar o efeito inibitório observado de A $\beta$  sobre o receptor MT<sub>1</sub>, foi feita uma curva concentração-resposta de A $\beta$ <sub>1-42</sub> nestas células, avaliando-se a ligação de 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonina na presença de concentrações crescentes de A $\beta$ <sub>1-42</sub> (10<sup>-8</sup> a 5x10<sup>-6</sup> M, 24h). De acordo com o resultado obtido, o efeito inibitório deste peptídeo sobre o número de receptores é uma resposta concentração-dependente, apresentando valor de IC<sub>50</sub> de 65 nM (fig. 15E).

**Tabela 2 – Valores de ligação máxima (B<sub>max</sub>) e de afinidade (K<sub>i</sub>) dos receptores MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub> à melatonina em células HEK293 tratadas com peptídeos A $\beta$ .**

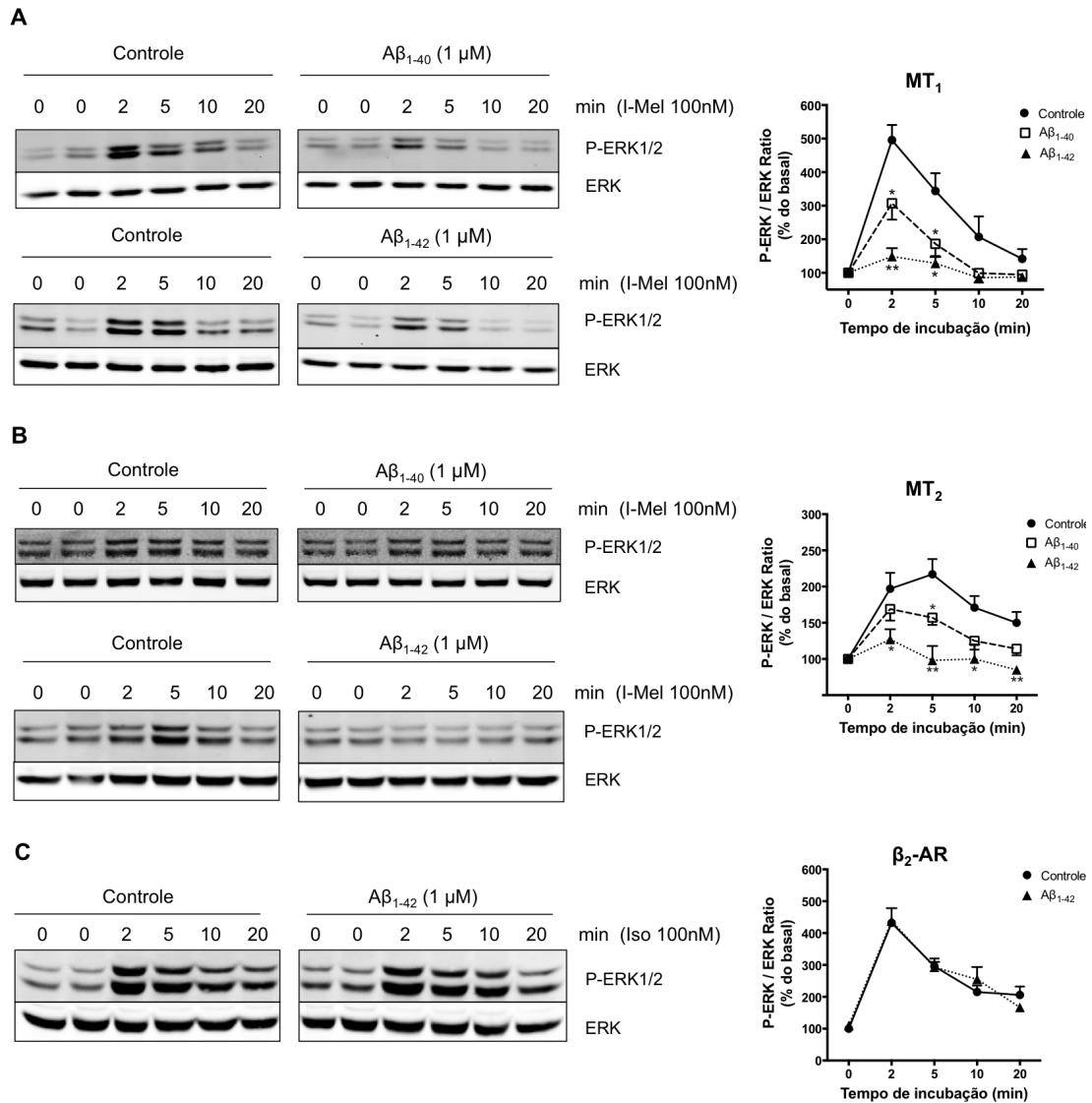
	<b>MT<sub>1</sub></b>		<b>MT<sub>2</sub></b>	
	B <sub>max</sub> (%)	K <sub>i</sub> (nM)	B <sub>max</sub> (%)	K <sub>i</sub> (nM)
Controle	100,0 ± 1.32	1.40 ± 0.35	100,0 ± 2.28	1,37 ± 0.77
A $\beta$ <sub>1-40</sub>	98,52 ± 5.21	0,96 ± 0.38	110,0 ± 10.65	4,89 ± 3.44
A $\beta$ <sub>1-42</sub>	59,78 ± 5.89 ***	1,62 ± 0.40	102,50 ± 3.56	0,67 ± 0.28
A $\beta$ <sub>agudo</sub>	96,43 ± 0.47	1,67 ± 0.33		
A $\beta$ <sub>1-42 agregado</sub>	92,13 ± 3.95	0,83 ± 0.11		

Valores obtidos nos ensaios de competição com 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonina (fig. 15), conforme descrito em Material e Métodos. B<sub>max</sub> foi normalizado com relação ao grupo controle. Dados apresentados como média ± e.p.m. de dois a cinco experimentos independentes, cada um feito em duplicata.

Na etapa seguinte, avaliamos os efeitos modulatórios dos peptídeos A $\beta$  sobre a sinalização intracelular desencadeada pela ativação dos receptores de melatonina em células HEK293 expressando de maneira estável os receptores MT<sub>1</sub> ou MT<sub>2</sub>. Com este intuito, foi avaliada a resposta de fosforilação de ERK1/2 (P-ERK1/2) induzida pela melatonina em células previamente incubadas na presença ou ausência de A $\beta$ <sub>1-40</sub> ou A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Após detectar a ausência de efeito entre os grupos com os veículos dos respectivos fragmentos de A $\beta$ , seus dados foram agrupados para formar um único grupo controle. Nas células que expressam MT<sub>1</sub> e que foram tratadas somente com veículo, observamos que há um pico de P-ERK1/2 após 2 minutos da adição de iodomelatonina (I-Mel, 100 nM). Na presença dos peptídeos, tanto de A $\beta$ <sub>1-40</sub> quanto

de A $\beta_{1-42}$  (1  $\mu$ M, 24h), os níveis de P-ERK1/2 são significativamente menores que no grupo controle (fig. 16A). Nas células que expressam MT<sub>2</sub>, o pico de fosforilação de ERK1/2 ocorre entre 2 e 5 minutos de estimulação com 2-iodomelatonina (I-Mel, 100 nM), e ambos os fragmentos de A $\beta$  também tiveram efeito inibitório sobre esta ativação (fig. 16B). Nos dois tipos celulares o efeito inibitório de A $\beta_{1-42}$  foi nitidamente maior do que o observado com A $\beta_{1-40}$ .

Para discernir se a inibição de A $\beta$  sobre os níveis de P-ERK1/2 é um efeito generalizado sobre esta via de sinalização ou se é específico para a sinalização desencadeada por MTRs, utilizamos outro ligante para ativar esta mesma via - o agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol (Iso, 100 nM). O pico de ativação da fosforilação de ERK desencadeada pela ativação de receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos (expressos de maneira constitutiva em células HEK293) ocorre aos 2 minutos e a incubação prévia dessas células com A $\beta_{1-42}$  (1  $\mu$ M, 24h) não alterou os níveis de P-ERK1/2 induzidos por isopropanol (fig. 16C). Este resultado indica, portanto, que o efeito inibitório de A $\beta$  é específico sobre a sinalização induzida pela ativação dos receptores de melatonina.



**Figura 16 - Peptídeos Aβ inibem a fosforilação de ERK1/2 induzida pela ativação dos receptores de melatonina. A)** Ativação da via ERK1/2 por 2-iodomelatonina (I-Mel, 100 nM, 0 - 20 min) em células HEK293 expressando receptor MT<sub>1</sub>, tratadas com veículo (controle), Aβ<sub>1-40</sub> (1 μM, 18h) ou Aβ<sub>1-42</sub> (1 μM, 18h). **B)** Ativação da via ERK1/2 por 2-iodomelatonina (I-Mel, 100 nM, 0 - 20 min) em células HEK293 expressando receptor MT<sub>2</sub>, tratadas com veículo (controle), Aβ<sub>1-40</sub> (1 μM, 18h) ou Aβ<sub>1-42</sub> (1 μM, 18h). **C)** Ativação da via ERK1/2 por isoproterenol (Iso, 100 nM, 0 - 20 min) em células HEK293, tratadas com veículo (controle) ou Aβ<sub>1-42</sub> (1 μM, 18h). À esquerda, gel representativo da detecção de P-ERK1/2 e ERK1/2 por Western blot; à direita, quantificação de P-ERK1/2 em razão de ERK1/2, expressa com relação ao basal. Dados apresentados como média ± e.p.m. de três (C) a cinco (A e B) experimentos independentes; \* p < 0,05; \*\*p < 0,005, com relação ao grupo controle, por teste ANOVA de duas vias.



Conforme mencionado na introdução, um dos mecanismos que pode conferir particularidades na sinalização induzida pela melatonina é pela formação de dímeros de MTRs (Jockers *et al.*, 2008). Para investigar se os efeitos inibitórios de A $\beta$  sobre a ligação da melatonina à MT<sub>1</sub> e sobre a sinalização evocada por ambos MTRs são devido a alterações conformacionais dos receptores e/ou da capacidade de formarem dímeros entre si, foram realizados ensaios de BRET em células HEK293 expressando transientemente cada MTR. Este ensaio avalia a formação de dímeros entre os receptores, de modo que alterações conformacionais influenciam as interações proteicas e, conseqüentemente, o sinal de BRET.

Para realização de curvas de saturação de BRET, as células HEK293 foram transfectadas com concentração fixa do receptor conjugado à molécula doadora de energia (RLuc) e com concentrações crescentes do receptor conjugado à molécula fluorescente aceptora de energia (YFP). Todas as combinações de dímeros de receptores testadas (MT<sub>1</sub>-RLuc/MT<sub>1</sub>-YFP; MT<sub>2</sub>-RLuc/MT<sub>2</sub>-YFP; MT<sub>1</sub>-RLuc/MT<sub>2</sub>-YFP) geraram curvas de saturação satisfatórias, confirmando que a interação entre os respectivos pares é específica. A incubação prévia das células com os peptídeos A $\beta$ <sub>1-40</sub> ou A $\beta$ <sub>1-42</sub> (1  $\mu$ M, 24h) não alterou o perfil das curvas de nenhum dos dímeros analisados (fig. 17). Em concordância com esta observação, também não foram detectadas alterações significativas nos valores de BRET<sub>50</sub> (valor correspondente à concentração de acceptor capaz de gerar 50% do sinal BRET<sub>max</sub>) entre os diferentes grupos (tabela 3).

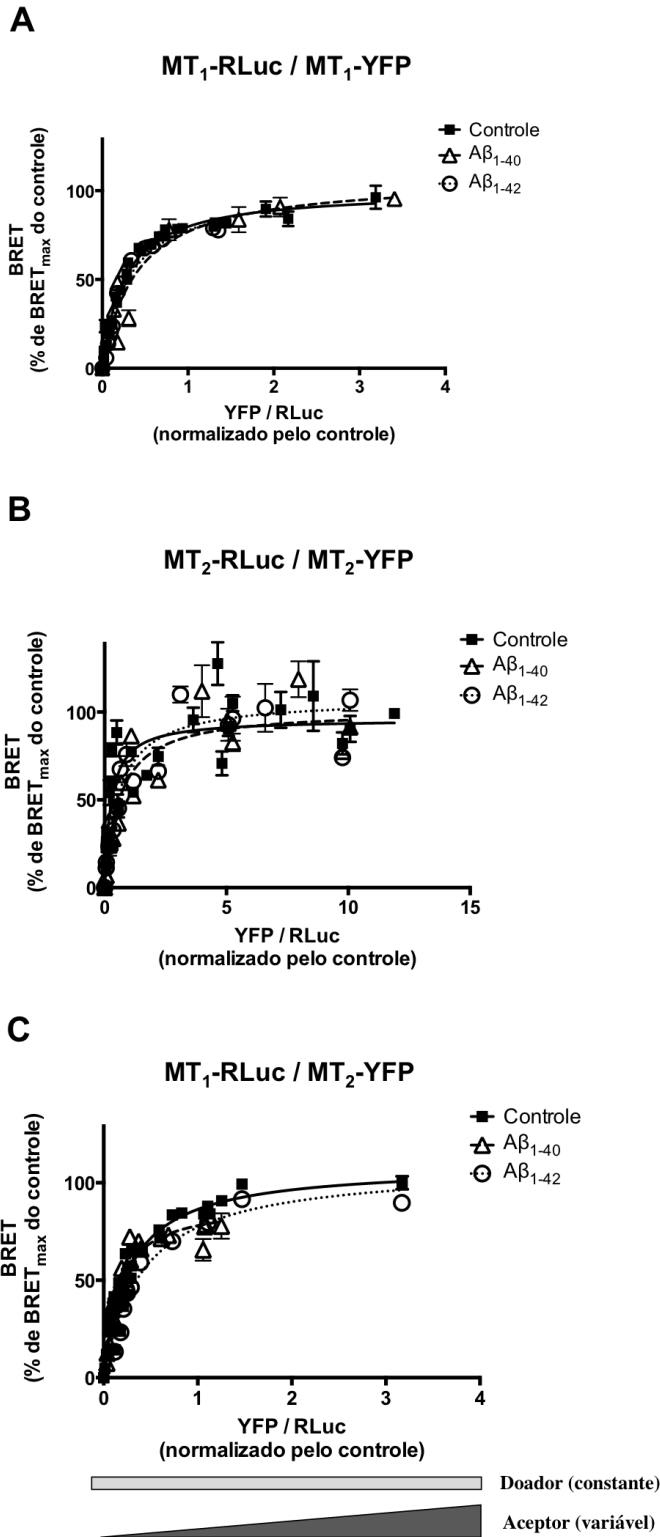


Figura 17 - Peptídeos Aβ não afetam a dimerização dos receptores de melatonina. Curvas de saturação de BRET em células HEK293 expressando os diferentes pares de MTRs acoplados a RLuc (doador) ou a YFP (aceptor): MT<sub>1</sub>-RLuc / MT<sub>1</sub>-YFP (A), MT<sub>2</sub>-RLuc / MT<sub>2</sub>-YFP (B), MT<sub>1</sub>-RLuc / MT<sub>2</sub>-YFP (C). As células foram previamente tratadas com veículo (controle), ou com Aβ<sub>1-40</sub> ou Aβ<sub>1-42</sub> (1 μM, 24h). Dados apresentados como média ± e.p.m. de dois a três experimentos independentes, cada um em triplicata, normalizados com relação a BRET<sub>max</sub> do controle.

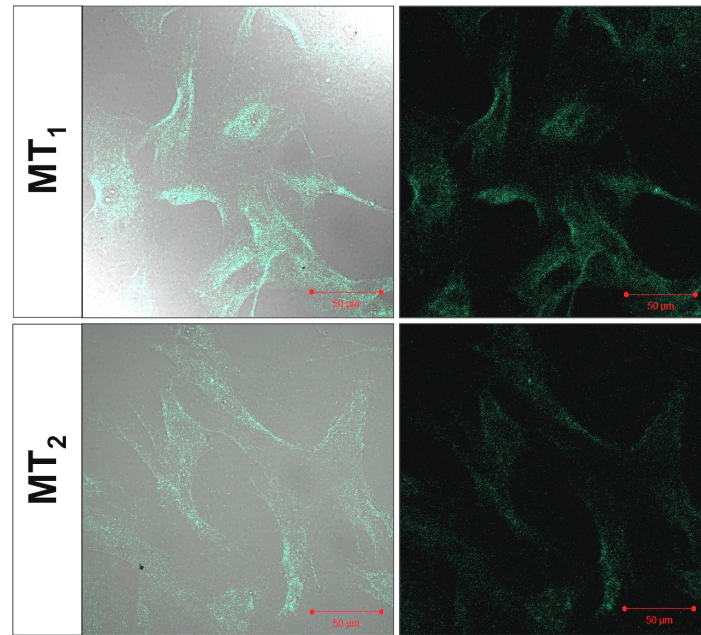
**Tabela 3 - Valores de BRET<sub>50</sub> dos dímeros de MTRs em células HEK293**

	<b>BRET<sub>50</sub> (relativo ao controle)</b>		
	MT <sub>1</sub> -Rluc/MT <sub>1</sub> -YFP	MT <sub>2</sub> -Rluc/MT <sub>2</sub> -YFP	MT <sub>1</sub> -Rluc/MT <sub>2</sub> -YFP
Controle	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.25	1.00 ± 0.08
Aβ <sub>1-40</sub>	1.65 ± 0.20	1.05 ± 0.22	0.83 ± 0.11
Aβ <sub>1-42</sub>	1.17 ± 0.10	1.14 ± 0.2	0.93 ± 0.09

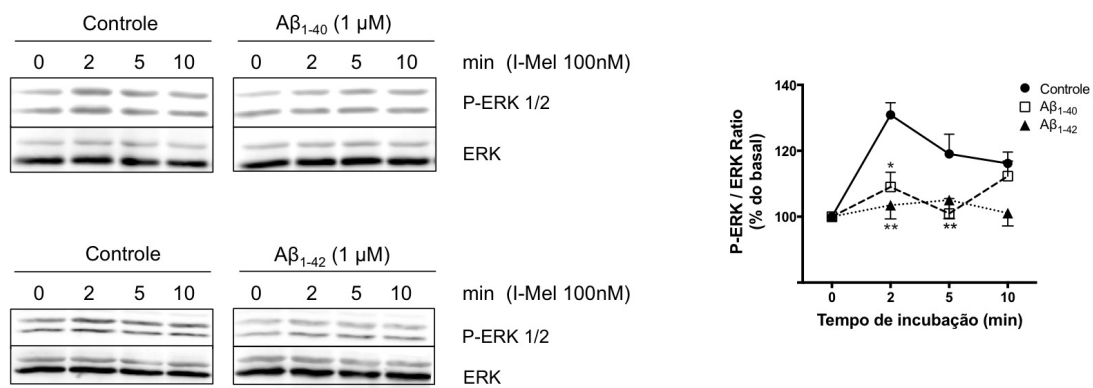
BRET<sub>50</sub> corresponde à concentração de acceptor capaz de gerar 50% do sinal BRET<sub>max</sub>. Dados apresentados como média ± e.p.m. de dois a três experimentos independentes (fig. 17), normalizados com relação ao BRET<sub>50</sub> do grupo controle.

Conclui-se, portanto, que os peptídeos Aβ não causam alterações conformacionais nos receptores MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub> e não induzem maior ou menor propensão à dimerização entre eles. Dessa forma, a modulação nas propriedades de interação entre os MTRs não está envolvida nos efeitos inibitórios observados de Aβ<sub>1-40</sub> e Aβ<sub>1-42</sub> sobre P-ERK1/2 induzida pela ativação de MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub>.

Com o objetivo de verificar se os resultados obtidos nas células HEK293 são reproduzíveis em contexto fisiológico de expressão de MTRs, analisamos a ativação da via ERK1/2 em cultura primária de células endoteliais de ratos, que expressam MTRs de maneira constitutiva, conforme comprovado por imunofluorescência (fig. 18). Assim como nas células HEK293, a incubação das células endoteliais com 2-iodomelatonina (I-Mel, 100 nM) induz aumento nos níveis de P-ERK1/2, com pico aos 2 minutos; e a presença tanto de Aβ<sub>1-40</sub> quanto de Aβ<sub>1-42</sub> (1 μM, 18h), inibe significativamente a ativação desta via (fig. 19). Essa observação comprova a relevância fisiológica dos mecanimos modulatórios que Aβ exerce sobre os receptores de melatonina, detectados primeiramente na linhagem celular HEK293.



**Figura 18 - Expressão de receptores de melatonina MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub> em células endoteliais.** Imagem de microscopia confocal mostrando a expressão de MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub> em cultura primária de células endoteliais de ratos. Imagem de campo claro (à esquerda) e na ausência de luz branca (à direita). Barra de escala: 50 µm.



**Figura 19 - Peptídeos Aβ inibem a fosforilação de ERK induzida pela ativação dos receptores de melatonina.** Ativação da via ERK1/2 por 2-iodomelatonina (I-Mel, 100 nM, 0 - 10 min) em cultura primária de células endoteliais tratadas com veículo (controle), Aβ<sub>1-40</sub> (1 µM, 18h) ou Aβ<sub>1-42</sub> (1 µM, 18h). À esquerda, gel representativo da detecção de P-ERK1/2 e ERK por Western blot; à direita, quantificação de P-ERK1/2 em razão de ERK1/2, expressa com relação ao basal. Dados apresentados como média ± e.p.m. de cinco experimentos independentes; \* p < 0,05; \*\* p < 0,005, com relação ao controle, teste ANOVA de duas vias.

