MARIA EMILIA ZENTENO

Efeito da melatonina no desenvolvimento da resposta imune
mediada por linfócitos T CD4

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção, do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2015

MARIA EMILIA ZENTENO

Efeito da melatonina no desenvolvimento da resposta imune
mediada por linfócitos T CD4

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção, do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. João Gustavo Pessini
Amarante-Mendes

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Zenteno, Maria Emilia.

Efeito da melatonina no desenvolvimento da resposta imune mediada por linfócitos T CD4 / Maria Emilia Zenteno. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante Mendes.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Estudo da morte de linfócitos T CD4.

Versão do título para o inglês: Effect of melatonin on the development of CD4 T lymphocytes-mediated immune response.

1. Linfócitos T CD4 2. Melatonina 3. AICD 4. CD95L 5. DTH
I. Mendes, Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0160/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Maria Emilia Zenteno.

Título da Tese: Efeito da melatonina no desenvolvimento da resposta imune mediada por linfócitos T CD4.

Orientador(a): Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante Mendes.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 03 de fevereiro de 2012.

PARECER 1039/CEP

O Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB aprovou nesta data, o projeto intitulado: "*Efeito da regulação de FASL pela melatonina em linfócitos T CD4*" sob responsabilidade de execução dos autores Prof. Dr. **JOÃO GUSTAVO P. AMARANTE MENDES** e a aluna **MARIA EMILIA ZENTENO**.

Cabe a pesquisadora executante elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **03.02.2013**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.068/2015.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 052/2011/CEUA, informo que o título do Projeto foi alterado para "*Efeito da melatonina no desenvolvimento da resposta imune mediada por linfócitos T CD4*" sem modificações de seu conteúdo.

São Paulo, 27 de agosto de 2015.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador da Comissão de
Ética no Uso de Animais - ICB/USP

Aos meus Pais, Teresa e Ramón,
aos meus irmãos, aos meus
amigos e a Santiago, o amor da
minha vida.

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer ao Professor Gustavo Amarante-Mendes por ter-me dado a oportunidade de desenvolver o projeto de doutorado no seu laboratório de pesquisa e por ter me ajudado a ampliar meu espírito crítico no decorrer dos experimentos.

À Professora Regina Markus pelas extensas discussões sobre a melatonina e seus efeitos.

Ao Professor João Viola e a sua aluna de Pós-Doc Cristiane Secca, pela ajuda nos experimentos de diferenciação linfocitária e pelo suporte intelectual sobre os resultados obtidos. Assim também agradeço a Cristiane pela amizade e disposição na minha ida pro Rio de Janeiro.

Aos meus colegas do laboratório por terem sido uma família para mi todo este tempo de doutorado. Agradeço a Julia, Tiago, Juninho, Sandy, Nathalia e Marcela pelas conversas sobre os nossos resultados e as possíveis explicações deles. Agradeço a cada um deles pelo apoio prestado e as outras pessoas que formam o grupo de pesquisa do laboratório 244: Priscilla, Barbara Mello, Barbara Saty, Jennifer, Henry, Melanie, Eliza e Daniel.

À Dra. Jaqueline Jacysyn pelo ajuda incondicional que ela me ofereceu com cada um dos experimentos de DTH ao vir me auxiliar em feriados e finais de semana. Por outro lado, pela sua amizade incondicional e disposição.

Aos meus amigos Luciana e Leandro, por terem ouvido os meus resultados varias vezes e em diferentes fases do meu doutorado e por terem me dado boas sugestões sobre futuros experimentos.

A Santiago, meu marido, por seu apoio incondicional e desinteressado e por ter estado no meu lado nas horas mais difíceis, me inspirando para continuar sem abaixar os braços. Agradeço a ele por ter me ensinado o fundamento de muitas técnicas de biologia molecular como também alguns sítios web que facilitaram minha vida. Agradeço-lhe pela paciência e pelo companheirismo, pela lealdade e alegria que ele sempre me mostrou.

A minha família, que mesmo longe de casa, eles sempre estiveram presentes na minha vida dando-me segurança, apoio, inspiração e amor. Aos meus pais que me deram os melhores valores e a educação básica que fizeram de mim a pessoa que sou hoje.

Aos amigos da vida pelos momentos de descontração brindados por eles e que foram de muita ajuda nos momentos difíceis. A eles Lauren, Silvina, Ângela, Ana, Murilo, Alba e Hector. Amigos que estiveram sempre presentes desde a minha chegada ao Brasil.

Aos funcionários do ICB da imunologia, desde os bioteristas pelo seu trabalho árduo nos cuidados do bem estar animal até os porteiros de todos os turnos que sempre se preocuparam pela nossa volta pra casa em segurança, principalmente nos dias de experimentos extensos.