Os dados em conjunto demonstram, portanto, que o peptídeo A $\beta$  é capaz de interferir diretamente em todos os componentes do sistema melatonérgico. Atuando diretamente sobre a glândula pineal, A $\beta$  desencadeia uma resposta inflamatória e inibe a síntese de melatonina, enquanto que sua ação sobre os receptores de melatonina resulta em redução na disponibilidade de MT<sub>1</sub> ao ligante e em inibição da cascata de sinalização intracelular de ERK1/2 ativada tanto por MT<sub>1</sub> quanto por MT<sub>2</sub>.

## DISCUSSÃO

*“Não importa quantos cisnes brancos você veja ao longo da vida; isso nunca lhe dará certeza de que cisnes negros não existem.”*

Karl Popper

## DISCUSSÃO

Há mais de 20 anos tem sido amplamente reportado que pacientes acometidos pela doença de Alzheimer exibem disfunções do sistema circadiano, o que inclui uma redução significativa na concentração plasmática de melatonina e na expressão de seus receptores (Skene *et al.*, 1990; Tohgi *et al.*, 1992; Skene & Swaab, 2003; Uchida *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1999; Mishima *et al.*, 1999; Ohashi *et al.*, 1999; Savaskan *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2003, 2007; Wu & Swaab, 2005, 2007). Pouco se sabia, entretanto, a respeito dos mecanismos subjacentes a tais alterações.

O presente estudo apresenta evidências de que o sistema melatonérgico constitui um alvo específico das ações exercidas pelos fragmentos 1-40 e 1-42 do peptídeo  $\beta$ -amiloide, indicando que a disfunção da produção de melatonina e da funcionalidade de seus receptores não são secundários à outros efeitos de  $A\beta$ . Na glândula pineal, a ação direta de  $A\beta$  foi demonstrada através de ensaios *in vitro*, sendo que glândulas incubadas com ambos os peptídeos apresentam redução significativa na produção de melatonina. O mecanismo de ação pelo qual  $A\beta_{1-40}$  atua envolve a ativação da via NF- $\kappa$ B, o que resulta em inibição da transcrição gênica da enzima AA-NAT e de sua ativação por fosforilação. Além disso, a ativação de vias de sinalização relacionadas à TLR/NF- $\kappa$ B gera uma resposta inflamatória em pineais tratadas com  $A\beta_{1-40}$ , o que foi comprovado pela análise da expressão gênica de diversas moléculas inflamatórias e também pela análise dos níveis proteicos da citocina TNF e de iNOS, importante enzima responsável pela produção do mediador inflamatório NO (revisto por Wink *et al.*, 2011). Os peptídeos  $A\beta$  são ainda capazes de afetar diretamente os receptores de melatonina, alterando a disponibilidade de

sítios de ligação MT<sub>1</sub> na membrana plasmática e diminuindo o sinal intracelular decorrente da ativação tanto de MT<sub>1</sub> quanto de MT<sub>2</sub>, verificado quanto à fosforilação de ERK1/2. Essa última observação, feita inicialmente em linhagem de células HEK293 transfectadas para expressar os receptores de melatonina MT<sub>1</sub> ou MT<sub>2</sub>, foi ainda confirmada em cultura de células primárias que apresentam expressão endógena de ambos os receptores, o que comprova a relevância fisiológica desse efeito. Tais dados indicam, portanto, um efeito direto de A $\beta$  sobre todos os componentes do sistema melatonérgico.

### **1. Glândula pineal como sensor do estado fisiopatológico do organismo**

A modulação da síntese de melatonina por moléculas mediadoras de resposta inflamatória já foi previamente descrita e constitui uma das bases do conceito do eixo imune-pineal (Markus *et al.*, 2007, 2013). O fato de a glândula pineal estar apta a responder a PAMPs, DAMPs e a citocinas por expressar receptores específicos ao reconhecimento dessas moléculas, como o TLR4 e TNFR (da Silveira Cruz-Machado *et al.*, 2010; Carvalho-Sousa *et al.*, 2011), reforça o conceito da pineal como um importante componente da resposta imunológica. A inibição da produção de melatonina foi observada por nosso grupo em modelos *in vitro*, incubando-se glândulas pineais em cultura com TNF ou com LPS (Fernandes *et al.*, 2006; da Silveira Cruz-Machado *et al.*, 2010), e também em situações *in vivo*: em modelo animal de inflamação induzida pela administração de LPS (Tamura *et al.*, 2010); em mulheres com mastite (Pontes *et al.*, 2006), ou que realizaram parto cesariano (Pontes *et al.*, 2007), ou submetidas a procedimento cirúrgico de histerectomia (de Oliveira Tatsch-Dias *et al.*, 2013). Nestas condições, a inibição da produção de melatonina é transiente, sendo restaurada durante o processo de resolução da resposta



imunológica e retorno à condição de hígidez. De fato, em todos estes estudos em humanos observou-se uma evidente correlação inversa entre os níveis de TNF e os de melatonina na circulação sanguínea.

Por outro lado, há também diversos relatos de outras situações patológicas em que o ritmo da produção de melatonina é perdido de maneira prolongada ou permanente. A doença de Alzheimer é claramente a condição em que esta redução na produção de melatonina é mais nítida e melhor reportada (revisto por Hardeland, 2012, 2013; Lin *et al.*, 2013), mas existem ainda relatos de diminuição significativa da melatonina plasmática em diversas outras condições neuropatológicas, tais como: demências semelhantes ao Alzheimer (Uchida *et al.*, 1996; Magri *et al.*, 1997), esclerose múltipla (Akpınar *et al.*, 2008), epilepsia (Fauteck *et al.*, 1999), degeneração da mácula relacionada ao envelhecimento (Rosen *et al.*, 2009) e em alguns transtornos psiquiátricos, como no transtorno obsessivo-compulsivo (Catapano *et al.*, 1992; Monteleone *et al.*, 1994), no distúrbio afetivo sazonal (Srinivasan *et al.*, 2006b), na esquizofrenia (Fanget *et al.*, 1989; Monteleone *et al.*, 1992; 1997; Viganò *et al.*, 2001) e em diversos tipos de depressão, embora ainda haja divergências nos resultados observados por diferentes pesquisadores (revisto por Pacchierotti *et al.*, 2001; Morera-Fumero & Abreu-Gonzales, 2013). Nota-se, portanto, que ainda faltam estudos para esclarecer como e em quais circunstâncias o ritmo biológico de produção de melatonina deixa de ocorrer. Além disso, pouco se sabe sobre a relevância da diminuição na produção de melatonina durante o desenvolvimento destes quadros patológicos.

Algumas das condições patológicas citadas anteriormente têm em comum o fato de serem doenças relacionadas ao envelhecimento. De modo geral, a disfunção da produção de melatonina nestas condições é explicada como sendo consequência

de uma disfunção generalizada do sistema circadiano com o avançar da idade, o que é evidenciado em alguns dos sintomas, como distúrbios do sono (Reilly *et al.*, 1997). Existem dados que de fato suportam esta hipótese como, por exemplo, a observação de que os neurônios dos núcleos supraquiasmáticos têm menor capacidade de sincronização (Skene & Swaab, 2003; Wu *et al.*, 2003; Srinivasan *et al.*, 2005); que as vias de comunicação entre a retina e os NSQs e destes com a pineal são afetadas (Waldhauser *et al.*, 1988; Wu *et al.*, 2006; Wu & Swaab, 2007); ou ainda a observação de que a pineal sofre calcificação progressiva, o que pode comprometer sua atividade biossintética já que existe uma correlação entre a produção de melatonina e a área não-calcificada da pineal (Schmid, 1993; Kunz *et al.*, 1999), inclusive em pacientes com AD (Mahlberg *et al.*, 2008). Apesar destes estudos, o fato de a produção de melatonina ser ainda mais reduzida em AD do que em indivíduos-controle de mesma idade aponta para a existência de mecanismos adicionais neste fenômeno.

Os dados obtidos no presente estudo contribuem para esta linha de pensamento, demonstrando que o peptídeo A $\beta$  atua diretamente sobre os pinealócitos, inibindo a expressão gênica e ativação da enzima AA-NAT, o que resulta em inibição da produção de NAS e de melatonina. É interessante notar que pacientes com outras doenças neurodegenerativas que também envolvem o acúmulo de proteínas em má conformação e alto grau de estresse oxidativo, como as doenças de Parkinson e de Huntington, não apresentam diminuição nos níveis noturnos de melatonina (Fertl *et al.*, 1991; Sandyk, 1997; Bordet *et al.*, 2003; Srinivasan *et al.*, 2006a; Aziz *et al.*, 2009). Embora esses pacientes também apresentem disfunções circadianas entre seus sintomas, inclusive com avanço de fase no ritmo de produção de melatonina, a perda na produção hormonal da glândula pineal nos estágios pré-

clínicos da doença parece ser exclusividade da doença de Alzheimer, provavelmente pelo fato de A $\beta$  atuar especificamente sobre a pineal.

O mecanismo pelo qual A $\beta$  inibe a atividade neuroendócrina da pineal envolve a via do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Esta é uma via clássica na resposta imune inata e nos últimos anos tem-se mostrado como uma via chave na modulação da síntese de melatonina por PAMPs, citocinas (Markus *et al.*, 2013) e agora também por PAMPs (A $\beta$ , presente trabalho). Dímeros de p50 e RelA são recrutados ao núcleo das células da pineal após tratamento com A $\beta_{1-40}$  e exercem papéis distintos na regulação da expressão de genes-alvos. Nos pinealócitos, o aumento no conteúdo nuclear da subunidade p50 induzido por A $\beta_{1-40}$  provavelmente está relacionado com a inibição da transcrição gênica de *Aanat*, já que na presença de inibidor de NF- $\kappa$ B a produção de melatonina por essas células é restaurada. Além disso, a presença e funcionalidade de sítios responsivos ao NF- $\kappa$ B no promotor de *Aanat* já foram demonstradas anteriormente (Markus *et al.*, 2007; Muxel *et al.*, 2012). Já a subunidade RelA de NF- $\kappa$ B exerce regulação positiva sobre a expressão de pacotes gênicos (Hayden & Ghosh, 2012), formando dímeros tanto com p50 quanto com c-Rel (Gilmore & Gerondakis, 2011), que também foi detectada em maior quantidade nos extratos nucleares de pineais estimuladas com A $\beta$ , embora em menor magnitude que p50 e RelA.

Dentre um conjunto amplo de genes relacionados com a resposta inflamatória mediada pela ativação de receptores TLRs, A $\beta$  induziu a expressão da grande maioria deles na pineal. Um fato interessante foi a observação de que, uma vez estimulada com uma molécula DAMP, neste caso A $\beta$ , a pineal passa a expressar um conjunto ainda maior de receptores a PAMPs, DAMPs e a citocinas, como todos os TLRs, TNFR, IL-1R e IL-6R. Isso indica que a glândula torna-se ainda mais

responsiva aos mediadores da resposta inflamatória, que podem atuar de maneira autócrina ou parácrina e prolongar a resposta inibitória de A $\beta$  sobre a produção de melatonina.

O peptídeo A $\beta$  aumentou a expressão da grande maioria das proteínas relacionadas à sinalização de TLRs, tanto da via dependente de MYD88 quanto da via independente, o que pode sugerir o envolvimento destas vias na sinalização induzida por A $\beta_{1-40}$  sobre TLR4 para ativar NF- $\kappa$ B na pineal. A ligação de A $\beta$  ao receptor TLR4 já foi previamente demonstrada (Walter *et al.*, 2007), assim como a presença deste na pineal (da Silveira Cruz-Machado *et al.*, 2010). Conforme esperado, a grande maioria dos genes relacionados à família do fator de transcrição NF- $\kappa$ B é mais expressa nas glândulas tratadas com A $\beta$ , já que o próprio NF- $\kappa$ B é o principal regulador da transcrição destes genes.

Algumas moléculas cuja expressão foi alterada por A $\beta_{1-40}$  na pineal merecem destaque devido ao papel que exercem na resposta neuroinflamatória. A HMGB1, por exemplo, é uma molécula que pode atuar tanto como fator de transcrição, ao se translocar ao núcleo frente a um estímulo de estresse celular, quanto como uma molécula DAMP, ao ser secretado pela célula e ativar receptores TLRs (Maroso *et al.*, 2010; Mittal *et al.*, 2010). Este é um dos mecanismos pelos quais acredita-se que uma resposta neuroinflamatória possa se tornar crônica e gerar processos de neurodegeneração progressiva (Gao *et al.*, 2011). Assim, é possível que, na pineal, esta molécula cronifique a resposta inflamatória induzida por A $\beta$ , induzindo sinalizações que levem à uma disfunção crônica da atividade endócrina da pineal. Destaca-se também o fato de que, entre os 55 genes cuja expressão foi alterada por A $\beta_{1-40}$  na pineal, somente *Hspd 1*, *Hspa 1a* e *Ube2v1* tiveram sua expressão reduzida. Os dois primeiros genes codificam as proteínas de choque térmico HSP60 e HSP70,

respectivamente, e em conformidade com este dado há relatos de que a expressão de ambas as proteínas encontra-se reduzida no hipocampo de modelos animais de AD (Takano *et al.*, 2013). Essas moléculas exercem papel importante no controle conformacional das proteínas após sua tradução e também no encaminhamento de proteínas desnaturadas ou em má conformação para degradação proteassomal. Inclusive, a super-expressão de HSP70 demonstrou-se efetiva em restaurar os déficits cognitivos em camundongos transgênicos para APP utilizados como modelo de AD (Hoshino *et al.*, 2011). Além disso, foi ainda sugerida uma relação entre a HSP60 e a disfunção mitocondrial induzida por A $\beta$ , uma vez em que esta chaperona é necessária para que haja localização mitocondrial de A $\beta$  e que mitocôndrias obtidas do cérebro de pacientes com AD apresentam maior quantidade de HSP60 ligada a APP ou a A $\beta$  (Walls *et al.*, 2012). De maneira similar, o terceiro gene que teve sua expressão reduzida por A $\beta$  na pineal, *Ube2v1*, codifica a enzima UEV-1, que também exerce papel no controle de qualidade proteica, participando do processo de ubiquitinação para encaminhamento proteassomal de proteínas em conformação errônea. É possível que esta proteína também exerça regulação negativa sobre a via NF- $\kappa$ B, já que a ativação desta via depende da degradação proteassomal das proteínas inibitórias I $\kappa$ Bs (Syed *et al.*, 2006). Dessa forma, os dados obtidos com relação a estes genes corroboram estudos feitos com pacientes ou com modelos animais de AD. A desregulação dos mecanismos responsáveis pela degradação de proteínas em má conformação pode favorecer ainda mais o desenvolvimento de AD, contribuindo para o acúmulo crescente de espécies de A $\beta$ .

A indução da expressão gênica de diversas citocinas e quimiocinas por A $\beta$ , como *Cd80*, *Cd86*, *Cxcl10* e *Ccl2*, sugere que as células gliais presentes na pineal participam dessa resposta inflamatória. A ativação de células da glia por A $\beta$  é bem

conhecida e já foi reportada nos mais diversos modelos de estudo de AD (Akiyama *et al.*, 2000; Hardy & Selkoe, 2002; Glass *et al.*, 2010; Verkhratsky *et al.*, 2010). Tanto em microglia quanto em astrócitos, A $\beta$  induz a produção de citocinas via ativação da via NF- $\kappa$ B (Bales *et al.*, 1998; Glass *et al.*, 2010). No presente estudo, A $\beta_{1-40}$  aumentou a expressão gênica tanto de moléculas pró-inflamatórias (TNF, IL-1a, IL-2, IL-6, IL-12a, IFN- $\gamma$ , COX-2 e as quimiocinas já mencionadas), quanto de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, o que é condizente com a ativação clássica de células da glia por A $\beta$  (Ho *et al.*, 1999; Akiyama *et al.*, 2000; Apelt & Schliebs, 2001). Através de mecanismos ainda não bem conhecidos, a neuroinflamação induzida por A $\beta$  é acompanhada por uma resposta inflamatória periférica, sendo que a dosagem de citocinas no plasma tem sido explorada na tentativa de estabelecer assinaturas inflamatórias específicas de AD para o desenvolvimento de métodos diagnósticos. Nestes estudos, as citocinas que mais apresentaram correlação com o quadro patológico de AD foram IL-6, IL-10, IL-1R e G-CSF (Yaffe *et al.*, 2003; Leung *et al.*, 2013), que também estão mais expressas nas glândulas pineais tratadas com A $\beta$  (presente estudo).

No caso da pineal, demonstramos ainda que a resposta inflamatória desencadeada por A $\beta$  não depende somente das células gliais, pois também ocorre nas células neuroendócrinas da pineal – os pinealócitos – nos quais foram detectadas tanto a ativação de NF- $\kappa$ B quanto a expressão da enzima inflamatória iNOS. Além disso, o uso de peptídeo A $\beta_{1-40}$  conjugado à molécula fluorescente comprovou a existência de interação entre A $\beta$  e a membrana das células da pineal. Curiosamente, não foi observada interação entre A $\beta$  e as células astrocíticas presentes na mesma cultura. Os astrócitos são as células predominantes no sistema nervoso central (SNC), que exercem importantes funções na manutenção da homeostase do SNC, regulando

as concentrações de íons, de glutamato, o pH, e ainda disponibilizando energia aos neurônios através do armazenamento de glicogênio (Hansson & Ronnback, 2003; Brown & Ransom, 2007). Os astrócitos também atuam na modulação de sinapses, na manutenção da barreira hemato-encefálica (Bechmann *et al.*, 2007; Abbot, 2013), e nas respostas neuroinflamatórias, tanto através da produção de mediadores inflamatórios quanto na formação das chamadas cicatrizes gliais, que formam uma barreira física para limitar a propagação da resposta inflamatória e o dano tecidual (revisito por Jensen *et al.*, 2013).

Enquanto a microglia é classicamente referida como sendo os macrófagos do cérebro, por exibir capacidade fagocitária, apresentação de antígenos e grande reatividade frente a estímulos imunogênicos (Hanisch & Kettenmann, 2007), a participação dos astrócitos na resposta neuroinflamatória parece depender altamente da resposta microglial inicial. Foi demonstrado que astrócitos quiescentes expressam níveis muito baixos de receptores TLRs, incluindo TLR4 (Sola *et al.*, 2002; Bowman *et al.*, 2003; Falsig *et al.*, 2004), exibindo pouca ligação e reatividade ao LPS na ausência de microglia na cultura (Holm *et al.*, 2012). De forma semelhante, a baixa expressão de TLR4 pode ser a causa da ausência de interação entre A $\beta$  e astrócitos observada na cultura de células dispersas da pineal (presente estudo). O papel da microglia na mediação da interação e/ou responsividade de astrócitos e pinealócitos aos peptídeos A $\beta$  ainda não foi investigado. A interação entre os diferentes tipos celulares da pineal na vigência de uma resposta inflamatória, porém, já foi relatada em estudo prévio, no qual observou-se que um mesmo estímulo (LPS) induz síntese de TNF pela microglia e expressão de receptores de TNF nos pinealócitos (da Silveira Cruz-Machado *et al.*, 2012).

## 2. Efeitos modulatórios de A $\beta$ sobre receptores de membrana

Além da glândula pineal, os dados do presente trabalho fornecem evidências de que os receptores de melatonina também são alvos dos peptídeos A $\beta$ . Em análises *post-mortem* de tecidos cerebrais de pacientes de AD já foram observadas alterações na expressão dos MTRs, com diminuição de MT<sub>2</sub> no hipocampo e córtex e de MT<sub>1</sub> no hipotálamo e córtex (Savaskan *et al.*, 2005; Brunner *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007). Assim como no caso da redução na produção de melatonina, também a modulação de seus receptores parece ser exclusiva, ou mais pronunciada, em AD. Em pacientes portadores de outra proteinopatia neurodegenerativa – a doença de Huntington – nenhuma alteração na expressão de MTRs foi observada (van Wamelen *et al.*, 2013).

O fato do conteúdo plasmático de melatonina estar reduzido desde os estágios iniciais de AD poderia sugerir que a ausência do ligante traria consequências à expressão do seus receptores. Alguns relatos sugerem que a melatonina é realmente capaz de regular a expressão de seus receptores, que também ocorre de maneira rítmica na maioria dos tecidos (Gauer *et al.*, 1993; Barret *et al.*, 1996; Masana *et al.*, 2000), mas este efeito parece ser mais dependente do relógio biológico celular do que da melatonina circulante e ocorre de modo tecido- e espécie-específico (Masana *et al.*, 2000; Poirel *et al.*, 2002). De qualquer modo, o efeito da melatonina observado sobre a expressão de MTRs não explica os dados obtidos nos pacientes de AD, uma vez que animais pinealectomizados, portanto sem melatonina plasmática, apresentam maior expressão de MT<sub>1</sub> nos NSQs, e a administração de melatonina causa diminuição em sua expressão (Gauer *et al.*, 1993). Os dados obtidos no presente estudo indicam que os peptídeos A $\beta$  podem afetar diretamente a funcionalidade dos MTRs, sendo este o provável mecanismo que leva à disfunção



destes receptores em pacientes com AD, e não a produção reduzida de melatonina.

Em células HEK293 expressando estavelmente o receptor  $MT_1$  e incubadas com  $A\beta_{1-42}$  foi detectada uma redução significativa no número de sítios de ligação à melatonina. Interessante notar que este efeito parece ser específico de oligômeros de  $A\beta_{1-42}$  sobre  $MT_1$ , uma vez que os peptídeos  $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{1-42}$  agregado não tiveram efeito sobre  $MT_1$  e nenhum dos peptídeos testados alteraram a capacidade de ligação à melatonina nas células expressando  $MT_2$ . A ausência de efeito com o peptídeo  $A\beta_{1-42}$  em sua conformação agregada é condizente com os relatos atuais que defendem que a maioria das ações de  $A\beta$  é exercida enquanto oligômeros solúveis. Neste sentido, alguns autores sugerem que a formação das placas de agregados de  $A\beta$ , observadas nos estágios mais avançados de AD, poderia servir como reservatório das formas tóxicas do peptídeo (Palop & Mucke, 2010). A afinidade tanto de  $MT_1$  quanto de  $MT_2$  pela melatonina não foi alterada por  $A\beta$  em nenhuma das condições testadas. Portanto, a redução de cerca de 40% no valor de  $B_{max}$  nas células incubadas com  $A\beta_{1-42}$  foi o único efeito observado repetidamente nestes ensaios e foi ainda confirmado pela obtenção de curva concentração-resposta de  $A\beta_{1-42}$ . A partir desta curva pudemos obter o valor de  $IC_{50}$  para  $A\beta_{1-42}$ , que foi em torno de 65 nM. Apesar da dificuldade em se comparar os estudos com relação a  $A\beta_{1-42}$  devido às possíveis diferenças quanto à conformação do peptídeo predominante em cada ensaio (monômeros, dímeros, oligômeros, fibrilas), existe um certo consenso de que as ações prejudiciais de  $A\beta$  à neurotransmissão ocorram na faixa de nM (Mucke & Selkoe, 2012).

Com relação aos mecanismos pelos quais  $A\beta_{1-42}$  gera este efeito, algumas hipóteses são sugeridas a seguir. A possibilidade de que essa redução na ligação de melatonina ao receptor  $MT_1$  fosse devido à competição entre melatonina e  $A\beta_{1-42}$  pela

ligação no mesmo sítio foi excluída pela realização de experimentos em que o peptídeo foi adicionado no momento do ensaio de ligação e foi inefetivo em alterar o padrão da curva de competição de melatonina com 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonina. A existência de regulação transcricional de A $\beta$ <sub>1-42</sub> sobre a expressão do RNAm de MT<sub>1</sub> também é pouco provável, pois a região promotora do gene de MT<sub>1</sub> transfectado nessas células não corresponde à sua sequência nativa. Assim, os mecanismos pelos quais A $\beta$ <sub>1-42</sub> reduz a disponibilidade de MT<sub>1</sub> na membrana devem ser pós-traducionais, possivelmente relacionados ao tráfego do receptor à membrana, à indução de internalização do receptor ou ainda à mecanismos que alterem o acoplamento deste com as proteínas G. Com relação a esta última hipótese, diversos relatos mostraram disfunção na interação entre GTP e o receptor muscarínico de acetilcolina M<sub>1</sub> na condição de AD (Smith *et al.*, 1987; Flynn *et al.*, 1991; Joseph *et al.*, 1993). Foi observado ainda que o tratamento de células da linhagem CHO (*Chinese hamster ovary*) com A $\beta$ <sub>1-42</sub> inibe seletivamente o acoplamento entre M<sub>1</sub> e a proteína G<sub>q/11</sub>, resultando também em alteração nas propriedades de ligação do agonista carbacol (Janícková *et al.*, 2013). Com base neste dado, é possível hipotetizar também que o efeito de A $\beta$ <sub>1-42</sub> sobre MT<sub>1</sub> afete somente uma população específica de receptores, acoplados à subtipo específico de proteínas G, o que explicaria o fato de 60% dos sítios de ligação nas células expressando MT<sub>1</sub> permanecerem disponíveis e também a ausência de efeito sobre MT<sub>2</sub>. Um outro estudo demonstrou que A $\beta$ <sub>1-42</sub> induz a oligomerização de receptores de angiotensina AT<sub>2</sub> e sugeriu que estes oligômeros poderiam ser responsáveis por sequestrar proteínas G<sub>q/11</sub> levando ao desacoplamento entre G<sub>q/11</sub> e M<sub>1</sub> (AbdAlla *et al.*, 2009a,b; Thathiah & De Strooper, 2009). A confirmação destes dados permitirá deduzir que a oligomerização de AT<sub>2</sub> ou de outros GPCRs induzida por A $\beta$ , e o consequente sequestro de proteínas G,

pode resultar na modulação não só de  $M_1$ , mas de vários outros GPCRs, incluindo MTRs. Além disso, alguns estudos em tecidos cerebrais *post-mortem* de pacientes com AD sugerem que a expressão ou atividade de determinadas subunidades da proteína G estejam alteradas (Cowburn *et al.*, 1992; O'Neill *et al.*, 1994).

Por fim, podemos ainda postular que  $A\beta$  seja capaz de modular os processos de tráfego e internalização do receptor  $MT_1$ , embora essa seja uma ação ainda pouco explorada de  $A\beta$ . De modo geral, os processos de internalização de GPCRs envolvem sua fosforilação por proteínas quinases de GPCRs (GRKs) e recrutamento de  $\beta$ -arrestina. Após internalização, o receptor pode ser reciclado e voltar à membrana ou ser direcionado para degradação lisossomal (revisto por Drake *et al.*, 2006). O único exemplo desta situação mostra que  $A\beta_{1-42}$  induz a fosforilação do receptor  $\beta_2$ -adrenérgico por GRK2, resultando em internalização e degradação do receptor na dependência de arrestina 3 e dinamina (Wang *et al.*, 2011). Além disso, foi observado que o hipocampo de indivíduos com AD apresenta maior expressão da molécula  $\beta$ -arrestina 2 do que indivíduos controle, embora os autores não tenham explorado essa descoberta com relação a possíveis efeitos modulatórios sobre a sinalização de GPCRs (Thathiah *et al.*, 2013).

Diferentemente dos ensaios de ligação de melatonina aos MTRs, nos quais o efeito de  $A\beta$  foi restrito ao peptídeo  $A\beta_{1-42}$  e ao receptor  $MT_1$ , a sinalização de melatonina mediada por ambos MTRs foi afetada pelos dois fragmentos de  $A\beta$ . Tanto  $A\beta_{1-40}$  quanto  $A\beta_{1-42}$  inibiram significativamente a fosforilação de ERK1/2 induzida por melatonina em células HEK293 expressando  $MT_1$  ou  $MT_2$ . Interessante notar que nos estudos a cerca dos MTRs, os efeitos de  $A\beta_{1-42}$  foram mais pronunciados do que os de  $A\beta_{1-40}$ , enquanto que sobre a glândula pineal  $A\beta_{1-40}$  foi mais potente do que  $A\beta_{1-42}$  em inibir a produção de melatonina.

Os resultados obtidos nas células HEK293 expressando MT<sub>2</sub> e incubadas com ambos peptídeos e nas células MT<sub>1</sub> incubadas com peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> sugerem que os peptídeos A $\beta$  podem interferir na sinalização intracelular desencadeada pela melatonina independentemente da ligação do hormônio aos receptores permanecer intacta, como demonstrado pelos ensaios de ligação nestas condições. Para avaliar, portanto, se este é um efeito generalizado de A $\beta$  sobre a via de sinalização da ERK1/2, analisamos os efeitos dos peptídeos sobre a fosforilação de ERK1/2 induzida por isoproterenol em células HEK293 não-transfectadas, que expressam o receptor  $\beta$ <sub>2</sub>-adrenérgico de maneira endógena. Nestas condições, A $\beta$ <sub>1-40</sub> e A $\beta$ <sub>1-42</sub> não afetaram os níveis de P-ERK1/2, indicando, portanto, que o efeito inibitório é específico sobre a sinalização desencadeada pela ativação de MTRs.

A sinalização induzida pela ativação de MTRs é geralmente mediada pela proteína G<sub>i</sub> e em alguns casos também por G<sub>q</sub>. (Mackenzie *et al.*, 2002; Jockers *et al.*, 2008). Nas células HEK293 utilizadas, a ativação de ERK por melatonina pode ser dependente das proteínas G<sub>i</sub> ou G<sub>q</sub>, mas não depende da  $\beta$ -arrestina (Ralf Jockers, comunicação pessoal). Já a ativação induzida pelo receptor  $\beta$ <sub>2</sub>-adrenérgico envolve a proteína G<sub>s</sub> ou a  $\beta$ -arrestina (Shenoy *et al.*, 2006). Dessa forma, a hipótese discutida anteriormente sobre um possível desacoplamento do receptor à proteína G induzido por A $\beta$  também se aplica a estes resultados. Considerando que A $\beta$  atue especificamente sobre determinadas subunidades de proteínas G, isso explicaria a ausência de efeito quando a via da ERK é desencadeada pelo receptor  $\beta$ <sub>2</sub>-adrenérgico.

A família das MAP quinases é classicamente dividida em três membros: ERK1/2, JNK e p38. Nas células neuronais, JNK e p38 são geralmente associadas a processos apoptóticos, enquanto que ERK1/2 está envolvida na sobrevivência

celular, proliferação e diferenciação, embora sua participação em processos neurodegenerativos também tenha sido demonstrada (Stanciu *et al.*, 2000). Na patologia de Alzheimer, existem diversos relatos comprovando o envolvimento das MAPK nos processos relacionados à neurodegeneração e, em geral, descrevem uma exacerbação na ativação das três vias das MAPK nos tecidos cerebrais, frequentemente vinculada ao estresse oxidativo ou a uma ação direta do peptídeo A $\beta$  (Zhu *et al.*, 2001; Ghasemi *et al.*, 2014). Entretanto, ao avaliar a integridade da via da ERK1/2 em modelo animal de AD ou em células neuronais, ativando-a por estímulos como dano tecidual ou fatores tróficos, observou-se que a presença de A $\beta$  causa grande atenuação da resposta de ativação de ERK1/2 (Chromy *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2007), resultado semelhante aos obtidos no presente estudo em células HEK293. Estes dados foram ainda confirmados em cultura de células primárias endoteliais de ratos, que expressam ambos MTRs endogenamente e cuja ativação da via ERK1/2 também foi significativamente inibida pela incubação prévia com A $\beta$ <sub>1-40</sub> ou A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Isso demonstra a relevância fisiológica dos efeitos de A $\beta$  sobre MTRs e está de acordo com os dados supracitados a respeito da defasagem na via de sinalização de ERK1/2 em modelos de AD.

Ainda com relação à sinalização induzida por melatonina via seus receptores de membrana, foi recentemente demonstrado que a formação de dímeros entre MTRs pode induzir vias de sinalização específicas, diferente das classicamente observadas para cada receptor isoladamente (Baba *et al.*, 2013). Um número crescente de evidências tem indicado que a organização de GPCRs em complexos diméricos ou oligoméricos pode gerar grandes modificações nas propriedades farmacológicas e nas características funcionais dos receptores (AbdAlla *et al.*, 2000; Prinster *et al.*, 2005; Kamal & Jockers, 2011; Tadagaki *et al.*, 2012). Um bom exemplo disso é o

heterodímero de MT<sub>1</sub> com o receptor órfão GPR50, um complexo que resulta em grande redução na capacidade de ligação de agonistas a MT<sub>1</sub>, assim como na ativação de sinalização intracelular e no acoplamento da  $\beta$ -arrestina a este receptor (Levoye *et al.*, 2006; Jockers *et al.*, 2008).

Com base nestas observações e também no estudo previamente comentado de Abdalla e colaboradores (2009a), que demonstrou que A $\beta$  induz a formação de oligômeros de receptores AT<sub>2</sub>, avaliamos se as alterações observadas na funcionalidade dos MTRs induzidas por A $\beta$  poderiam ser consequência da facilitação ou inibição da propensão de MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub> em formarem dímeros entre si na presença de A $\beta$ . Conforme os dados obtidos nos ensaios de BRET, A $\beta$  não altera a capacidade de MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub> em formarem homo- ou heterodímeros entre si e, portanto, podemos descartar essa hipótese, embora outros possíveis candidatos à interação com MTRs não foram analisados. Além disso, os dados do ensaio de BRET sugerem ainda que os peptídeos A $\beta$  não modificam o estado conformacional dos receptores, pois isso acarretaria em alteração dos sinais de BRET na presença de A $\beta$ . Por fim, vale ressaltar também que, no trabalho realizado com o receptor AT<sub>2</sub>, os oligômeros foram observados em tecidos cerebrais de pacientes de AD ou de modelos animais de AD e os autores concluíram que o efeito de A $\beta$  na indução de oligomerização era indireto, mediado pelo estresse oxidativo gerado na condição de AD (AbdAlla *et al.*, 2009a,b). Dessa forma, não podemos descartar uma possível modulação no processo de dimerização de MTRs em condições *in vivo* de AD, que sabidamente envolvem a geração de estresse oxidativo.

Independentemente de qual seja o mecanismo molecular responsável pelas ações de A $\beta$  sobre os receptores de melatonina, os dados obtidos indicam claramente que A $\beta$  exerce efeito inibitório sobre a sinalização de melatonina mediada pela

ativação de MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub>. A reprodutibilidade deste resultado em cultura de células primárias que expressam MTRs constitutivamente demonstra ainda a relevância fisiológica da modulação da atividade destes receptores por Aβ. Tais dados tornam-se ainda mais importantes ao considerarmos que o efeito anti-apoptótico de melatonina sobre células imunocompetentes envolve a ativação de MTRs e a via de sinalização da ERK1/2 (Luchetti *et al.*, 2009; Espino *et al.*, 2013), e o efeito neuroprotetor da melatonina em neurônios cerebelares desafiados com a molécula citotóxica LPS é totalmente abolido na presença do antagonista de MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub>, luzindol (Pinato *et al.*, 2014). Dessa forma, a deficiência na sinalização da melatonina mediada por seus receptores pode representar um importante mecanismo na vulnerabilidade neuronal induzida por Aβ.

### **3. Relevância da disfunção do sistema melatonérgico**

A grande maioria dos dados disponíveis na literatura a respeito da disfunção do sistema melatonérgico remetem à alterações no sistema de temporização interno e geralmente são aceitas como consequência natural do envelhecimento. Entretanto, a recente formulação do conceito do eixo imune-pineal por nosso grupo possibilitou uma nova interpretação destes relatos. Sob o ponto de vista do eixo imune-pineal, no qual a glândula pineal participa da resposta imune inata e é sensível à presença de patógenos ou de mediadores inflamatórios, reduções nos níveis plasmáticos de melatonina assumem um novo significado, pois podem ser indicativos da vigência de um quadro patológico.

De acordo com as evidências que estabeleceram as bases do eixo imune-pineal considera-se que, uma vez que a resposta imune inata é finalizada, a síntese de melatonina pela pineal é restaurada. O fato de pacientes de AD apresentarem

níveis significativamente reduzidos de melatonina plasmática, aliado aos dados do presente estudo que apontam para um efeito inibitório direto de A $\beta$  sobre a glândula pineal, ampliam o conceito do eixo imune-pineal na medida que sugerem que a produção de melatonina pela pineal possa ser permanentemente prejudicada em situações em que o estímulo inflamatório é mantido constante. Ainda com relação ao eixo imune-pineal, outra premissa é que a inibição da produção pineal de melatonina é acompanhada pela síntese desta molécula em sítios extra-pineais, nos quais irá auxiliar na resposta imune através de seus papéis antioxidante, citoprotetor ou imunomodulador. Em uma situação de neuroinflamação, foi verificado que a área cerebral que produz mais melatonina - o cerebelo - é também a mais protegida contra morte neuronal (Pinato *et al.*, 2014). Porém, o bloqueio dos receptores de melatonina com luzindol torna essas células susceptíveis aos efeitos citotóxicos do LPS. O fato de A $\beta$  atuar tanto sobre a pineal quanto sobre os MTRs implica, portanto, numa inibição também dos efeitos da melatonina de origem extra-pineal, agravando a resposta inflamatória e os danos neuronais.

Além do efeito neuroprotetor, a perda de outras funções da melatonina pelo bloqueio de sua síntese ou de seus receptores pode ter relevância especial ao desenvolvimento de AD. Sobre este aspecto, destaca-se o efeito modulatório da melatonina sobre receptores colinérgicos. Conforme já apresentado anteriormente, a perda da neurotransmissão colinérgica é característica predominante na patologia de AD. Inclusive, o único tratamento disponível atualmente para tentar retardar o progresso da doença é através do uso de drogas anti-colinesterásicas (donezepil, galantamina, rivastigmina), que inibem a ação da enzima que degrada a acetilcolina (colinesterase) e, portanto, aumentam os níveis desse neurotransmissor nas fendas sinápticas (Wilkinson *et al.*, 2004). Foi observado que, de fato, os tecidos cerebrais



provenientes de pacientes de AD apresentam número reduzido de receptores colinérgicos, principalmente dos receptores nACh  $\alpha 7$  e  $\alpha 4\beta 2$  (Nordberg, 2001; Jürgensen & Ferreira, 2010). Além disso, também foi verificado efeito direto de A $\beta$  induzindo disfunção tanto do receptor mACh M<sub>1</sub> (Flynn *et al.*, 1991; Joseph *et al.*, 1993; Janícková *et al.*, 2013), quanto de  $\alpha 7$  (Liu *et al.*, 2001; Salamone *et al.*, 2014).

A comparação da resposta à nicotina em linhagens de camundongos que produzem ou não melatonina (C3H e C57BL, respectivamente) indicou que esta resposta apresenta uma variação rítmica dependente da presença do hormônio (Mexal *et al.*, 2012). Essa relação também foi previamente demonstrada em diferentes tecidos de ratos. A resposta de contração do vaso deferente induzida pela ativação de receptores  $\alpha 7$  pré-sinápticos por ACh, por exemplo, é potenciada pela melatonina, sendo que esta também é uma resposta que apresenta ritmicidade dirigida pela melatonina plasmática (Carneiro *et al.*, 1991). Além disso, a presença de melatonina exógena neste tecido induz um aumento na sensibilidade à nicotina, determinada em ensaios de ligação (Markus *et al.*, 1996). Efeito semelhante foi observado em preparações de tecido cerebelar, no qual a liberação de glutamato induzida pela ativação do receptor  $\alpha 7$  também apresenta ritmo diário dependente da melatonina plasmática (Markus *et al.*, 2003). O envolvimento dos receptores colinérgicos nos processos de aprendizado e memória é bem conhecido e a ativação específica do receptor nACh  $\alpha 7$  potencia a LTP no hipocampo (Chen *et al.*, 2006). Dessa forma, a relação entre a melatonina plasmática e a resposta de receptores nicotínicos (Markus *et al.*, 2010) sugere que a disfunção do sistema melatonérgico possa implicar em aumento da disfunção na neurotransmissão colinérgica em AD, agravando ou acelerando os problemas de memória. Esta proposição é fortalecida ao considerarmos alguns estudos nos quais o sistema melatonérgico foi propositalmente

inibido. Inibição da síntese de melatonina pelo bloqueio da enzima HIOMT ou pela condição de claro constante induz déficit na memória espacial em ratos (Zhu *et al.*, 2004; Ling *et al.*, 2009), e camundongos transgênicos que não expressam o receptor MT<sub>2</sub> têm desempenho pior do que os camundongos selvagens em tarefas de memória (Larson *et al.*, 2006).

Se por um lado esses dados apontam para prováveis consequências prejudiciais da disfunção do sistema melatonérgico quanto à função cognitiva, por outro lado eles também sugerem possíveis aplicações terapêuticas da melatonina na tentativa de prevenir este cenário. Diversos estudos já demonstraram os efeitos benéficos da melatonina sobre as alterações moleculares e comportamentais relacionadas especificamente com AD (revisto por Rosales-Corral *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2013). Experimentos *in vitro* demonstraram que a melatonina diminui a ativação da enzima glicogênio sintase quinase (GSK3), principal responsável pela fosforilação de tau, atenuando portanto a hiperfosforilação desta proteína (Liu *et al.*, 2002); diminui a geração e acúmulo de A $\beta$  (Song & Lahiri, 1997; Lahiri, 1999; Olivieri *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008); e inibe a formação de agregados de A $\beta$  por ser capaz de interagir diretamente tanto com A $\beta$ <sub>1-40</sub> quanto A $\beta$ <sub>1-42</sub> e inibir a conformação desses peptídeos em folhas  $\beta$  (Pappolla *et al.*, 1998, 2002; Poeggeler *et al.*, 2001; Skribanek *et al.*, 2001; Masilamoni *et al.*, 2008). Além disso, os papéis já bem conhecidos da melatonina como antioxidante (revisto por Pandi-Perumal *et al.*, 2013) e anti-inflamatória (revisto por Reiter *et al.*, 2000), principalmente devido à sua capacidade de inibir NF- $\kappa$ B demonstrada nos mais diversos tecidos e inclusive na pineal (Mohan *et al.*, 1995; Lezoualc'h *et al.*, 1998; Gilad *et al.*, 1998; Beni *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Bruck *et al.*, 2004; Tamura *et al.*, 2009; Cecon *et al.*, 2010), também são protetores na condição de AD por limitarem a resposta neuroinflamatória

(Rosales-Corral *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2007; revisto por Pandi-Perumal *et al.*, 2013). O efeito neuroprotetor da melatonina contra a citotoxicidade de A $\beta$ , especificamente, também já foi demonstrado em linhagens de células neuronais e também de células gliais (Feng & Zhang, 2004a,b; Radogna *et al.*, 2009; Hoppe *et al.*, 2010) e em estudos *in vivo* (Shen *et al.*, 2002; Matsubara *et al.*, 2003; Rosales-Corral *et al.*, 2003; Feng *et al.*, 2004a; Wang, 2009). Com relação a estes estudos *in vivo*, a administração de melatonina exógena demonstrou-se eficaz na melhoria dos aspectos cognitivos em modelos animais de AD (Feng *et al.*, 2004a,b), na restauração da função mitocondrial (Dragicevic *et al.*, 2011) e na redução da geração e deposição de A $\beta$  (Matsubara *et al.*, 2003; Lahiri *et al.*, 2004). Por outro lado, em um estudo utilizando o mesmo modelo animal de AD que o grupo de Matsubara, porém iniciando a administração de melatonina somente aos 14 meses de idade dos animais, ou seja, quando a doença já estava instalada, a melatonina não foi capaz de remover as placas amiloides já existentes e nem de prevenir a formação de novas placas, não revertendo também a resposta de estresse oxidativo (Quinn *et al.*, 2005). Este dado torna explícito que a eficácia da melatonina na melhoria das alterações moleculares patológicas de AD depende de uma intervenção precoce, em que o organismo ainda esteja responsivo a este hormônio.