À FAPESP pelo fornecimento financeiro para o desenvolvimento do presente projeto de doutorado e pela ajuda nas viagens aos congressos que acrescentaram conhecimentos na minha formação.

*A tarefa não é tanto ver aquilo
que ninguém viu, mas pensar no
que ninguém ainda pensou sobre
aquilo que todo mundo vê.*

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

ZENTENO, M. E. **Efeito da melatonina no desenvolvimento da resposta imune mediada por linfócitos T CD4**. 2015. 77 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Linfócitos T CD4⁺ (LTCD4) representam, talvez, a população celular mais relevante do sistema imune adaptativo, uma vez que eles coordenam a ativação de outros tipos celulares do sistema imunológico. É importante destacar, que ao final de uma resposta imune adaptativa ocorre um fenômeno de deleção clonal, para que o sistema retorne à homeostase. Dois eventos distintos são responsáveis por este fenômeno: morte celular induzida por ativação (AICD *activation-induced cell death*) e a morte autônoma dos linfócitos T ativados (ACAD; *activated T cell autonomous death*). O processo de AICD, objeto de estudo deste projeto, acontece via ligação do receptor CD95 com seu ligante cognato CD95L, proteína que é induzida nos LTCD4 pela reestimulação do receptor de células T (TCR). Resultados publicados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram em experimentos *in vitro* que a melatonina é capaz de proteger os LTCD4 da morte por AICD reprimindo a expressão de CD95L via inibição da ativação do fator de transcrição NFAT (PEDROSA et al., 2010). A partir deste achado, nosso grupo propôs que a melatonina pudesse ser uma molécula capaz de regular, positivamente a resposta imune mediada pelos LTCD4. Portanto, o objetivo deste trabalho é verificar se a melatonina é capaz de agir como estimulador, aumentando a resposta imune mediada pelos LTCD4 *in vivo*. Para isto, nós utilizamos o modelo de hipersensibilidade tardia (DTH *Delayed-type Hypersensitivity*), uma vez que, sabidamente, esta resposta é mediada pelos LTCD4. Neste sentido, nós observamos que 3 e 9mg/Kg de melatonina aumentaram a resposta de DTH de forma diretamente proporcional à dose utilizada. O tratamento com melatonina estimulou um aumento da proliferação e do número absoluto de LTCD4 específicos de antígeno. Em experimentos de diferenciação linfocitária *in vitro*, nós observamos que o tratamento com melatonina estimulou a produção de LTCD4 do perfil Th1 e Th2, no entanto inibiu a produção de linfócitos Th17. Em conclusão, nossos resultados sugerem um papel regulador da melatonina sobre a função de linfócitos T CD4⁺ efetores no desenvolvimento de uma resposta imune.

Palavras-chave: Melatonina. Linfócitos T CD4. AICD. DTH. CD95L.

ABSTRACT

ZENTENO, M. E. **Effect of melatonin on the development of CD4 T lymphocyte-mediated immune response.** 2015. 77 p. Ph. D. thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

CD4⁺ T lymphocytes (LTCD4⁺) represent the most relevant cellular population of the adaptive immunity since they orchestrate the action of other cell types of the immunological system. Is important highlight that at the end of the adaptive immune response occur a phenomenon of clonal contraction to reestablish immune homeostasis. It is accomplished by two cell death process known as activation-induced cell death (AICD) and Activated T Cell Autonomous Death (ACAD). The process of AICD, issue of this work, happened via interaction of receptor CD95 with its cognate ligand CD95L, protein induced in LTCD4 by reestimulation of T-cell receptor (TCR). Previous results from our group demonstrate through in vitro experiment that melatonin (MLT) could prevent TcR/CD3-mediated CD95L up regulation by blocking of transcription factor NFAT activity and consequently AICD (PEDROSA et al., 2010). From this found our group purposes that melatonin could be a molecule regulating positively an immune response mediated by LTCD4. Therefore, the aim is to study the role of melatonin in LTCD4⁺-dependent immune response. For that we used a Delayed-type hypersensitivity model (DTH) since that is known that DTH is an immune response driven by LTCD4. We showed that 3 and 9 mg/Kg of exogenous melatonin added during immunization resulted in potentiation dose-dependent of Delay type hypersensitivity (DTH) response. The treatment with melatonin increased the absolute number LTCD4 antigen-specific, probably by increment of its proliferation. In experiment of T cell differentiation, we observed that the treatment with melatonin stimulated LTCD4 production of Th1 and Th2 profiles, however blocked the Th17 lymphocytes production. In conclusion, our results support the idea about a regulator role of melatonin on LTCD4 lymphocytes function for development of an immune response.