Apesar de a grande maioria dos testes clínicos realizados com melatonina em pacientes de AD tenham focado exclusivamente na melhoria de padrões comportamentais relacionados ao sistema circadiano, principalmente com relação aos distúrbios do sono, a melatonina demonstrou-se benéfica na maioria dos casos (Cardinali *et al.*, 2010). Assim como o observado nos modelos animais, é muito provável que os estudos em que a melatonina não gerou efeitos significativos correspondam à análise de pacientes em estado já bem avançado de AD. Essas

evidências, aliadas às evidências da ação direta de A $\beta$  sobre os componentes do sistema melatonérgico proporcionadas pelo presente estudo, corroboram a hipótese de que a disfunção do sistema melatonérgico é progressiva e que, portanto, a administração de melatonina com fins terapêuticos deve ser iniciada o quanto antes.

Embora o uso terapêutico da melatonina venha sendo sugerido há muitos anos (Brusco *et al.*, 1998, 2000; Cardinali *et al.*, 2010; Cecon & Markus, 2011), nota-se que ainda faltam alguns consensos para a criação de protocolos clínicos eficazes, principalmente no que tange a concentração de melatonina a ser administrada, a forma de administração e em qual momento iniciar essa intervenção. Com base no que foi exposto na seção anterior, torna-se nítido que o bom funcionamento do sistema melatonérgico é condição *sine qua non* tanto à manutenção das propriedades cognitivas e proteção neuronal, quanto à eficácia do uso terapêutico da melatonina. Além do mais, a verificação de que indivíduos idosos considerados estritamente saudáveis e que não fazem uso de nenhum medicamento apresentam ritmos de produção hormonal de melatonina compatíveis aos de indivíduos jovens (Ohashi *et al.*, 1997; Zeitzer *et al.*, 1999; Ackermann & Stehle, 2006; Bedrosian & Nelson, 2012), corrobora a hipótese de nosso grupo de que alterações no sistema melatonérgico não são parte de um envelhecimento saudável, mas sim consequências de modulação negativa direta da atividade da pineal pela ativação do eixo imune-pineal. Seguindo este mesmo raciocínio, pode-se supor inclusive que um protocolo de reposição hormonal de melatonina, com o intuito de manter seu padrão rítmico e em concentrações fisiológicas, seja talvez uma aplicação mais eficaz da melatonina, com papel preventivo ao desenvolvimento de processos neurodegenerativos. Além disso, o desenvolvimento de fármacos que impeçam os efeitos inibitórios de A $\beta$  sobre a

funcionalidade dos MTRs também pode ter valor terapêutico nos estágios iniciais de AD.

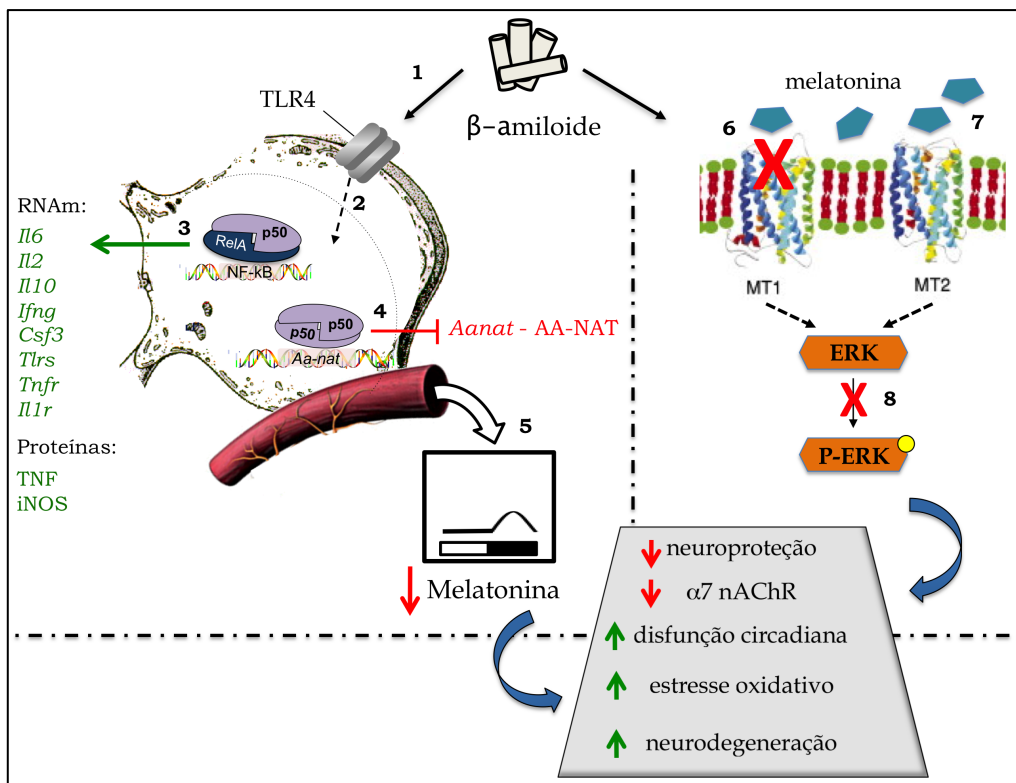
Por fim, o fato de a inibição da produção de melatonina ter sido observada com baixas concentrações de  $A\beta_{1-40}$  (0,03  $\mu$ M) pode significar que a glândula pineal é capaz de detectar as primeiras alterações moleculares vinculadas ao desenvolvimento de AD, o que está de acordo com a detecção de queda na produção de melatonina nos estágios iniciais assintomáticos da doença (Wu *et al.*, 2003). Este dado da ação direta de  $A\beta$  sobre a pineal reforça, portanto, a sugestão de que essa medida hormonal possa compor um biomarcador, em conjunto com outros fatores, de relevância ao estabelecimento de protocolos para diagnóstico precoce de AD, ainda inexistentes.

#### 4. Considerações finais

Os dados obtidos no presente trabalho indicam que o sistema melatonérgico é um alvo direto do peptídeo  $\beta$ -amiloide. Atuando sobre a glândula pineal, tanto  $A\beta_{1-40}$  quanto  $A\beta_{1-42}$  inibem a produção de melatonina. O mecanismo de ação de  $A\beta_{1-40}$  nesta inibição envolve a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, o que resulta em diminuição da transcrição gênica e fosforilação da enzima AA-NAT, sem alteração na expressão da enzima HIOMT. Concomitantemente, esta ativação de NF- $\kappa$ B induz uma resposta inflamatória na glândula pineal, que passa a expressar uma grande variedade de proteínas envolvidas na sinalização e propagação desta resposta inflamatória. Além disso, é possível que este efeito observado com estimulação aguda de  $A\beta$  torne-se crônico, na medida em que induz a expressão de diversas outras moléculas inflamatórias que também são capazes de inibir a produção de melatonina. Complementarmente, foi observado que os receptores de melatonina

também são alvos diretos de A $\beta$ . A disponibilidade do receptor MT<sub>1</sub> é diminuída na presença de A $\beta$ <sub>1-42</sub>, enquanto que a sinalização pela P-ERK1/2 evocada pela ativação tanto de MT<sub>1</sub> quanto de MT<sub>2</sub> é inibida por ambos fragmentos de A $\beta$ . Nas condições testadas, a formação de dímeros entre esses receptores não é afetada por A $\beta$ , embora tais dados ainda precisem ser confirmados em situações de expressão endógena dos receptores e também com relação a outros receptores passíveis de formar complexos diméricos com os MTRs. Os resultados obtidos estão esquematizados na figura 20, onde consta também alguns dados da literatura e as hipóteses discutidas com relação às consequências da inibição do sistema melatonérgico por A $\beta$ .

Em suma, tais dados proporcionam um melhor entendimento dos mecanismos moleculares relacionados à disfunção do sistema melatonérgico, bem documentada em pacientes com AD, demonstrando pela primeira vez que os peptídeos A $\beta$  atuam diretamente sobre os componentes deste sistema e compromete suas funções. Além disso, esses resultados propõem ainda uma reflexão sobre o uso terapêutico da melatonina, cuja eficácia parece depender de uma intervenção precoce, ainda nos primeiros estágios de AD. Para isso, faz-se necessário ainda o desenvolvimento de métodos diagnóstico capazes de detectar as primeiras alterações moleculares relacionadas à AD e, também neste caso, o uso da melatonina como um dos possíveis biomarcadores também é promissor.



**Figura 20 - Esquema ilustrativo dos efeitos de Aβ sobre o sistema melatonérgico.** 1) Aβ ativa receptores TLR4 na glândula pineal, induzindo cascatas de sinalização intracelular (2) que resultam na translocação nuclear de NF-κB. 3) Dímeros p50/RelA ativados por Aβ<sub>1-40</sub> na pineal induzem a transcrição de diversos genes inflamatórios, tais como os que codificam as citocinas IL-6, IL-2, IL-10, IFN-γ, G-CSF e os receptores TLR, TNFR e IL-1R. A expressão proteica de TNF e iNOS também é aumentada nas pineais incubadas com Aβ<sub>1-40</sub>. 4) Dímeros de NF-κB p50/p50 inibem a expressão gênica de *Aanat*, resultando em menor expressão e ativação desta enzima-chave à síntese de melatonina. 5) Pineais incubadas tanto Aβ<sub>1-40</sub> quanto Aβ<sub>1-42</sub> produzem menos melatonina, o que leva à diminuição na concentração plasmática deste hormônio. 6) Aβ<sub>1-42</sub> reduz a ligação de melatonina ao receptor MT<sub>1</sub>, mas não interfere na ligação à MT<sub>2</sub> (7). A ativação de MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub> por melatonina ativa a via de sinalização da ERK1/2 resultando em aumento de ERK1/2 fosforilada (P-ERK1/2), e tanto Aβ<sub>1-40</sub> quanto Aβ<sub>1-42</sub> inibem esse aumento de P-ERK (8). A disfunção do sistema melatonérgico pode ter consequências relevantes ao desenvolvimento de AD, tais como disfunção circadiana generalizada, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, diminuição dos processos neuroprotetores e diminuição da funcionalidade de receptores nACh α7. Por fim, todos esses aspectos podem favorecer os processos neurodegenerativos e contribuir para a instalação e progressão de AD.

## CONCLUSÕES

*De certo modo tudo deve estar sendo o que é (...). Que começa no que nunca começou porque sempre era? E era antes de sempre? Ligo-me a esta ausência vital e rejuvenesço-me todo (...). Redondo sem início nem fim, eu sou o ponto antes do zero e do ponto final\*.*

Clarice Lispector



## CONCLUSÕES

O presente trabalho possibilitou as seguintes conclusões:

- 1) O peptídeo A $\beta$  interage com a membrana plasmática de pinealócitos;
- 2) Tanto A $\beta_{1-40}$  quanto A $\beta_{1-42}$  inibem a produção de melatonina pela glândula pineal por inibir a expressão gênica e fosforilação da enzima AA-NAT;
- 3) A cascata de sinalização intracelular desencadeada por A $\beta_{1-40}$  na glândula pineal resulta em ativação da via NF- $\kappa$ B, com translocação nuclear dos dímeros p50/p50 e p50/RelA;
- 4) Inibição da atividade de NF- $\kappa$ B impede o efeito inibitório de A $\beta_{1-40}$  sobre a produção de melatonina pela pineal;
- 5) A $\beta_{1-40}$  induz a expressão de uma grande variedade de genes inflamatórios relacionados à via TLR/NF- $\kappa$ B, como interleucinas e enzimas;
- 6) A $\beta_{1-42}$  reduz a disponibilidade de receptores MT<sub>1</sub>, mas não de MT<sub>2</sub>, em células HEK293;
- 7) Tanto A $\beta_{1-40}$  quanto A $\beta_{1-42}$  inibem a sinalização pela via da ERK1/2 desencadeada pela ativação de MT<sub>1</sub> ou MT<sub>2</sub> por melatonina em células HEK293 e em cultura de células primária endoteliais;
- 8) Os mecanismos de ação de A $\beta$  sobre a ligação de melatonina ao receptor MT<sub>1</sub> e sobre a sinalização da melatonina por ambos receptores, nas células HEK293, não envolve alterações na formação de homo- ou heterodímeros entre MT<sub>1</sub> ou MT<sub>2</sub>.

## *RESUMO*

A doença de Alzheimer (AD) é a doença neurodegenerativa relacionada ao envelhecimento mais frequente no mundo. Uma das características moleculares de AD é a produção exacerbada de peptídeos beta-amiloide ( $A\beta$ ), principalmente dos fragmentos de 40 e 42 aminoácidos ( $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{1-42}$ ).  $A\beta$  induz respostas neuroinflamatórias e alterações moleculares relacionadas à perda sináptica e morte neuronal. Diversos relatos mostram que pacientes de AD apresentam redução na concentração plasmática de melatonina, hormônio produzido pela glândula pineal e também alteração na expressão dos receptores de melatonina, mas os mecanismos envolvidos ainda não são conhecidos. De acordo com o conceito do eixo imune-pineal, agentes inflamatórios são capazes de atuar diretamente sobre a glândula pineal e inibir a síntese de melatonina. No presente estudo investigamos, portanto, se o peptídeo  $A\beta$  atua diretamente sobre o sistema melatonérgico, modulando a síntese de melatonina ou a função de seus receptores. Pineais em cultura tratadas com  $A\beta_{1-40}$  ou  $A\beta_{1-42}$  apresentaram redução na produção de melatonina.  $A\beta_{1-40}$  ativou a via do fator de transcrição NF- $\kappa$ B na pineal, resultando em aumento da transcrição de diversos genes inflamatórios, como interleucinas e quimiocinas, e inibição da expressão da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase, essencial à síntese de melatonina. Em células HEK293 expressando estavelmente receptores  $MT_1$  ou  $MT_2$  recombinantes, a ativação da via ERK1/2 pela melatonina foi inibida tanto por  $A\beta_{1-40}$  quanto por  $A\beta_{1-42}$ . O mesmo efeito inibitório foi observado em células endoteliais primárias que expressam  $MT_1$  e  $MT_2$  constitutivamente. O presente trabalho mostra que a síntese de melatonina pela pineal e a função dos receptores de melatonina são diretamente regulados por  $A\beta$ , o que amplia nossos conhecimentos a respeito dos efeitos prejudiciais de  $A\beta$ . Considerando que a melatonina tem propriedades neuroprotetora e antioxidante, a disfunção do sistema melatonérgico pode contribuir para os processos neurodegenerativos que ocorrem na patologia de AD.

# *ABSTRACT*

Alzheimer's disease (AD) is the most common age-related neurodegenerative disorder worldwide. Excess of amyloid beta peptides ( $A\beta$ ), composed mainly by 40 and 42 aminoacids-long fragments ( $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{1-42}$ ) is a molecular hallmark in AD.  $A\beta$ -induced neuroinflammatory responses and molecular changes are related to synapse impairment and neuronal loss. It is well documented that AD patients show impaired melatonin synthesis, the pineal gland-derived hormone, and altered expression of melatonin receptors, but the underlying mechanisms remain unclear. According to the immune-pineal axis concept, inflammatory mediators act on the pineal gland, leading to inhibition of melatonin synthesis. Therefore, in the present study we sought to investigate whether  $A\beta$  directly targets the melatonergic system, modulating melatonin synthesis and/or melatonin receptors function. Pineal glands cultured in the presence of  $A\beta_{1-40}$  or  $A\beta_{1-42}$  showed reduced melatonin production.  $A\beta_{1-40}$  activated the nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) pathway in the pineal gland, leading to up-regulation of several inflammatory genes, as interleukins and chemokines, and inhibition of the arylalkylamine N-acetyltransferase enzyme expression, the key enzyme in melatonin synthesis. In HEK293 cells stably expressing recombinant melatonin  $MT_1$  or  $MT_2$  receptors melatonin-induced ERK1/2 activation was markedly impaired by  $A\beta_{1-40}$  and  $A\beta_{1-42}$ . Similar results were obtained in primary culture of endothelial cells expressing melatonin receptors endogenously. The present study shows that melatonin synthesis and melatonin receptors function are directly impaired by  $A\beta$ , thus extending our understanding on the detrimental effects of  $A\beta$ . Because melatonin shows neuroprotective and antioxidant properties, impairment of the melatonergic system may contribute to the neurodegenerative processes that take place in AD.

## REFERÊNCIAS

*É um erro terrível teorizar antes de termos informação. Insensivelmente se começa a torcer os fatos para atender às teorias, em vez de teorias de acordo com os fatos.*

Arthur Conan Doyle

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, N. J. (2013). Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J Inherit Metab Dis*, **36**: 437-449.
- ABDALLA, S., LOTHER, H. & QUITTERER, U. (2000). AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature*, **407**: 94-98.
- ABDALLA, S., LOTHER, H., EL MISSIRY, A., LANGER, A., SERGEEV, P., EL FARAMAWY, Y. & QUITTERER, U. (2009a). Angiotensin II AT2 receptor oligomers mediate G-protein dysfunction in an animal model of Alzheimer disease. *J Biol Chem*, **284**: 6554-6565.
- ABDALLA, S., LOTHER, H., EL MISSIRY, A., SERGEEV, P., LANGER, A., EL FARAMAWY, Y. & QUITTERER, U. (2009b). Dominant negative AT2 receptor oligomers induce G-protein arrest and symptoms of neurodegeneration. *J Biol Chem*, **284**: 6566-6574.
- ACKERMANN, K. & STEHLE, J. H. (2006). Melatonin synthesis in the human pineal gland: advantages, implications, and difficulties. *Chronobiol Int*, **23**: 369-379.
- ADLER, M. W. & ROGERS, T. J. (2005). Are chemokines the third major system in the brain? *J Leukoc Biol*, **78**: 1204-1209.
- AGUZZI, A., BARRES, B. A. & BENNETT, M. L. (2013). Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science*, **339**: 156-161.
- AKIYAMA, H., BARGER, S., BARNUM, S., BRADT, B., BAUER, J., COLE, G. M., COOPER, N. R., EIKELBOOM, P., EMMERLING, M., FIEBICH, B. L., FINCH, C. E., FRAUTSCHY, S., GRIFFIN, W. S., HAMPEL, H., HULL, M., LANDRETH, G., *et al.* (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **21**: 383-421.
- AKPINAR, Z., TOKGÖZ, S., GÖKBEL, H., OKUDAN, N., UĞUZ, F. & YILMAZ, G. (2008). The association of nocturnal serum melatonin levels with major depression in patients with acute multiple sclerosis. *Psychiatry Res*, **161**: 253-257.
- ANANDATHEERTHAVARADA, H. K., BISWAS, G., ROBIN, M. A. & AVADHANI, N. G. (2003). Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *J Cell Biol*, **161**: 41-54.
- ANISIMOV, V. N., POPOVICH, I. G., ZABEZHINSKI, M. A., ANISIMOV, S. V., VESNUSHKIN, G. M. & VINOGRADOVA, I. A. (2006). Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochim Biophys Acta*, **1757**: 573-89.
- APELT, J. & SCHLIEBS, R. (2001). Beta-amyloid-induced glial expression of both pro- and anti-inflammatory cytokines in cerebral cortex of aged transgenic Tg2576 mice with Alzheimer plaque pathology. *Brain Res*, **894**: 21-30.
- ARENDRT, J., DEACON, S., ENGLISH, J., HAMPTON, S. & MORGAN, L. (1995). Melatonin and adjustment to phase shift. *J Sleep Res*, **4**: 74-79.
- AXELROD J. & WEISSBACH H. (1961). Purification and properties of hydroxyindole-O-methyl transferase. *J. Biol. Chem.*, **236**: 211-213.

- AXELROD, J. (1974). The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science*, **184**: 1341-1348.
- AYDIN, D., WEYER, S. W. & MÜLLER, U. C. (2012). Functions of the APP gene family in the nervous system: insights from mouse models. *Exp Brain Res*, **217**: 423-434.
- AYOUB, M. A., COUTURIER, C., LUCAS-MEUNIER, E., ANGERS, S., FOSSIER, P., BOUVIER, M. & JOCKERS, R. (2002). Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem*, **277**: 21522-21528.
- AYOUB, M. A., LEVOYE, A., DELAGRANGE, P. & JOCKERS, R. (2004). Preferential formation of MT1/MT2 melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared with MT2 homodimers. *Mol Pharmacol*, **66**: 312-321.
- AZIZ, N. A., PIJL, H., FRÖLICH, M., SCHRÖDER-VAN DER ELST, J. P., VAN DER BENT, C., ROELFSEMA, F. & ROOS, R. A. (2009). Delayed onset of the diurnal melatonin rise in patients with Huntington's disease. *J Neurol*, **256**: 1961-1965.
- BABA, K., BENLEULMI-CHAACHOUA, A., JOURNÉ, A. S., KAMAL, M., GUILLAUME, J. L., DUSSAUD, S., GBAHOU, F., YETTOU, K., LIU, C., CONTRERAS-ALCANTARA, S., JOCKERS, R. & TOSINI, G. (2013). Heteromeric MT1/MT2 melatonin receptors modulate photoreceptor function. *Sci Signal*, **6**: ra89.
- BACART J., CORBEL C., JOCKERS R., BACH S. & COUTURIER C. (2008). The BRET technology and its application to screening assays. *Biotechnol J*. **3**: 311-324.
- BAEUEERLE P.A. & BALTIMORE D. (1996). NF- $\kappa$ B: Ten Years After. *Cell*, **87**: 13-20.
- BALER R., COVINGTON S. & KLEIN D.C. (1997). The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter: cAMP activation via a cAMP-responsive element-CCAAT complex. *J. Biol. Chem.*, **272**: 6979-6985.
- BALES, K. R., DU, Y., DODEL, R. C., YAN, G. M., HAMILTON-BYRD, E. & PAUL, S. M. (1998). The NF-kappaB/Rel family of proteins mediates Abeta-induced neurotoxicity and glial activation. *Brain Res Mol Brain Res*, **57**: 63-72.
- BARRETT, P., MACLEAN, A., DAVIDSON, G. & MORGAN, P. J. (1996). Regulation of the Mel 1a melatonin receptor mRNA and protein levels in the ovine pars tuberalis: evidence for a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-independent Mel 1a receptor coupling and an autoregulatory mechanism of expression. *Mol Endocrinol*, **10**: 892-902.
- BECHMANN I., GALEA I. & PERRY V. H. (2007). What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol*, **28**: 5-11.
- BEDROSIAN, T. A. & NELSON, R.J. (2012). Pro: Alzheimer's disease and circadian dysfunction: chicken or egg? *Alzheimers Res Ther*, **4**: 25-27.
- BENI, S. M., KOHEN, R., REITER, R. J., TAN, D. X. & SHOHAMI, E. (2004). Melatonin-induced neuroprotection after closed head injury is associated with increased brain antioxidants and attenuated late-phase activation of NF-kappaB and AP-1. *FASEB J*, **18**: 149-151.



- BENÍTEZ-KING G. (2006). Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res*, **40**: 1-9.
- 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.
- BERTHELOT, K., CULLIN, C. & LECOMTE, S. (2013). What does make an amyloid toxic: morphology, structure or interaction with membrane? *Biochimie*, **95**: 12-19.
- 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 Neurosci*, **22**: 8466-8475.
- BIANCHI, M. E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*, **81**: 1-5.
- BLASK, D. E., DAUCHY, R. T. & SAUER, L. A. (2005). Putting cancer to sleep at night: the neuroendocrine/circadian melatonin signal. *Endocrine*, **27**: 179-188.
- BLASK, D. E., SAUER, L. A. & DAUCHY, R. T. (2002). Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Curr Top Med Chem*, **2**: 113-132.
- BLOCK, K. I., KOCH, A. C., MEAD, M. N., TOTHY, P. K., NEWMAN, R. A. & GYLLENHAAL, C. (2008). Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic toxicity: a systematic review of the evidence from randomized controlled trials. *Int J Cancer*, **123**: 1227-1239.
- BORDET, R., DEVOS, D., BRIQUE, S., TOUITOU, Y., GUIEU, J. D., LIBERSA, C. & DESTÉE, A. (2003). Study of circadian melatonin secretion pattern at different stages of Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol*, **26**: 65-72.
- BOSSY-WETZEL, E., SCHWARZENBACHER, R. & LIPTON, S. A. (2004). Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med*, **10 Suppl**: S2-S9.
- BOWMAN, C. C., RASLEY, A., TRANGUCH, S. L. & MARRIOTT, I. (2003). Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia*, **43**: 281-291.
- BRAAK, H. & BRAAK, E. (1995). Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging*, **16**: 271-278.
- BROWN, A. M. & RANSOM, B. R. (2007). Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*, **55**: 1263-1271.
- BRUCK, R., AEED, H., AVNI, Y., SHIRIN, H., MATAS, Z., SHAHMUROV, M., AVINOACH, I., ZOZULYA, G., WEIZMAN, N. & HOCHMAN, A. (2004). Melatonin inhibits nuclear factor kappa B activation and oxidative stress and protects against thioacetamide induced liver damage in rats. *J Hepatol*, **40**: 86-93.

- BRUNNER, P., SOZER-TOPÇULAR, N., JOCKERS, R., RAVID, R., ANGELONI, D., FRASCHINI, F., ECKERT, A., MULLER-SPAHN, F. & SAVASKAN, E. (2006). Pineal and cortical melatonin receptors MT1 and MT2 are decreased in Alzheimer's disease. *Euro J Histochem*, **50**: 311-316.
- BRUSCO, L. I., MÁRQUEZ, M. & CARDINALI, D. P. (1998). Monozygotic twins with Alzheimer's disease treated with melatonin: Case report. *J Pineal Res*, **25**: 260-263.
- BRUSCO, L. I., MÁRQUEZ, M. & CARDINALI, D. P. (2000). Melatonin treatment stabilizes chronobiologic and cognitive symptoms in Alzheimer's disease. *Neuro Endocrinol Lett*, **21**: 39-42.
- BRYDON L., ROKA F., PETIT L., DE COPPET P., TISSOT M., BARRETT P., MORGAN P. J., NANOFF C., STROSBURG A. D. & JOCKERS R. (1999). Dual signaling of human Mel<sub>1a</sub> melatonin receptors via G<sub>i2</sub>, G<sub>i3</sub>, and G<sub>q/11</sub> proteins. *Mol Endocrinol*, **13**: 2025-2038.
- BUDA, M. & KLEIN, D. C. (1978). A suspension culture of pinealocytes: regulation of N-acetyltransferase activity. *Endocrinology*, **103**: 1483-1493.
- CÁRDENAS A. M., ARDILES A. O., BARRAZA N., BAÉZ-MATUS X. & CAVIEDES P. (2012). Role of tau protein in neuronal damage in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Arch Med Res*, **43**: 645-654.
- CARDINALI, D. P., FURIO, A. M. & BRUSCO, L. I. (2010). Clinical aspects of melatonin intervention in Alzheimer's disease progression. *Curr Neuropharmacol*, **8**: 218-227.
- CARNEIRO, R. C., CIPOLLA-NETO, J. & MARKUS, R. P. (1991). Diurnal variation of the rat vas deferens contraction induced by stimulation of presynaptic nicotinic receptors and pineal function. *J Pharmacol Exp Ther*, **259**: 614-619.
- CARRILLO-VICO, A., GUERRERO, J. M., LARDONE, P. J. & REITER, R. J. (2005). A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine*, **27**: 189-200.
- CARRILLO-VICO, A., LARDONE, P. J., ALVAREZ-SÁNCHEZ, N., RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, A. & GUERRERO, J. M. (2013). Melatonin: buffering the immune system. *Int J Mol Sci*, **14**: 8638-8683.
- CARRILLO-VICO, A.; GARCIA-MAURINO, S.; CALVO, J.R.; GUERRERO, J.M. (2003). Melatonin counteracts the inhibitory effect of PGE2 on IL-2 production in human lymphocytes via its mt1 membrane receptor. *FASEB J*, **17**: 755-757.
- CARVALHO-SOUSA, C. E., DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S., TAMURA, E. K., FERNANDES, P. A., PINATO, L., MUXEL, S. M., CECON, E. & MARKUS, R. P. (2011). Molecular basis for defining the pineal gland and pinealocytes as targets for tumor necrosis factor. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **2**: 10-20.
- CASSONE, V. M. (2014). Avian circadian organization: a chorus of clocks. *Front Neuroendocrinol*, **35**: 76-88.
- CATAPANO, F., MONTELEONE, P., FUSCHINO, A., MAJ, M. & KEMALI, D. (1992). Melatonin and cortisol secretion in patients with primary obsessive-compulsive disorder.

- Psychiatry Res*, **44**: 217-225.
- CAVALLUCCI V., D'AMELIO M. & CECCONI F. (2012). A $\beta$  toxicity in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*, **45**: 366-378.
- CECON, E. & MARKUS, R. P. (2011). Relevance of the chronobiological and non-chronobiological actions of melatonin for enhancing therapeutic efficacy in neurodegenerative disorders. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*, **5**: 91-99.
- CECON, E., FERNANDES, P. A., PINATO, L., FERREIRA, Z. S. & MARKUS, R. P. (2010). Daily variation of constitutively activated nuclear factor kappa B (NF $\kappa$ B) in rat pineal gland. *Chronobiol Int*, **27**: 52-67.
- CHAN A. S., LAI F. P., LO R. K., VOYNO-YASENETSKAYA T. A., STANBRIDGE E. J. & WONG Y. H. (2002). Melatonin mt<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cell Signal.*, **14**: 249-257
- CHEN, L., YAMADA, K., NABESHIMA, T. & SOKABE, M. (2006).  $\alpha$ 7 Nicotinic acetylcholine receptor as a target to rescue deficit in hippocampal LTP induction in beta-amyloid infused rats. *Neuropharmacology*, **50**: 254-268.
- CHEN, S.F., FEI, X. & LI, S.H. (1995). A new simple method of isolation of microvascular endothelial cells avoiding both chemical and mechanical injuries. *Microvasc Res*, **50**: 119-128.
- CHENG, Y., FENG, Z., ZHANG, Q. Z. & ZHANG, J. T. (2006). Beneficial effects of melatonin in experimental models of Alzheimer disease. *Acta Pharmacol Sin*, **27**: 129-139.
- CHOONARA, Y. E., PILLAY, V., DU TOIT, L. C., MODI, G., NAIDOO, D., NDESENDO, V. M. & SIBAMBO, S. R. (2009). Trends in the molecular pathogenesis and clinical therapeutics of common neurodegenerative disorders. *Int J Mol Sci*, **10**: 2510-2557.
- CHROMY, B. A., NOWAK, R. J., LAMBERT, M. P., VIOLA, K. L., CHANG, L., VELASCO, P. T., JONES, B. W., FERNANDEZ, S. J., LACOR, P. N., HOROWITZ, P., FINCH, C. E., KRAFFT, G. A. & KLEIN, W. L. (2003). Self-assembly of A $\beta$ (1-42) into globular neurotoxins. *Biochemistry*, **42**: 12749-12760.
- CIRRITO, J. R., YAMADA, K. A., FINN, M. B., SLOVITER, R. S., BALES, K. R., MAY, P. C., SCHOEPP, D. D., PAUL, S. M., MENNERICK, S. & HOLTZMAN, D. M. (2005). Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron*, **48**: 913-922.
- CONTI, A., CONCONI, S., HERTENS, E., SKWARLO-SONTA, K., MARKOWSKA, M. & MAESTRONI, J. M. (2000). Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res*, **28**: 193-202.
- COUTO-MORAES R., PALERMO-NETO J. & MARKUS R.P. (2009). The Immune-Pineal Axis: Stress as a Modulator of Pineal Gland Function. *Neuroimmunomodulation: Ann NY Acad Sci*, **1153**: 193-202.
- COUTURIER, C. & JOCKERS, R. (2003). Activation of the leptin receptor by a ligand-induced conformational change of constitutive receptor dimers. *J Biol Chem*, **278**: 26604-

- 26611.
- COWBURN, R. F., O'NEILL, C., RAVID, R., ALAFUZOFF, I., WINBLAD, B. & FOWLER, C. J. (1992). Adenylyl cyclase activity in postmortem human brain: evidence of altered G protein mediation in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, **58**: 1409-1419.
- COYLE, J. T., PRICE, D. L. & DELONG, M. R. (1983). Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*, **219**: 1184-1190.
- CSABA G. & BARÁTH P. (1975). Morphological changes of thymus and the thyroid gland after postnatal extirpation of pineal body. *Endocrinol Exp*, **9**: 59-67.
- DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S., CARVALHO-SOUSA, C. E., TAMURA, E. K., PINATO, L., CECON, E., FERNANDES, P. A., DE AVELLAR, M. C., FERREIRA, Z. S. & MARKUS, R. P. (2010). TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFKB pathway. *J Pineal Res*, **49**: 183-192.
- DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S., PINATO, L., TAMURA, E. K., CARVALHO-SOUSA, C. E. & MARKUS, R. P. (2012). Glia-pinealocyte network: the paracrine modulation of melatonin synthesis by tumor necrosis factor (TNF). *PLoS One*, **7**: e40142.
- DAHLGREN, K. N., MANELLI, A. M., STINE, W. B., BAKER, L. K., KRAFFT, G. A. & LADU, M. J. (2002). Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem*, **277**: 32046-32053.
- DANDY, W. E. (1915). Extirpation of the pineal body. *J Exp Med*, **22**: 237-246.
- DE ALMEIDA-PAULA, L. D., COSTA-LOTUFO, L. V., SILVA FERREIRA, Z., MONTEIRO, A. E., 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.
- DE OLIVEIRA TATSCH-DIAS, M., LEVANDOVSKI, R. M., CUSTÓDIO DE SOUZA, I. C., GREGIANIN ROCHA, M., MAGNO FERNANDES, P. A., TORRES, I. L., HIDALGO, M. P., MARKUS, R. P. & CAUMO, W. (2013). The concept of the immune-pineal axis tested in patients undergoing an abdominal hysterectomy. *Neuroimmunomodulation*, **20**: 205-212.
- DOMÍNGUEZ-LÓPEZ, S., HOWELL, R., GOBBI, G. (2012). Characterization of serotonin neurotransmission in knockout mice: implications for major depression. *Rev Neurosci*, **23**: 429-443.
- DOWLING, G. A., BURR, R. L., VAN SOMEREN, E. J., HUBBARD, E. M., LUXENBERG, J. S., MASTICK, J. & COOPER, B. A. (2008). Melatonin and bright-light treatment for rest-activity disruption in institutionalized patients with Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc*, **56**: 239-246.
- DRAGICEVIC, N., COPES, N., O'NEAL-MOFFITT, G., JIN, J., BOZZEO, R., MAMCARZ, M., TAN, J., CAO, C., OLCESE, J., ARENDASH, G.W. & BRADSHAW, P.C. (2011). Melatonin treatment restores mitochondrial function in Alzheimer's mice. A mitochondrial protective role of melatonin membrane receptor signaling. *J Pineal Res*, **51**: 75-86.
- DRAKE, M. T., SHENOY, S. K. & LEFKOWITZ, R. J. (2006). Trafficking of G protein-coupled

- receptors. *Circ Res*, **99**: 570-582.
- DUBOCOVICH M. L., CARDINALI, D. P., DELAGRANGE, P., KRAUSE, D. N., STROBERG, A. D., SUDGEN D. & YOCCA F. D. (2000). Melatonin Receptors. *In: The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification*. 2nd Edition. Ed: D. Girdlestone, IUPHAR Media, London.
- DUBOCOVICH, M. L. (1985). Characterization of a retinal melatonin receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, **234**: 395-401.
- DUBOCOVICH, M. L. (1988). Pharmacology and function of melatonin receptors. *FASEB J*, **2**: 2765-2773.
- DUBOCOVICH, M. L. (1995). Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci*, **16**: 50-56.
- DUBOCOVICH, M. L. & MARKOWSKA, M. (2005). Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*, **27**: 101-110.
- DUBOCOVICH, M. L. & TAKAHASHI, J. S. (1987). Use of 2-[125I]iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**: 3916-3920.
- DUBOCOVICH, M. L., SHANKAR, G. & MICKEL, M. (1989). 2-[125I]iodomelatonin labels sites with identical pharmacological characteristics in chicken brain and chicken retina. *Eur J Pharmacol*, **162**: 289-299.
- DUFOURNY L., LEVASSEUR A., MIGAUD M., CALLEBAUT I., PONTAROTTI P., MALPAUX B. & MONGET P. (2008). GPR50 is the mammalian ortholog of Mel1c: evidence of rapid evolution in mammals. *BMC Evol Biol*, **8**: 105-118.
- DUNCAN, M. J., TAKAHASHI, J. S. & DUBOCOVICH, M. L. (1988). 2-[125I]iodomelatonin binding sites in hamster brain membranes: pharmacological characteristics and regional distribution. *Endocrinology*, **122**: 1825-1833.
- 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 U S A*, **91**: 6133-6137.
- EKSTRÖM P. & MEISSL H. (2003). Evolution of photosensory pineal organs in new light: the fate of neuroendocrine photoreceptors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **358**: 1679-1700.
- ESPINO, J., BEJARANO, I., PAREDES, S.D., GONZÁLEZ, D., BARRIGA, C., REITER, R.J., PARIENTE, J.A. & RODRIGUEZ, A.B. (2010). Melatonin counteracts alterations in oxidative metabolism and cell viability induced by intracellular calcium overload in human leucocytes: changes with age. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **107**: 590-597.
- ESPINO, J., RODRÍGUEZ, A. B. & PARIENTE, J. A. (2013). The inhibition of TNF- $\alpha$ -induced leucocyte apoptosis by melatonin involves membrane receptor MT1/MT2 interaction. *J Pineal Res*, **54**: 442-452.
- FALSIG J., LATTA M. & LEIST M. (2004). Defined inflammatory states in astrocyte cultures:

- Correlation with susceptibility towards CD95- driven apoptosis. *J Neurochem*, **88**: 181-193.
- FANGET, F., CLAUSRAT, B., DALERY, J., BRUN, J., TERRA, J. L., MARIE-CARDINE, M. & GUYOTAT, J. (1989). Nocturnal plasma melatonin levels in schizophrenic patients. *Biol Psychiatry*, **25**: 499-501.
- FASSBENDER, K., WALTER, S., KÜHL, S., LANDMANN, R., ISHII, K., BERTSCH, T., STALDER, A. K., MUEHLHAUSER, F., LIU, Y., ULMER, A. J., RIVEST, S., LENTSCHAT, A., GULBINS, E., JUCKER, M., STAUFENBIEL, M., BRECHTEL, K., *et al.* (2004). The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease. *FASEB J*, **18**: 203-205.
- FAUTECK, J., SCHMIDT, H., LERCHL, A., KURLEMANN, G. & WITTKOWSKI, W. (1999). Melatonin in epilepsy: first results of replacement therapy and first clinical results. *Biol Signals Recept*, **8**: 105-110.
- FENG, Z. & ZHANG, J. T. (2004a). Melatonin reduces amyloid beta-induced apoptosis in pheochromocytoma (PC12) cells. *J Pineal Res*, **37**: 257-266.
- FENG, Z. & ZHANG, J. T. (2004b). Protective effect of melatonin on beta-amyloid-induced apoptosis in rat astrogloma C6 cells and its mechanism. *Free Radic Biol Med*, **37**: 1790-1801.
- FENG, Z., CHANG, Y., CHENG, Y., ZHANG, B. L., QU, Z. W., QIN, C. & ZHANG, J. T. (2004a). Melatonin alleviates behavioral deficits associated with apoptosis and cholinergic system dysfunction in the APP 695 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Pineal Res*, **37**: 129-136.
- FENG, Z., CHENG, Y. & ZHANG, J. T. (2004b). Long-term effects of melatonin or 17 beta-estradiol on improving spatial memory performance in cognitively impaired, ovariectomized adult rats. *J Pineal Res*, **37**: 198-206.
- 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.
- FERREIRA, Z. S., CIPOLLA-NETO, J. & MARKUS R. P. (1994). Presence of P2-purinoceptors in the rat pineal gland. *Br J Pharmacol*, **112**: 107-110.
- FERREIRA, Z. S., FERNANDES P. A., DUMA D., ASSREUY J., AVELLAR M. C. & MARKUS R.P. (2005). Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa b. *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.

- FERTL, E., AUFF, E., DOPPELBAUER, A. & WALDHAUSER, F. (1991). Circadian secretion pattern of melatonin in Parkinson's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*, **3**: 41-47.
- FINOCCHIARO, L. M. & GLIKIN, G. C. (1998). Intracellular melatonin distribution in cultured cell lines. *J Pineal Res*, **24**: 22-34.
- FLYNN, D. D., WEINSTEIN, D. A. & MASH, D. C. (1991). Loss of high-affinity agonist binding to M1 muscarinic receptors in Alzheimer's disease: implications for the failure of cholinergic replacement therapies. *Ann Neurol*, **29**: 256-262.
- GAO, H. M., ZHOU, H., ZHANG, F., WILSON, B. C., KAM, W. & HONG, J. S. (2011). HMGB1 acts on microglia Mac1 to mediate chronic neuroinflammation that drives progressive neurodegeneration. *J Neurosci*, **31**: 1081-1092.
- GAUER, F., MASSON-PÉVET, M. & PÉVET, P. (1993). Melatonin receptor density is regulated in rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei by melatonin itself. *Brain Res*, **602**: 153-156.
- GEARY, G. G., KRAUSE, D. N. & DUCKLES, S. P. (1997). Melatonin directly constricts rat cerebral arteries through modulation of potassium channels. *Am J Physiol*, **273**: H1530-H1536.
- GEHRMAN, P. R., CONNOR, D. J., MARTIN, J. L., SHOCHAT, T., COREY-BLOOM, J. & ANCOLI-ISRAEL, S. (2009). Melatonin fails to improve sleep or agitation in double-blind randomized placebo-controlled trial of institutionalized patients with Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry*, **17**: 166-169.
- GERSHON, M.D. (2013). 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, **20**: 14-21.
- GHASEMI, R., ZARIFKAR, A., RASTEGAR, K., MAGHSOUDI, N. & MOOSAVI, M. (2014). Repeated intra-hippocampal injection of beta-amyloid 25-35 induces a reproducible impairment of learning and memory: Considering caspase-3 and MAPKs activity. *Eur J Pharmacol*, **726C**: 33-40.
- GHOSH S., MAY M.J. & KOPP E.B. (1998). NF- $\kappa$ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, **16**: 225-260.
- 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 NF $\kappa$ B activation. *FASEB J*, **12**: 685-693.
- GILMORE, T. D. & GERONDAKIS, S. (2011). The c-Rel Transcription Factor in Development and Disease. *Genes Cancer*, **2**: 695-711.
- GLASS, C. K., SAIJO, K., WINNER, B., MARCHETTO, M. C. & GAGE, F. H. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, **140**: 918-934.
- HANISCH, U. K. & KETTENMANN, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*, **10**: 1387-1394.

- HANSSON, E. & RÖNNBÄCK, L. (2003). Glial neuronal signaling in the central nervous system. *FASEB J*, **17**: 341-348.
- HARDELAND, R. (2009). Melatonin: signaling mechanisms of a pleiotropic agent. *Biofactors*, **35**: 183-192.
- HARDELAND, R. (2012). Melatonin in aging and disease - multiple consequences of reduced secretion, options and limits of treatment. *Aging Dis*, **3**: 194-225.
- HARDELAND, R. (2013). Chronobiology of melatonin beyond the feedback to the suprachiasmatic nucleus - consequences to melatonin dysfunction. *Int J Mol Sci*, **14**: 5817-5841.
- HARDELAND, R. & POEGGELER, B. (2003). Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res*, **34**: 233-241.
- HARDELAND, R., COTO-MONTES, A. & POEGGELER, B. (2003). Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms. *Chronobiol Int*, **20**: 921-962.
- HARDELAND, R., PANDI-PERUMAL, S. R. & CARDINALI, D. P. (2006). Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol*, **38**: 313-316.
- HARDY, J. & SELKOE, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, **297**: 353-356.
- HAUS E., LAKATUA D.J., SWOYER J. & SACKETT-LUNDEEN L. (1983). Chronobiology in hematology and immunology. *Am J Anat*, **168**: 467-517.
- HAYDEN M.S. & GHOSH S. (2008). Shared Principles in NF- $\kappa$ B Signaling. *Cell*, **132**: 344-362.
- HAYDEN, M. S. & GHOSH, S. (2012). NF- $\kappa$ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev*, **26**: 203-234.
- HE, Y., ZHENG, M. M., MA, Y., HAN, X. J., MA, X. Q., QU, C. Q. & DU, Y. F. (2012). Soluble oligomers and fibrillar species of amyloid  $\beta$ -peptide differentially affect cognitive functions and hippocampal inflammatory response. *Biochem Biophys Res Commun*, **429**: 125-130.
- HEWARD, C. B. & HADLEY, M. E. (1975). Structure-activity relationships of melatonin and related indoleamines. *Life Sci*, **17**: 1167-1177.
- HO L., PIERONI C., WINGER D., PUROHIT D.P., AISEN P.S. & PASINETTI G.M. (1999). Regional distribution of cyclooxygenase-2 in the hippocampal formation in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*, **57**: 295-303.
- HO, A. K., THOMAS, T. P., CHIK, C. L., ANDERSON, W. B. & KLEIN, D. C. (1988). Protein kinase C: subcellular redistribution by increased Ca<sup>2+</sup> influx. Evidence that Ca<sup>2+</sup>-dependent subcellular redistribution of protein kinase C is involved in potentiation of beta-adrenergic stimulation of pineal cAMP and cGMP by K<sup>+</sup> and A23187. *J Biol Chem*, **263**: 9292-9297.
- HOLM T. H., DRAEBY D. & OWENS T. (2012). Microglia are required for astroglial Toll-like receptor 4 response and for optimal TLR2 and TLR3 response. *Glia*, **60**: 630-638.



- HOPPE, J. B., FROZZA, R. L., HORN, A. P., COMIRAN, R. A., BERNARDI, A., CAMPOS, M. M., BATTASTINI, A. M. & SALBEGO, C. (2010). Amyloid-beta neurotoxicity in organotypic culture is attenuated by melatonin: involvement of GSK-3beta, tau and neuroinflammation. *J Pineal Res*, **48**: 230-238.
- HOSHINO, T., MURAO, N., NAMBA, T., TAKEHARA, M., ADACHI, H., KATSUNO, M., SOBUE, G., MATSUSHIMA, T., SUZUKI, T. & MIZUSHIMA, T. (2011). Suppression of Alzheimer's disease-related phenotypes by expression of heat shock protein 70 in mice. *J Neurosci*, **31**: 5225-5234.
- HUNT, A. E., AL-GHOUL, W. M., GILLETTE, M. U. & DUBOCOVICH, M. L. (2001). Activation of MT(2) melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. *Am J Physiol Cell Physiol*, **280**: C110-C118.
- INOUE S.T. & KAWAMURA H. (1979). Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**: 5962-5966.
- IUVONE, P. M., TOSINI, G., POZDEYEV, N., HAQUE, R., KLEIN, D. C. & CHAURASIA, S. S. (2005). Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. *Prog Retin Eye Res*, **24**: 433-456.
- JANÍČKOVÁ, H., RUDAJEV, V., ZIMČÍK, P., JAKUBÍK, J., TANILA, H., EL-FAKAHANY, E. E. & DOLEŽAL, V. (2013). Uncoupling of M1 muscarinic receptor/G-protein interaction by amyloid  $\beta$ (1-42). *Neuropharmacology*, **67**: 272-283.
- JEKABSONE, A., MANDER, P. K., TICKLER, A., SHARPE, M. & BROWN, G. C. (2006). Fibrillar beta-amyloid peptide Abeta1-40 activates microglial proliferation via stimulating TNF-alpha release and H2O2 derived from NADPH oxidase: a cell culture study. *J Neuroinflammation*, **3**: 24.
- JENSEN, C.J., MASSIE, A. & DE KEYSER J. (2013). Immune players in the CNS: the astrocyte. *J Neuroimmune Pharmacol*, **8**: 824-839.
- JEON, G. W., SUNG, D. K., JUNG, Y. J., KOO, S. H., CHOI, S. H., CHANG, Y. S., SIN, J. B. & PARK, W. S. (2011). Granulocyte colony stimulating factor attenuates hyperoxia-induced lung injury by down-modulating inflammatory responses in neonatal rats. *Yonsei Med J*, **52**: 65-73.
- JEONG, E. & LEE, J.Y. (2011). Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors. *Yonsei Med J*, **52**: 379-392.
- JOCKERS, R., MAURICE, P., BOUTIN, J. A. & DELAGRANGE, P. (2008). Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol*, **154**: 1182-1195.
- JOSEPH, J. A., CUTLER, R. & ROTH, G. S. (1993). Changes in G protein-mediated signal transduction in aging and Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*, **695**: 42-45.
- JUNG, B. & AHMAD, N. (2006). Melatonin in cancer management: progress and promise.

- Cancer Res*, **66**: 9789-9793.
- JÜRGENSEN, S. & FERREIRA, S. T. (2010). Nicotinic receptors, amyloid-beta, and synaptic failure in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci*, **40**: 221-229.
- KALINSKI, P. (2012). Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol*, **188**: 21-28.
- KALTSCHMIDT, B. & KALTSCHMIDT, C. (2000). Constitutive NF-kappa B activity is modulated via neuron-astroglia interaction. *Exp Brain Res*, **130**: 100-104.
- KALTSCHMIDT, B., WIDERA, D. & KALTSCHMIDT, C. (2005). Signaling via NF-kB in the nervous system. *Biochim Biophys Acta*, **1745**: 287-299.
- KALTSCHMIDT, B., UHEREK, M., WELLMANN, H., VOLK, B. & KALTSCHMIDT, C. (1999). Inhibition of NF-kappaB potentiates amyloid beta-mediated neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**: 9409-9414.
- KAMAL, M. & JOCKERS, R. (2011). Biological Significance of GPCR Heteromerization in the Neuro-Endocrine System. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **2**: 2.
- KAUPPINEN, A., SUURONEN, T., OJALA, J., KAARNIRANTA, K. & SALMINEN, A. (2013). Antagonistic crosstalk between NF-κB and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. *Cell Signal*, **25**: 1939-1948.
- KIM, D. & TSAI, L. H. (2009). Bridging physiology and pathology in AD. *Cell*, **137**: 997-1000.
- KIRKITADZE, M. D., BITAN, G. & TELOW, D. B. (2002). Paradigm shifts in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: the emerging role of oligomeric assemblies. *J Neurosci Res*, **69**: 567-577.
- KLEIN D. C., SUGDEN D. & WELLER J. L. (1983). Postsynaptic alpha-adrenergic receptors potentiate the beta-adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 599-603.
- KLEIN D. C. & WELLER J. L. (1970). Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science*, **169**: 1093-1095.
- KLEIN, D. C., COON, S. L., ROSEBOOM, P. H., WELLER, J. L., BERNARD, M., GASTEL, J. A., ZATZ, M., IUVONE, P. M., RODRIGUEZ, I. R., BÉGAY, V., FALCÓN, J., CAHILL, G. M., CASSONE, V. M. & BALER, R. (1997). The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Prog Horm Res*, **52**: 307-358.
- KONTUREK, S. J., KONTUREK, P. C., BRZOZOWSKI, T. & BUBENIK, G. A. (2007). Role of melatonin in upper gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol*, **58 Suppl 6**: 23-52.
- KUNZ, D., SCHMITZ, S., MAHLBERG, R., MOHR, A., STÖTER, C., WOLF, K. J. & HERRMANN, W. M. (1999). A new concept for melatonin deficit: on pineal calcification and melatonin excretion. *Neuropsychopharmacology*, **21**: 765-772.
- KVETNOY, I. M. (1999). Extrapineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system. *Histochem J*, **31**: 1-12.

- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- LAHIRI, D. K. (1999). Melatonin affects the metabolism of the beta-amyloid precursor protein in different cell types. *J Pineal Res*, **26**: 137-146.
- LAHIRI, D. K., CHEN, D., GE, Y. W., BONDY, S. C. & SHARMAN, E. H. (2004). Dietary supplementation with melatonin reduces levels of amyloid beta-peptides in the murine cerebral cortex. *J Pineal Res*, **36**: 224-231.
- LARSON, J., JESSEN, R. E., UZ, T., ARSLAN, A. D., KURTUNCU, M., IMBESI, M. & MANEV, H. (2006). Impaired hippocampal long-term potentiation in melatonin MT2 receptor-deficient mice. *Neurosci Lett*, **393**: 23-26.
- LAUDON, M., NIR, I. & ZISAPEL, N. (1988). Melatonin receptors in discrete brain areas of the male rat. Impact of aging on density and on circadian rhythmicity. *Neuroendocrinology*, **48**: 577-583.
- LEMMERS, B., SALMENA, L., BIDÈRE, N., SU, H., MATYSIAK-ZABLOCKI, E., MURAKAMI, K., OHASHI, P. S., JURISICOVA, A., LENARDO, M., HAKEM, R. & HAKEM, A. (2007). Essential role for caspase-8 in Toll-like receptors and NFkappaB signaling. *J Biol Chem*, **282**: 7416-7423.
- LERNER A. B, CASE J. D. & TAKAHASHI Y. (1960). Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *J Biol Chem*, **235**: 1992-1997.
- LERNER A. B., CASE J. O., TAKAHASHI Y., LEE T. H. & MORI W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc*, **80**: 2587.
- LEUNG, R., PROITSI, P., SIMMONS, A., LUNNON, K., GÜNTERT, A., KRONENBERG, D., PRITCHARD, M., TSOLAKI, M., MECOCCI, P., KLOSZEWSKA, I., VELLAS, B., SOININEN, H., WAHLUND, L. O. & LOVESTONE, S. (2013). Inflammatory proteins in plasma are associated with severity of Alzheimer's disease. *PLoS One*, **8**: e64971.
- LEVOYE, A., DAM, J., AYOUB, M. A., GUILLAUME, J. L., COUTURIER, C., DELAGRANGE, P. & JOCKERS, R. (2006). The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization. *EMBO J*, **25**: 3012-3023.
- LEZOUALCH, F., SPARAPANI, M. & BEHL, C. (1998). N-acetyl-serotonin (normelatonin) and melatonin protect neurons against oxidative challenges and suppress the activity of the transcription factor NF-kappaB. *J Pineal Res*, **24**: 168-178.
- LI, S. F., WU, M. N., WANG, X. H., YUAN, L., YANG, D. & QI, J. S. (2011). Requirement of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors for amyloid  $\beta$  protein-induced depression of hippocampal long-term potentiation in CA1 region of rats in vivo. *Synapse*, **65**: 1136-1143.
- LIN, L., HUANG, Q. X., YANG, S. S., CHU, J., WANG, J. Z. & TIAN, Q. (2013). Melatonin in Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci*, **14**: 14575-14593.
- LING, Z. Q., TIAN, Q., WANG, L., FU, Z. Q., WANG, X. C., WANG, Q. & WANG, J. Z.

- (2009). Constant illumination induces Alzheimer-like damages with endoplasmic reticulum involvement and the protection of melatonin. *J Alzheimers Dis*, **16**: 287-300.
- LISSONI, P., ROVELLI, F., MALUGANI, F., BUCOVEC, R., CONTI, A. & MAESTRONI, G. J. (2001). Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. *Neuro Endocrinol Lett*, **22**: 45-47.
- LIU Q., KAWAI H. & BERG D.K. (2001). Beta-amyloid peptide blocks the response of alpha 7-containing nicotinic receptors on hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**: 4734-4739.
- LIU, R. Y., ZHOU, J. N., VAN HEERIKHUIZE, J., HOFMAN, M. A. & SWAAB, D. F. (1999). Decreased melatonin levels in postmortem cerebrospinal fluid in relation to aging, Alzheimer's disease, and apolipoprotein E-epsilon4/4 genotype. *J Clin Endocrinol Metab*, **84**: 323-327.
- LIU, S. J. & WANG, J. Z. (2002). Alzheimer-like tau phosphorylation induced by wortmannin in vivo and its attenuation by melatonin. *Acta Pharmacol Sin*, **23**: 183-187.
- LIU, S., LEE, Y. F., CHOU, S., UNO, H., LI, G., BROOKES, P., MASSETT, M. P., WU, Q., CHEN, L. M. & CHANG, C. (2011). Mice lacking TR4 nuclear receptor develop mitochondrial myopathy with deficiency in complex I. *Mol Endocrinol*, **25**: 1301-1310.
- LOPES, C., DELYRA, J. L., MARKUS, R. P. & MARIANO M. (1997). Circadian rhythm in experimental granulomatous inflammation is modulated by melatonin. *J Pineal Res*, **23**: 72-78.
- LOPES, C., MARIANO, M. & MARKUS, R. P. (2001). Interaction between the adrenal and the pineal gland in chronic experimental inflammation induced by BCG in mice. *Inflamm Res*, **50**: 6-11.
- LOTUFO, C. M., LOPES, C., DUBOCOVICH, M. L., FARSKY, S. H. & MARKUS, R. P. (2001). Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur J Pharmacol*, **430**: 351-357.
- LOTUFO, C. M., YAMASHITA, C. E., FARSKY, S. H. & MARKUS, R. P. (2006). Melatonin effect on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B4. *Eur J Pharmacol*, **534**: 258-263.
- LUCHETTI, F., BETTI, M., CANONICO, B., ARCANGELETTI, M., FERRI, P., GALLI, F. & PAPA, S. (2009). ERK MAPK activation mediates the antiapoptotic signaling of melatonin in UVB-stressed U937 cells. *Free Radic Biol Med*, **46**: 339-351.
- LUCHETTI, F., CANONICO, B., BETTI, M., ARCANGELETTI, M., PILOLLI, F., PIRODDI, M., CANESI, L., PAPA, S. & GALLI, F. (2010). Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J*, **24**: 3603-3624.
- MA, Q. L., HARRIS-WHITE, M. E., UBEDA, O. J., SIMMONS, M., BEECH, W., LIM, G. P., TETER, B., FRAUTSCHY, S. A. & COLE, G. M. (2007). Evidence of Abeta- and transgene-dependent defects in ERK-CREB signaling in Alzheimer's models. *J Neurochem*, **103**: 1594-

- 1607.
- MACKENZIE, R. S., MELAN, M. A., PASSEY, D. K. & WITT-ENDERBY, P. A. (2002). Dual coupling of MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> melatonin receptors to cyclic AMP and phosphoinositide signal transduction cascades and their regulation following melatonin exposure. *Biochem Pharmacol*, **63**: 587-595.
- MAESTRONI, G. J. (2001). The immunotherapeutic potential of melatonin. *Expert Opin Investig Drugs*, **10**: 467-476.
- MAGRI, F., LOCATELLI, M., BALZA, G., MOLLA, G., CUZZONI, G., FIORAVANTI, M., SOLERTE, S. B. & FERRARI, E. (1997). Changes in endocrine circadian rhythms as markers of physiological and pathological brain aging. *Chronobiol Int*, **14**: 385-396.
- MAHLBERG, R., KUNZ, D., SUTEJ, I., KÜHL, K. P. & HELLWEG, R. (2004). Melatonin treatment of day-night rhythm disturbances and sundowning in Alzheimer disease: an open-label pilot study using actigraphy. *J Clin Psychopharmacol*, **24**: 456-459.
- MAHLBERG, R., WALTHER, S., KALUS, P., BOHNER, G., HAEDDEL, S., REISCHIES, F. M., KÜHL, K. P., HELLWEG, R. & KUNZ, D. (2008). Pineal calcification in Alzheimer's disease: an in vivo study using computed tomography. *Neurobiol Aging*, **29**: 203-209.
- MALDONADO, M. D., GARCIA-MORENO, H. & CALVO, J. R. (2013). Melatonin protects mast cells against cytotoxicity mediated by chemical stimuli PMACI: possible clinical use. *J Neuroimmunol*, **262**: 62-65.
- MARKUS, R. P. & FERREIRA, Z. S. (2011). The immune-pineal axis: The role of pineal and extra-pineal melatonin in modulating inflammation. *Adv Neuroimmune Biol*, **1**: 95-104.
- MARKUS, R. P., CECON, E. & PIRES-LAPA, M. A. (2013). Immune-Pineal Axis: Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) Mediates the Shift in the Melatonin Source from Pinealocytes to Immune Competent Cells. *Int J Mol Sci*, **14**: 10979-10997.
- MARKUS, R. P., FERREIRA, Z. S., FERNANDES, P. A. & 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. & RENO, L. A. (2003). Melatonin nocturnal surge modulates nicotinic receptors and nicotine-induced [3H]glutamate release in rat cerebellum slices. *J Pharmacol Exp Ther*, **305**: 525-530.
- MARKUS, R. P., SILVA, C. L., FRANCO, D. G., BARBOSA, E. M. & FERREIRA, Z. S. (2010). Is modulation of nicotinic acetylcholine receptors by melatonin relevant for therapy with cholinergic drugs? *Pharmacol Ther*, **126**: 251-262.
- MARKUS, R. P., ZAGO, W. M. & CARNEIRO, R. C. (1996). Melatonin modulation of presynaptic nicotinic acetylcholine receptors in the rat vas deferens. *J Pharmacol Exp Ther*, **279**: 18-22.
- MARKUS, R.P., BARBOSA-JUNIOR, E.J.M. & FERREIRA, Z.S. (2003). Ritmos biológicos: entendendo as horas, os dias e as estações do ano. *Revista Einstein*, **1**: 143-148.

- MAROSO, M., BALOSSO, S., RAVIZZA, T., LIU, J., ARONICA, E., IYER, A. M., ROSSETTI, C., MOLteni, M., CASALGRANDI, M., MANFREDI, A. A., BIANCHI, M. E. & VEZZANI, A. (2010). Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nat Med*, **16**: 413-419.
- MASANA, M. I., BENLOUCIF, S. & DUBOCOVICH, M. L. (2000). Circadian rhythm of mt1 melatonin receptor expression in the suprachiasmatic nucleus of the C3H/HeN mouse. *J Pineal Res*, **28**: 185-192.
- MASANA, M., DOOLEN, S., ERSAHIN, C., AL-GHOUL, W., DUCKLES, S., DUBOCOVICH, M. & KRAUSE, D. (2002). MT2 melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery. *J Pharmacol Exp Ther*, **302**: 1295–1302.
- MASILAMONI, J. G., JESUDASON, E. P., DHANDAYUTHAPANI, S., ASHOK, B. S., VIGNESH, S., JEBARAJ, W. C., PAUL, S. F. & JAYAKUMAR, R. (2008). The neuroprotective role of melatonin against amyloid beta peptide injected mice. *Free Radic Res*, **42**: 661-673.
- MATSUBARA, E., BRYANT-THOMAS, T., PACHECO-QUINTO, J., HENRY, T.L., PÖEGGELER, B., HERBERT, D., CRUZ-SANCHEZ, F., CHYAN, Y.J., SMITH, M.A., PERRY, G., *et al.* (2003). Melatonin increases survival and inhibits oxidative and amyloid pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, **85**: 1101–1108.
- MATTSON, M. P. & CAMANDOLA, S. (2001). NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J Clin Invest*, **107**: 247-254.
- MEDIAVILLA, M. D., SANCHEZ-BARCELO, E. J., TAN, D. X., MANCHESTER, L. & REITER, R. J. (2010). Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Curr Med Chem*, **17**: 4462-4481.
- MENAKER, M., MOREIRA, L. F. & TOSINI, G. (1997). Evolution of circadian organization in vertebrates. *Braz J Med Biol Res*, **30**: 305-313.
- MERCIER, J. F., SALAHPOUR, A., ANGERS, S., BREIT, A. & BOUVIER, M. (2002). Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem*, **277**: 44925-44931.
- MEXAL, S., HORTON, W. J., CROUCH, E. L., MAIER, S. I., WILKINSON, A. L., MARSOLEK, M. & STITZEL, J. A. (2012). Diurnal variation in nicotine sensitivity in mice: role of genetic background and melatonin. *Neuropharmacology*, **63**: 966-973.
- MILLER, S. C., PANDI-PERUMAL, S. R., PANDI, P. S., ESQUIFINO, A. I., CARDINALI, D. P. & MAESTRONI, G. J. (2006). The role of melatonin in immuno-enhancement: potential application in cancer. *Int J Exp Pathol*, **87**: 81-87.
- MISHIMA, K., TOZAWA, T., SATOH, K., MATSUMOTO, Y., HISHIKAWA, Y. & OKAWA, M. (1999). Melatonin secretion rhythm disorders in patients with senile dementia of Alzheimer's type with disturbed sleep-waking. *Biol Psychiatry*, **45**: 417-421.

- MITTAL, D., SACCHERI, F., VÉNÉREAU, E., PUSTERLA, T., BIANCHI, M. E. & RESCIGNO, M. (2010). TLR4-mediated skin carcinogenesis is dependent on immune and radioresistant cells. *EMBO J*, **29**: 2242-2252.
- MOHAN, N., SADEGHI, K., REITER, R. J. & MELTZ, M. L. (1995). The neurohormone melatonin inhibits cytokine, mitogen and ionizing radiation induced NF-kappa B. *Biochem Mol Biol Int*, **37**: 1063-1070.
- MØLLER M. & BAERES F.M. (2002). The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res*, **309**: 139-150.
- MONTELEONE, P., CATAPANO, F., DEL BUONO, G. & MAJ, M. (1994). Circadian rhythms of melatonin, cortisol and prolactin in patients with obsessive-compulsive disorder. *Acta Psychiatr Scand*, **89**: 411-415.
- MONTELEONE, P., MAJ, M., FUSCO, M., KEMALI, D. & REITER, R. J. (1992). Depressed nocturnal plasma melatonin levels in drug-free paranoid schizophrenics. *Schizophr Res*, **7**: 77-84.
- MONTELEONE, P., NATALE, M., LA ROCCA, A. & MAJ, M. (1997). Decreased nocturnal secretion of melatonin in drug-free schizophrenics: no change after subchronic treatment with antipsychotics. *Neuropsychobiology*, **36**: 159-163.
- MORAIS, C., GOBE, G., JOHNSON, D. W. & HEALY, H. (2011). The emerging role of nuclear factor kappa B in renal cell carcinoma. *Int J Biochem Cell Biol*, **43**: 1537-1549.
- MORERA-FUMERO, A. L. & ABREU-GONZALEZ, P. (2013). Role of melatonin in schizophrenia. *Int J Mol Sci*, **14**: 9037-9050.
- 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.
- MUCKE, L. (2009). Neuroscience: Alzheimer's disease. *Nature*, **461**: 895-897.
- MUCKE, L. & SELKOE, D. J. (2012). Neurotoxicity of amyloid  $\beta$ -protein: synaptic and network dysfunction. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **2**: a006338.
- MUXEL, S. M., PIRES-LAPA, M. A., MONTEIRO, A. W., CECON, E., TAMURA, E. K., FLOETER-WINTER, L. M. & MARKUS, R. P. (2012). NF- $\kappa$ B drives the synthesis of melatonin in RAW 264.7 macrophages by inducing the transcription of the arylalkylamine-N-acetyltransferase (AA-NAT) gene. *PLoS One*, **7**: e52010.
- NELSON D. E., IHEKWABA A. E., ELLIOTT M., JOHNSON J. R., GIBNEY C. A., FOREMAN B. E., NELSON G., SEE V., HORTON C. A., SPILLER D. G., *et al.* (2004). Oscillations in nf-kappab signaling control the dynamics of gene expression. *Science*, **306**: 704-708.
- NORDBERG, A. (2001). Nicotinic receptor abnormalities of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Biol Psychiatry*, **49**: 200-210.
- NORDEN, D. M. & GODBOUT, J. P. (2013). Review: microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *Neuropathol Appl Neurobiol*, **39**: 19-34.
- 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.
- O'NEILL, C., WIEHAGER, B., FOWLER, C. J., RAVID, R., WINBLAD, B. & COWBURN, R.F. (1994). Regionally selective alterations in G protein subunit levels in the Alzheimer's disease brain. *Brain Res*, **636**: 193-201.
- O'NEILL L.A. & KALTSCHMIDT C. (2007). NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci*, **20**: 252-258.
- OHASHI, Y., OKAMOTO, N., UCHIDA, K., IYO, M., MORI, N. & MORITA, Y. (1997). Differential pattern of the circadian rhythm of serum melatonin in young and elderly healthy subjects. *Biol Signals*, **6**: 301–306.
- OHASHI, Y., OKAMOTO, N., UCHIDA, K., IYO, M., MORI, N. & MORITA, Y. (1999). Daily rhythm of serum melatonin levels and effect of light exposure in patients with dementia of the Alzheimer's type. *Biol Psychiatry*, **45**: 1646-1652.
- OKSCHE, A. (1965). Survey of the development and comparative morphology of the pineal organ. *Prog Brain Res*, **10**: 3-29.
- OLCESE, J. M., CAO, C., MORI, T., MAMCARZ, M. B., MAXWELL, A., RUNFELDT, M. J., WANG, L., ZHANG, C., LIN, X., ZHANG, G. & ARENDASH, G. W. (2009). Protection against cognitive deficits and markers of neurodegeneration by long-term oral administration of melatonin in a transgenic model of Alzheimer disease. *J Pineal Res*, **47**: 82-96.
- OLIVIERI, G., HESS, C., SAVASKAN, E., LY, C., MEIER, F., BAYSANG, G., BROCKHAUS, M. & MÜLLER-SPAHN, F. (2001). Melatonin protects SHSY5Y neuroblastoma cells from cobalt-induced oxidative stress, neurotoxicity and increased beta-amyloid secretion. *J Pineal Res*, **31**: 320-325.
- PACCHIEROTTI, C., IAPICHINO, S., BOSSINI, L., PIERACCINI, F. & CASTROGIOVANNI, P. (2001). Melatonin in psychiatric disorders: a review on the melatonin involvement in psychiatry. *Front Neuroendocrinol*, **22**: 18-32.
- PALOP, J. J. & MUCKE, L. (2010). Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci*, **13**: 812-818.
- 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 J*, **273**: 2813-2838.
- PANDI-PERUMAL, S. R., BAHAMMAM, A. S., BROWN, G. M., SPENCE, D. W., BHARTI, V. K., KAUR, C., HARDELAND, R. & CARDINALI, D. P. (2013). Melatonin antioxidative defense: therapeutical implications for aging and neurodegenerative processes. *Neurotox Res*, **23**: 267-300.
- PAPPOLLA, M. A., SIMOVICH, M. J., BRYANT-THOMAS, T., CHYAN, Y. J., POEGGELER,



- B., DUBOCOVICH, M., BICK, R., PERRY, G., CRUZ-SANCHEZ, F. & SMITH, M. A. (2002). The neuroprotective activities of melatonin against the Alzheimer beta-protein are not mediated by melatonin membrane receptors. *J Pineal Res*, **32**: 135-142.
- PAPPOLLA, M., BOZNER, P., SOTO, C., SHAO, H., ROBAKIS, N. K., ZAGORSKI, M., FRANGIONE, B. & GHISO, J. (1998). Inhibition of Alzheimer beta-fibrillogenesis by melatonin. *J Biol Chem*, **273**: 7185-7188.
- PEDERSEN, E. B., FOX, L. M., CASTRO, A. J. & MCNULTY, J.A. (1993). Immunocytochemical and electron-microscopic characterization of macrophage/microglia cells and expression of class II major histocompatibility complex in the pineal gland of the rat. *Cell Tissue Res*, **272**: 257-265.
- PETTIT, D. L., SHAO, Z. & YAKEL, J. L. (2001). beta-Amyloid(1-42) peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice. *J Neurosci*, **21**: RC120.
- PINATO, L., DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S., FRANCO, D. G., CAMPOS, L. M., CECON, E., FERNANDES, P. A., BITTENCOURT, J. C. & MARKUS, R. P. (2014). Selective protection of the cerebellum against intracerebroventricular LPS is mediated by local melatonin synthesis. *Brain Struct Funct*, *in press*.
- PIRES-LAPA, M. A., TAMURA, E. K., SALUSTIANO, E. M. & MARKUS, R. P. (2013). Melatonin synthesis in human colostrum mononuclear cells enhances dectin-1-mediated phagocytosis by mononuclear cells. *J Pineal Res*, **55**: 240-246.
- POEGGELER, B., MIRAVALLE, L., ZAGORSKI, M. G., WISNIEWSKI, T., CHYAN, Y. J., ZHANG, Y., SHAO, H., BRYANT-THOMAS, T., VIDAL, R., FRANGIONE, B., GHISO, J. & PAPPOLLA, M. A. (2001). Melatonin reverses the profibrillogenic activity of apolipoprotein E4 on the Alzheimer amyloid A-beta peptide. *Biochemistry*, **40**: 14995-5001.
- POIREL, V. J., MASSON-PÉVET, M., PEVÉT, P. & GAUER, F. (2002). MT1 melatonin receptor mRNA expression exhibits a circadian variation in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Res*, **946**: 64-71.
- POMERANTZ, J. L. & BALTIMORE, D. (1999). NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. *EMBO J*, **18**: 6694-6704.
- PONTES, G. N., CARDOSO, E. C., CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. & MARKUS, R. P. (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.
- PONTES, G. N., CARDOSO, E. C., CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. & MARKUS, R. P. (2007). Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF-alpha increase after cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. *J Pineal Res*, **43**: 365-371.
- PRINSTER, S. C., HAGUE, C. & HALL, R. A. (2005). Heterodimerization of G protein-coupled receptors: specificity and functional significance. *Pharmacol Rev*, **57**: 289-298.
- PUZZO, D., PRIVITERA, L., LEZNIK, E., FÀ, M., STANISZEWSKI, A., PALMERI, A. &

- ARANCIO, O. (2008). Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci*, **28**: 14537-14545.
- QIN, Z. H., WANG, Y., NAKAI, M. & CHASE, T. N. (1998). Nuclear factor-kappa B contributes to excitotoxin-induced apoptosis in rat striatum. *Mol Pharmacol*, **53**: 33-42.
- QUAY W.B. (1963). Circadian rhythm in rat pineal serotonin and its modifications by estrous cycle and photoperiod. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **14**: 473-479.
- QUAY W.B. (1964). Circadian and estrous rhythms in pineal melatonin and 5-hydroxy indole-3-acetic acid. *Proc Soc Exp Biol Med*, **115**: 710-713.
- QUINN, J., KULHANEK, D., NOWLIN, J., JONES, R., PRATICÒ, D., ROKACH, J. & STACKMAN, R. (2005). Chronic melatonin therapy fails to alter amyloid burden or oxidative damage in old Tg2576 mice: implications for clinical trials. *Brain Res*, **1037**: 209-213.
- RADOGNA, F., NUCCITELLI, S., MENGONI, F. & GHIBELLI L (2009). Neuroprotection by melatonin on astrocytoma cell death. *Ann N Y Acad Sci*, **1171**: 509-513.
- RADOGNA, F., PATERNOSTER, L., ALBERTINI, M.C., CERILLA, C., ACCORSI, A., BUCCHINI, A., SPADONI, G., DIAMANTINI, G., TARZIA, G., DE NICOLA, M., D'ALESSIO, M., GHIBELLI, L. (2007). Melatonin antagonizes apoptosis via receptor interaction in U937 monocytic cells. *J Pineal Res*, **43**: 154-162.
- RAIVICH, G. & BEHRENS, A. (2006). Role of the AP-1 transcription factor c-Jun in developing, adult and injured brain. *Prog Neurobiol*, **78**: 347-363.
- RAMANAN, S., KOOSHKI, M., ZHAO, W., HSU, F. C. & ROBBINS, M. E. (2008). PPARalpha ligands inhibit radiation-induced microglial inflammatory responses by negatively regulating NF-kappaB and AP-1 pathways. *Free Radic Biol Med*, **45**: 1695-1704.
- REILLY, T., WATERHOUSE, J., ATKINSON, G. (1997). Aging, rhythms of physical performance, and adjustment to changes in the sleep-activity cycle. *Occup Environ Med*, **54**: 812-816.
- REITER R.J. (1980). The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr. Rev.*, **1**: 109-131.
- 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.
- REPPERT, S. M., GODSON, C., MAHLE, C. D., WEAVER, D. R., SLAUGENHAUPT, S. A. & GUSELLA, J. F. (1995). Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**: 8734-8738.
- REPPERT, S. M., WEAVER D. R., EBISAWA T., MAHLE C. D., KOLAKOWSKI L. F. JR. (1996). Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary. *FEBS Lett*, **386**: 219-224.
- REPPERT, S. M., WEAVER, D. R. & EBISAWA, T. (1994). Cloning and characterization of a

- mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*, **13**: 1177-1185.
- ROBERTSON, M. J. (2002). Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol*, **71**: 173-183.
- ROSALES-CORRAL, S. A., ACUÑA-CASTROVIEJO, D., COTO-MONTES, A., BOGA, J. A., MANCHESTER, L. C., FUENTES-BROTO, L., KORKMAZ, A., MA, S., TAN, D. X. & REITER, R. J. (2012). Alzheimer's disease: pathological mechanisms and the beneficial role of melatonin. *J Pineal Res*, **52**: 167-202.
- ROSALES-CORRAL, S., TAN, D. X., REITER, R. J., VALDIVIA-VELÁZQUEZ, M., MARTÍNEZ-BARBOZA, G., ACOSTA-MARTÍNEZ, J. P. & ORTIZ, G. G. (2003). Orally administered melatonin reduces oxidative stress and proinflammatory cytokines induced by amyloid-beta peptide in rat brain: a comparative, in vivo study versus vitamin C and E. *J Pineal Res*, **35**: 80-84.
- ROSEN, R., HU, D. N., PEREZ, V., TAL, K., YU, G. P., CHEN, M., TONE, P., MCCORMICK, S. A. & WALSH, J. (2009). Urinary 6-sulfatoxymelatonin level in age-related macular degeneration patients. *Mol Vis*, **15**: 1673-1679.
- ROSS, C. A. & POIRIER, M. A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med*, **10 Suppl**: S10-S17.
- SALAMONE, A., MURA, E., ZAPPETTINI, S., GRILLI, M., OLIVERO, G., PREDÀ, S., GOVONI, S. & MARCHI, M. (2014). Inhibitory effects of beta-amyloid on the nicotinic receptors which stimulate glutamate release in rat hippocampus: the glial contribution. *Eur J Pharmacol*, **723**: 314-321.
- SALMINEN, A., OJALA, J., KAUPPINEN, A., KAARNIRANTA, K. & SUURONEN, T. (2009). Inflammation in Alzheimer's disease: amyloid-beta oligomers trigger innate immunity defence via pattern recognition receptors. *Prog Neurobiol*, **87**: 181-194.
- SANDYK, R. (1997). The accelerated aging hypothesis of Parkinson's disease is not supported by the pattern of circadian melatonin secretion. *Int J Neurosci*, **90**: 271-275.
- SATO, T., KANEKO, M., HAMA, A., KUSAKARI, T. & FUJIEDA, H. (1996). Expression of class II MHC molecules in the rat pineal gland during development and effects of treatment with carbon tetrachloride. *Cell Tissue Res*, **284**: 65-76.
- SAURA, C. A., CHOI, S. Y., BEGLOPOULOS, V., MALKANI, S., ZHANG, D., SHANKARANARAYANA RAO, B. S., CHATTARJI, S., KELLEHER, R. J., KANDEL, E. R., DUFF, K., KIRKWOOD, A. & SHEN, J. (2004). Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron*, **42**: 23-36.
- SAVASKAN, E., AYOUB, M. A., RAVID, R., ANGELONI, D., FRASCHINI, F., MEIER, F., ECKERT, A., MÜLLER-SPAHN, F. & JOCKERS, R. (2005). Reduced hippocampal MT2 melatonin receptor expression in Alzheimer's disease. *J Pineal Res*, **38**: 10-16.

- SCHMID, H. A. (1993). Decreased melatonin biosynthesis, calcium flux, pineal gland calcification and aging: a hypothetical framework. *Gerontology*, **39**: 189-199.
- SCHOMERUS, C., KORF, H. W., LAEDTKE, E., WELLER, J. L. & KLEIN, D. C. (2000). Selective adrenergic/cyclic AMP- dependent switch-off of proteasomal proteolysis alone switches on neural signal transduction: an example from the pineal gland. *J Neurochem*, **75**: 2123-2132.
- SCHWAB, C. & MCGEER, P. L. (2008). Inflammatory aspects of Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *J Alzheimers Dis*, **13**: 359-369.
- SCHWAB, C., KLEGERIS, A. & MCGEER, P. L. (2010). Inflammation in transgenic mouse models of neurodegenerative disorders. *Biochim Biophys Acta*, **1802**: 889-902.
- SEABROOK, G. R., SMITH, D. W., BOWERY, B. J., EASTER, A., REYNOLDS, T., FITZJOHN, S. M., MORTON, R. A., ZHENG, H., DAWSON, G. R., SIRINATHSINGHJI, D. J., DAVIES, C. H., COLLINGRIDGE, G. L. & HILL, R. G. (1999). Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein. *Neuropharmacology*, **38**: 349-359.
- SELKOE, D. J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*, **298**: 789-791.
- SEN, R. & BALTIMORE, D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*, **47**: 921-928.
- SERFATY, M., KENNEL-WEBB, S., WARNER, J., BLIZARD, R. & RAVEN, P. (2002). Double blind randomised placebo controlled trial of low dose melatonin for sleep disorders in dementia. *Int J Geriatr Psychiatry*, **17**: 1120-1127.
- SHEN, Y., ZHANG, G., LIU, L. & XU, S. (2007). Suppressive effects of melatonin on amyloid-beta-induced glial activation in rat hippocampus. *Arch Med Res*, **38**: 284-290.
- SHEN, Y.X., XU, S.Y., WEI, W., SUN, X.X., LIU, L.H., YANG, J. & DONG, C. (2002). The protective effects of melatonin from oxidative damage induced by amyloid beta-peptide 25-35 in middle-aged rats. *J Pineal Res*, **32**: 85-89.
- SHENOY, S. K., DRAKE, M. T., NELSON, C. D., HOUTZ, D. A., XIAO, K., MADABUSHI, S., REITER, E., PREMONT, R. T., LICHTARGE, O. & LEFKOWITZ, R. J. (2006). Beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J Biol Chem*, **281**: 1261-1273.
- SHI, Q. & GIBSON, G. E. (2007). Oxidative stress and transcriptional regulation in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, **21**: 276-291.
- SHIDA, C. S., CASTRUCCI, A. M. & LAMY-FREUND, M. T. (1994). High melatonin solubility in aqueous medium. *J Pineal Res*, **16**: 198-201.
- SILVA, S. O., CARVALHO, S. R., XIMENES, V. F., OKADA, S. S., CAMPA, A. (2006). Melatonin and its kynurenin-like oxidation products affect the microbicidal activity of neutrophils. *Microbes Infect*, **8**: 420-425.

- 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.
- SINGER, C., TRACTENBERG, R. E., KAYE, J., SCHAFER, K., GAMST, A., GRUNDMAN, M., THOMAS, R., THAL, L. J. & STUDY, A. S. D. C. (2003). A multicenter, placebo-controlled trial of melatonin for sleep disturbance in Alzheimer's disease. *Sleep*, **26**: 893-901.
- SKENE, D. J. & SWAAB, D. F. (2003). Melatonin rhythmicity: effect of age and Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*, **38**: 199-206.
- SKENE, D. J., VIVIEN-ROELS, B., SPARKS, D. L., HUNSAKER, J. C., PÉVET, P., RAVID, D. & SWAAB, D. F. (1990). Daily variation in the concentration of melatonin and 5-methoxytryptophol in the human pineal gland: effect of age and Alzheimer's disease. *Brain Res*, **528**: 170-174.
- SKRIBANEK, Z., BALÁSPIRI, L. & MÁK, M. (2001). Interaction between synthetic amyloid-beta-peptide (1-40) and its aggregation inhibitors studied by electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, **36**: 1226-1229.
- SKWARŁO-SONTA, K. (1996). Functional connections between the pineal gland and immune system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, **56**: 341-357.
- SKWARŁO-SONTA, K., MAJEWSKI, P., MARKOWSKA, M., OBLAP, R. & OLSZANSKA, B. (2003). Bidirectional communication between the pineal gland and the immune system. *Can J Physiol Pharmacol*, **81**: 342-349.
- SLOMINSKI, A., FISCHER, T. W., ZMIJEWSKI, M. A., WORTSMAN, J., SEMAK, I., ZBYTEK, B., SLOMINSKI, R. M. & TOBIN, D. J. (2005). On the Role of Melatonin in Skin Physiology and Pathology. *Endocrine*, **27**: 137-148.
- SMITH, C. J., PERRY, E. K., PERRY, R. H., FAIRBAIRN, A. F. & BIRDSALL, N. J. (1987). Guanine nucleotide modulation of muscarinic cholinergic receptor binding in postmortem human brain--a preliminary study in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, **82**: 227-232.
- SNYDER, E. M., NONG, Y., ALMEIDA, C. G., PAUL, S., MORAN, T., CHOI, E. Y., NAIRN, A. C., SALTER, M. W., LOMBROSO, P. J., GOURAS, G. K. & GREENGARD, P. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci*, **8**: 1051-1058.
- SOLA, C., CASAL, C., TUSELL, J. M. & SERRATOSA, J. (2002). Astrocytes enhance lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by microglial cells. *Eur J Neurosci*, **16**: 1275-1283.
- SONG, W. & LAHIRI, D. K. (1997). Melatonin alters the metabolism of the beta-amyloid precursor protein in the neuroendocrine cell line PC12. *J Mol Neurosci*, **9**: 75-92.
- SRINIVASAN, V., MAESTRONI, G. J., CARDINALI, D. P., ESQUIFINO, A. I., PERUMAL, S. R. & MILLER, S. C. (2005). Melatonin, immune function and aging. *Immun Ageing*, **2**: 17.
- SRINIVASAN, V., PANDI-PERUMAL, S. R., CARDINALI, D. P., POEGGELER, B. & HARDELAND, R. (2006a). Melatonin in Alzheimer's disease and other neurodegenerative

- disorders. *Behav Brain Funct*, **2**: 15.
- SRINIVASAN, V., SMITS, M., SPENCE, W., LOWE, A.D., KAYUMOV, L., PANDIPERUMAL, S.R., PARRY, B., CARDINALI, D.P. (2006b). Melatonin in mood disorders. *World J Biol Psychiatry*, **7**: 138-151.
- STANCIU, M., WANG, Y., KENTOR, R., BURKE, N., WATKINS, S., KRESS, G., REYNOLDS, I., KLANN, E., ANGIOLIERI, M. R., JOHNSON, J. W. & DEFRANCO, D. B. (2000). Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures. *J Biol Chem*, **275**: 12200-12206.
- STEWART, W. F., KAWAS, C., CORRADA, M. & METTER, E. J. (1997). Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. *Neurology*, **48**: 626-632.
- SUN, X. F. & ZHANG, H. (2007). NFKB and NFKBI polymorphisms in relation to susceptibility of tumour and other diseases. *Histol Histopathol*, **22**: 1387-1398.
- SYED, N. A., ANDERSEN, P. L., WARRINGTON, R. C. & XIAO, W. (2006). Uev1A, a ubiquitin conjugating enzyme variant, inhibits stress-induced apoptosis through NF-kappaB activation. *Apoptosis*, **11**: 2147-2157.
- TADAGAKI, K., JOCKERS, R. & KAMAL, M. (2012). History and biological significance of GPCR heteromerization in the neuroendocrine system. *Neuroendocrinology*, **95**: 223-231.
- TAKANO, M., YAMASHITA, T., NAGANO, K., OTANI, M., MAEKURA, K., KAMADA, H., TSUNODA, S., TSUTSUMI, Y., TOMIYAMA, T., MORI, H., MATSUURA, K. & MATSUYAMA, S. (2013). Proteomic analysis of the hippocampus in Alzheimer's disease model mice by using two-dimensional fluorescence difference in gel electrophoresis. *Neurosci Lett*, **534**: 85-89.
- TAMURA, E. K., CECON, E., MONTEIRO, A. W., SILVA, C. L. & MARKUS, R. P. (2009). Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells. *J Pineal Res*, **46**: 268-274.
- TAMURA, E. K., FERNANDES, P. A., MARÇOLA, M., DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S., MARKUS, R. P. (2010). Long-lasting priming of endothelial cells by plasma melatonin levels. *PLoS One*, **5**: e13958.
- TAN, D. X., MANCHESTER, L. C., LIU, X., ROSALES-CORRAL, S. A., ACUNACASTROVIEJO, D. & REITER, R. J. (2013). Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. *J Pineal Res*, **54**: 127-138.
- TANIGUCHI, T., OGASAWARA, K., TAKAOKA, A. & TANAKA, N. (2001). IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol*, **19**: 623-655.
- TECLEMARIAM-MESBAH, R., TER HORST, G. J., POSTEMA, F., WORTEL, J. & BUIJS, R. M. (1999). Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway. *J Comp Neurol*, **406**: 171-182.
- TERAI, K., MATSUO, A. & MCGEER, P. L. (1996). Enhancement of immunoreactivity for NF-

- kappa B in the hippocampal formation and cerebral cortex of Alzheimer's disease. *Brain Res*, **735**: 159-168.
- TERGAONKAR, V. (2006). NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target. *Int J Biochem Cell Biol*, **38**: 1647-1653.
- THATHIAH, A. & DE STROOPER, B. (2009). G protein-coupled receptors, cholinergic dysfunction, and Abeta toxicity in Alzheimer's disease. *Sci Signal*, **2**: re8.
- THATHIAH, A., HORRÉ, K., SNELLINX, A., VANDEWYER, E., HUANG, Y., CIESIELSKA, M., DE KLOE, G., MUNCK, S. & DE STROOPER, B. (2013).  $\beta$ -arrestin 2 regulates A $\beta$  generation and  $\gamma$ -secretase activity in Alzheimer's disease. *Nat Med*, **19**: 43-49.
- TOHGI, H., ABE, T., TAKAHASHI, S., KIMURA, M., TAKAHASHI, J. & KIKUCHI, T. (1992). Concentrations of serotonin and its related substances in the cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer type dementia. *Neurosci Lett*, **141**: 9-12.
- TRAENCKNER, E. B., PAHL, H. L., HENKEL, T., SCHMIDT, K. N., WILK, S. & BAEUERLE, P. A. (1995). Phosphorylation of human I $\kappa$ B-a on serines 32 and 36 controls I $\kappa$ B-a proteolysis and NF-kB activation in response to diverse stimuli. *EMBO J.*, **14**: 2876-2883.
- TSAI, S. Y., SCHLUNS, K. S., LE, P. T. & MCNULTY, J. A. (2001). TGF-beta1 and IL-6 expression in rat pineal gland is regulated by norepinephrine and interleukin-1beta. *Histol Histopathol*, **16**: 1135-1141.
- UCHIDA, K., OKAMOTO, N., OHARA, K. & MORITA, Y. (1996). Daily rhythm of serum melatonin in patients with dementia of the degenerate type. *Brain Res*, **717**: 154-159.
- VAKKURI, O., LÄMSÄ, E., RAHKAMAA, E., RUOTSALAINEN, H. & LEPPÄLUOTO, J. (1984). Iodinated melatonin: preparation and characterization of the molecular structure by mass and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Anal Biochem*, **142**: 284-289.
- van WAMELEN, D. J., AZIZ, N. A., ANINK, J. J., VAN STEENHOVEN, R., ANGELONI, D., FRASCHINI, F., JOCKERS, R., ROOS, R. A. & SWAAB, D. F. (2013). Suprachiasmatic nucleus neuropeptide expression in patients with Huntington's Disease. *Sleep*, **36**: 117-125.
- VANĚCEK, J., PAVLÍK, A. & ILLNEROVÁ, H. (1987). Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res*, **435**: 359-362.
- VAUGHAN, M. K. & REITER, R. J. (1971). Transient hypertrophy of the ventral prostate and coagulating glands and accelerated thymic involution following pinealectomy in the mouse. *Tex Rep Biol Med*, **29**: 579-586.
- VERKHRATSKY, A., OLABARRIA, M., NORISTANI, H. N., YEH, C. Y. & RODRIGUEZ, J. J. (2010). Astrocytes in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, **7**: 399-412.
- VIGANÒ, D., LISSONI, P., ROVELLI, F., ROSELLI, M. G., MALUGANI, F., GAVAZZENI, C., CONTI, A. & MAESTRONI, G. (2001). A study of light/dark rhythm of melatonin in relation to cortisol and prolactin secretion in schizophrenia. *Neuro Endocrinol Lett*, **22**: 137-141.
- VIJAYALAXMI, THOMAS, C. R., REITER, R. J. & HERMAN, T. S. (2002). Melatonin: from

- basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Oncol*, **20**: 2575-2601.
- WALDHAUSER, F., WEISZENBACHER, G., TATZER, E., GISINGER, B., WALDHAUSER, M., SCHEMPER, M. & FRISCH, H. (1988). Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. *J Clin Endocrinol Metab*, **66**: 648-652.
- WALLS, K. C., COSKUN, P., GALLEGOS-PEREZ, J. L., ZADOURIAN, N., FREUDE, K., RASOOL, S., BLURTON-JONES, M., GREEN, K. N. & LAFERLA, F. M. (2012). Swedish Alzheimer mutation induces mitochondrial dysfunction mediated by HSP60 mislocalization of amyloid precursor protein (APP) and beta-amyloid. *J Biol Chem*, **287**: 30317-30327.
- WALTER, S., LETIEMBRE, M., LIU, Y., HEINE, H., PENKE, B., HAO, W., BODE, B., MANIETTA, N., WALTER, J., SCHULZ-SCHUFFER, W. & FASSBENDER, K. (2007). Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Cell Physiol Biochem*, **20**: 947-956.
- WANG, X. (2009). The anti-apoptotic activity of melatonin in neurodegenerative diseases. *CNS Neurosci Ther*, **15**: 345-357.
- WANG, D., YUEN, E. Y., ZHOU, Y., YAN, Z. & XIANG, Y. K. (2011). Amyloid beta peptide-(1-42) induces internalization and degradation of beta2 adrenergic receptors in prefrontal cortical neurons. *J Biol Chem*, **286**: 31852-31863.
- WANG, J. Z. & WANG, Z. F. (2006). Role of melatonin in Alzheimer-like neurodegeneration. *Acta Pharmacol Sin*, **27**: 41-49.
- WANG, X. C., ZHANG, Y. C., CHATTERJIE, N., GRUNDKE-IQBAL, I., IQBAL, K. & WANG, J. Z. (2008). Effect of melatonin and melatonylvalpromide on beta-amyloid and neurofilaments in N2a cells. *Neurochem Res*, **33**: 1138-1144.
- WANG, Y. T., CHEN, S. L. & XU, S. Y. (2004). Effect of melatonin on the expression of nuclear factor-kappa B and airway inflammation in asthmatic rats. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, **42**: 94-97.
- WEAVER, D. R., RIVKEES, S. A. & REPPERT, S. M. (1989). Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by in vitro autoradiography. *J Neurosci*, **9**: 2581-2590.
- WHITE, B. H., SEKURA, R. D. & ROLLAG, M. D. (1987). Pertussis toxin blocks melatonin-induced pigment aggregation in *Xenopus* dermal melanophores. *J Comp Physiol B*, **157**: 153-159.
- WILKINSON, D. G., FRANCIS, P. T., SCHWAM, E. & PAYNE-PARRISH, J. (2004). Cholinesterase inhibitors used in the treatment of Alzheimer's disease: the relationship between pharmacological effects and clinical efficacy. *Drugs Aging*, **21**: 453-478.
- WINK, D. A., HINES, H. B., CHENG, R. Y., SWITZER, C. H., FLORES-SANTANA, W., VITEK, M. P., RIDNOUR, L. A., COLTON, C. A. (2011). Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J Leukoc Biol*, **89**: 873-891.



- WU, Y. H. & SWAAB, D. F. (2005). The human pineal gland and melatonin in aging and Alzheimer's disease. *J Pineal Res*, **38**, 145-152.
- WU, Y. H. & SWAAB, D. F. (2007). Disturbance and strategies for reactivation of the circadian rhythm system in aging and Alzheimer's disease. *Sleep Med*, **8**: 623-636.
- WU, Y. H., FEENSTRA, M. G., ZHOU, J. N., LIU, R. Y., TORANÓ, J. S., VAN KAN, H. J., FISCHER, D. F., RAVID, R. & SWAAB, D. F. (2003). Molecular changes underlying reduced pineal melatonin levels in Alzheimer disease: alterations in preclinical and clinical stages. *J Clin Endocrinol Metab*, **88**: 5898-5906.
- WU, Y. H., FISCHER, D. F., KALSBECK, A., GARIDOU-BOOF, M. L., VAN DER VLIET, J., VAN HEIJNINGEN, C., LIU, R. Y., ZHOU, J. N. & SWAAB, D. F. (2006). Pineal clock gene oscillation is disturbed in Alzheimer's disease, due to functional disconnection from the "master clock". *FASEB J*, **20**: 1874-1876.
- WU, Y. H., ZHOU, J. N., VAN HEERIKHUIZE, J., JOCKERS, R. & SWAAB, D. F. (2007). Decreased MT1 melatonin receptor expression in the suprachiasmatic nucleus in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **28**: 1239-1247.
- WURTMAN, R.J. & AXELROD, J. (1965). The pineal gland. *Sci Amer.*, **213**: 50-60.
- YAFFE, K., LINDQUIST, K., PENNINX, B. W., SIMONSICK, E. M., PAHOR, M., KRITCHEVSKY, S., LAUNER, L., KULLER, L., RUBIN, S. & HARRIS, T. (2003). Inflammatory markers and cognition in well-functioning African-American and white elders. *Neurology*, **61**: 76-80.
- ZEITZER, J. M., DANIELS, J. E., DUFFY, J. F., KLERMAN, E. B., SHANAHAN, T. L., DIJK, D. J. & CZEISLER, C. A. (1999). Do plasma melatonin concentrations decline with age? *Am J Med*, **107**: 432-436.
- ZHANG, Y. C., WANG, Z. F., WANG, Q., WANG, Y. P. & WANG, J. Z. (2004). Melatonin attenuates beta-amyloid-induced inhibition of neurofilament expression. *Acta Pharmacol Sin*, **25**: 447-451.
- ZHU, L. Q., WANG, S. H., LING, Z. Q., WANG, D. L. & WANG, J. Z. (2004). Effect of inhibiting melatonin biosynthesis on spatial memory retention and tau phosphorylation in rat. *J Pineal Res*, **37**: 71-77.
- ZHU, X., CASTELLANI, R. J., TAKEDA, A., NUNOMURA, A., ATWOOD, C. S., PERRY, G. & SMITH, M. A. (2001). Differential activation of neuronal ERK, JNK/SAPK and p38 in Alzheimer disease: the 'two hit' hypothesis. *Mech Ageing Dev*, **123**: 39-46.
- ZLOTOS, D. P., JOCKERS, R., CECON, E., RIVARA, S. & WITT-ENDERBY, P. A. (2014). MT1 and MT2 Melatonin Receptors: Ligands, Models, Oligomers, and Therapeutic Potential. *J Med Chem*, **57**: 3161-3185.

# SÚMULA CURRICULAR

---

## Informações Pessoais

**Nome completo:** Erika Cecon

**Data e local de nascimento:** 14/06/1984, Jundiaí - São Paulo, Brasil

**Endereço eletrônico:** erika.cecon@usp.br / e\_cecon@yahoo.com.br

---

## Formação Acadêmica

- 2010 - 2014**      Doutorado em Fisiologia Geral  
Instituição: Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil.  
Título: Sistema melatonérgico como alvo do peptídeo  $\beta$ -amiloide  
Orientadora: Regina Pekelmann Markus  
Bolsa: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo n° 2009/17923-9).
- 2008 - 2010**      Mestrado em Fisiologia Geral  
Instituição: Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil  
Título: Caracterização do fator de transcrição NF $\kappa$ B em glândulas pineais de ratos  
Orientadora: Regina Pekelmann Markus  
Bolsa: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo n° 2007/06420-0).
- 2007 - 2010**      Licenciatura em Ciências Biológicas  
Instituição: Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil.
- 2004 - 2007**      Bacharelado em Ciências Biológicas  
Instituição: Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil.  
Título: Eixo imune-pineal: citocina pró-inflamatória (TNF $\alpha$ ) inibe a produção noturna de melatonina  
Orientadora: Regina Pekelmann Markus  
Bolsa: Pró-Reitoria de Pesquisa USP (processo n° PRP/USP/2004/010).
- 

## Artigos completos publicados

1. Zlotos D.P.; Jockers R.; **Cecon E.**; Rivara S.; Witt-Enderby P.A. MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> Melatonin Receptors: Ligands, Models, Oligomers, and Therapeutic Potential. J Med Chem. 57: 3161-3185, 2014.
2. Pinato L.; Da Silveira Cruz-Machado S.; Franco D.G.; Campos L.M.G.; **Cecon E.**; Fernandes P.A.C.M.; Bittencourt J.C.; Markus R.P. Selective protection of the cerebellum against intracerebroventricular LPS is mediated by local melatonin synthesis. Brain Structure

and Function, 2014, *in press*.

3. Markus R.P.; **Cecon E.**; Pires-Lapa M.A. Immune-Pineal Axis: Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) Mediates the Shift in the Melatonin Source from Pinealocytes to Immune Competent Cells. *Int J Mol Sci.* 14(6): 10979-10997, 2013.
4. Markus R.P. & **Cecon E.** O tempo biológico e a defesa do organismo: uma conversa bidirecional entre a glândula pineal e o sistema imunológico. *Revista Ciência e Cultura*, 65: 52-55, 2013.
5. Muxel S.M.; Pires-Lapa M.A.; Monteiro A.W.; **Cecon E.**; Tamura E.K.; Floeter-Winter L.M.; Markus R.P. NF- $\kappa$ B drives the synthesis of melatonin in RAW 264.7 macrophages by inducing the transcription of the arylalkylamine-N-acetyltransferase (AA-NAT) gene. *PLoS One.* 7(12): e52010, 2012.
6. Carvalho-Sousa C.E.; da Silveira Cruz-Machado S.; Tamura E.K.; Fernandes P.A.C.M.; Pinato L.; Muxel S.M.; **Cecon E.**; Markus R.P. Molecular basis for defining the pineal gland and pinealocytes as targets for tumor necrosis factor. *Frontiers in Endocrinology* 2(10): 1-11, 2011.
7. **Cecon E.**; Markus R.P. Relevance of the Chronobiological and Non-chronobiological Actions of Melatonin for Enhancing Therapeutic Efficacy in Neurodegenerative Disorders. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery* 5: 91 - 99, 2011.
8. **Cecon E.**; Fernandes P.A.; Pinato L.; Ferreira Z.S.; Markus R.P. Daily Variation of Constitutively Activated Nuclear Factor Kappa B (NF $\kappa$ B) in Rat Pineal Gland. *Chronobiology International* 27: 52 - 67, 2010.
9. **Cecon E.**; Flores, D.E.F.L. Regulação da Expressão Gênica nas Engrenagens do Relógio Circadiano de Mamíferos. *Revista da Biologia* 4: 28 - 33, 2010.
10. Da Silveira Cruz-Machado S.; Carvalho-Sousa C.E.; Tamura E.K.; Pinato L.; **Cecon E.**; Fernandes P.A.C.M.; De Avellar M.C.W.; Ferreira Z.S.; Markus R.P. TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NF $\kappa$ B pathway. *Journal of Pineal Research* 49(2): 183 - 192, 2010.
11. Tamura E.K.; **Cecon E.**; Monteiro A.W.A.; Silva C.L.M.; Markus R.P. Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells. *Journal of Pineal Research* 46: 268 - 274, 2009.
12. Silva C.L.M.; Tamura E.K.; Macedo S.M.D.; **Cecon E.**; Alves-Junior L.B.; Farsky S.H.P.; Ferreira Z.S.; Markus R.P. Melatonin inhibits microvascular endothelial cell nitric oxide production in vivo and in vitro. *British Journal of Pharmacology* 151: 195 - 205, 2007.
13. Markus R.P.; Ferreira Z.S.; Fernandes P.A.C.M.; **Cecon E.** The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *Neuroimmunomodulation (Basel)* 14: 126 - 133, 2007.
14. Fernandes P.A.C.M.; **Cecon E.**; Markus R.P.; Ferreira Z.S. Effect of TNF-alpha on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a 'feedback' of the immune

response on circadian timing. *Journal of Pineal Research* 41: 344 - 350, 2006.

---

### **Comunicação oral em eventos científicos**

1. CECON, E.; Fernandes, P.A.C.M. ; Jockers R. ; Markus R.P. Amyloid beta peptide induces neuroinflammatory response in the pineal gland and impairs melatonin synthesis. In: 45 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2013, Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Finalista do prêmio José Ribeiro do Valle.**
  2. CECON E.; Fernandes P.A.C.M; Markus RP. The pineal gland in the neuroinflammatory context induced by amyloid beta peptide: changes in gene expression and in melatonin synthesis. In: FASEB Summer Research Conference on Melatonin Biology: Actions & Therapeutics, 2013, Niagara Falls, NY, United States of America.
  3. CECON E.; Fernandes P.A.C.M; Tamura EK; Markus RP. Amyloid-beta peptide as a regulator of pineal gland melatonin production. In: 42nd Annual Meeting of the Society for Neurosciences. New Orleans, LA, United States of America, 2012.
  4. CECON, E.; Tamura, E.K.; Buck, H.S.; Markus R.P. Modulation of melatonin synthesis by amyloid-beta peptide in rat pineal glands. In: FASEB Summer Research Conference on Melatonin Receptors: Actions & Therapeutics, 2011, Snowmass Village, CO, United States of America.
  5. CECON E., Fernandes P.A.C.M., Ferreira Z.S., Markus R.P. Regulação do Fator de Transcrição NFkB em Glândulas Pineais de Rato. In: IX Simpósio Brasileiro de Cronobiologia, 2006, Águas de Lindóia, SP, Brasil.
- 

### **Outras atividades e cursos**

1. Estágio no laboratório "Functional Pharmacology and Pathophysiology of Membrane Receptors" do Prof. Dr. Ralf Jockers, no Institute Cochin, Université Paris Descartes, Paris, França (02/2013 a 05/2013).
  2. Workshop em "Transcriptomics: Assessing Genomic Networks in Normal and Diseased Brains". New Orleans, LA, EUA, 2012.
  3. Participação no III INF Summer School in Neuroendocrinology (13 a 19 de agosto, 2011), Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto, SP, Brasil.
  4. Organização, aulas ministradas e supervisões de estágio em práticas laboratoriais a estudantes de graduação durante o evento anual do Curso de Inverno em Fisiologia Comparativa, realizado no dep. de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP (2006, 2007, 2008, 2009, 2011).
- 

**Trabalhos apresentados na forma de pôster em congressos internacionais: 08**

**Trabalhos apresentados na forma de pôster em congressos nacionais: 06**

---

## ANEXO 1



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

OF. CEA/IB/021/2010  
Ref. 2010.1.432.41.7

São Paulo, 22 de abril de 2010.

Prezada Senhora

Dirijo-me a V. Sa. para informar que a Comissão de Ética em Uso de Animais Vertebrados em Experimentação do IB, em reunião realizada no dia 20/04/2010, **APROVOU** o Projeto “Glândula pineal como alvo do peptídeo beta-amilóide” – **Protocolo 111/2010**, de sua responsabilidade (Colaboradora: Érika Cecon).

Atenciosamente.

A handwritten signature in black ink, reading "Eleonora Trajano", written in a cursive style.

Profa. Dra. Eleonora Trajano

Coordenadora da Comissão de Ética em uso de Animais  
Vertebrados em Experimentação do IB

Ilma. Sra.

Profa. Dra. REGINA PEKELMANN MARKUS

Departamento de Fisiologia do IBUSP.