Keywords: Melatonin. CD4 T Lymphocytes. AICD. DTH. CD95L.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACAD: *Activated T Cell Autonomous Death*

AICD: *Activation-Induced Cell Death*

APC: *Antigen-Presenting Cell*/ célula apresentadora de antígeno

Caspases: *Cysteine-Aspartic Acid Proteases*

CFA: *Complete Freud Adjuvant*/ Adjuvante Completo de Freud

c-FLIP: *cellular-FLICE like inhibitor protein*

DISC: *death-inducing signaling complex*

DTH: *Delayed-Type Hypersensitivity*

GPCR: *G-Protein Coupled Receptor*

i.p.: intraperitoneal

KO: *Knockout*

LTCD4: linfócitos T CD4

MLT: melatonina

NLR: *NOD-like receptors*

pOVA: peptídeo da OVA

PRR: *Pattern recognition receptor*

sc.: subcutâneo

TCR: *T Cell Receptor*

Tg: transgênico

TLR: *TOLL-like receptors*

WT: *wildtype*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Sítios de ligação para melatonina e suas faixas de afinidade.....</i>	23
Figura 2. <i>Melatonina inibe a morte por AICD e reprime a expressão de CD95L em hibridoma DO11.10 estimulado com anticorpo anti-CD3 .....</i>	42
Figura 3. <i>Receptores de membrana de melatonina MT1/2 AICD.....</i>	43
Figura 4. <i>Proteção contra AICD pela melatonina não depende da sinalização via receptores MT1/2 .....</i>	44
Figura 5. <i>Melatonina protege LTCD4 da morte por reestimulação do TCR e reprime a expressão de CD95L .....</i>	46
Figura 6. <i>Frequência de linfócitos T CD4 naive pré e pós-coluna de purificação .....</i>	47
Figura 7. <i>Diferenciação dos diferentes perfis de linfócitos T CD4.....</i>	48
Figura 8. <i>A melatonina inibe a expressão de CD95L nas quatro populações de linfócitos T CD4. 49</i>	
Figura 9. <i>Indução de AICD nos diferentes perfis de linfócitos T CD4.....</i>	50
Figura 10. <i>Expressão induzida de c-FLIP nas células ativadas com anti-CD3 dos diferentes perfis de LTCD4.....</i>	51
Figura 11. <i>Efeito da melatonina na diferenciação para os perfis Th1, Th2, Th17 e iTreg.....</i>	52
Figura 12. <i>Influência da melatonina na expressão dos marcadores de ativação linfocitária CD44 e CD69 .....</i>	53
Figura 13. <i>Influência da melatonina na expressão dos marcadores de ativação linfocitária CD62L e CD25.....</i>	54
Figura 14. <i>A resposta de DTH é estimulada por antígeno proteico. ....</i>	55
Figura 15. <i>A resposta de DTH é mediada por linfócitos T CD4 .....</i>	56
Figura 16. <i>Padronização do modelo de DTH para o estabelecimento de uma resposta imunológica subótima .....</i>	57
Figura 17. <i>Efeito imunoestimulador dependente de dose da melatonina no modelo de DTH .....</i>	57
Figura 18. <i>Efeito da melatonina em animais transgênicos mutante não funcional para FAS (B6^{LPR/LPR}) no modelo de DTH.....</i>	58
Figura 19. <i>Melatonina estimulou a resposta de DTH em animais transferidos com esplenócitos OTII e OTII^{lpr/lpr} .....</i>	60
Figura 20. <i>Melatonina aumenta o número absoluto de linfócitos T CD4 específicos do antígeno.....</i>	61
Figura 21. <i>Melatonina estimula a proliferação de linfócitos T CD4 específicos do antígeno .....</i>	62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Linfócitos TCD4+	16
1.2 Morte celular de LTCD4 ativados após resposta imune, ACAD e AICD	18
1.3 AICD, papel do CD95L	20
1.4 Melatonina	21
1.5 Melatonina controla a morte de células imunes	26
1.6 Melatonina e doenças mediadas por LTCD4	27
2 OBJETIVO	30
3 MATERIAL E MÉTODO	31
3.1 Animais	31
3.2 Reagentes	31
3.3 Indução de morte por AICD em hibridoma DO11.10	32
3.4 Extração de RNA	32
3.5 Síntese de cDNA	32
3.6 Quantificação da expressão gênica por qPCR	33
3.7 Geração de Células Dendríticas a partir de células da medula óssea	34
3.8 Geração de Blastos LTCD4	34
3.9 Cocultura de células dendríticas e blastos de LTCD4	35
3.10 Marcação para Citometria de Fluxo	35
3.11 Diferenciação de linfócitos T CD4	36
3.11.1 Cultura celular	36
3.11.2 Anticorpos e citocinas recombinantes	36
3.11.3 Purificação e ativação de linfócitos T CD4	37
3.11.4 Diferenciação in vitro de linfócitos T CD4 em culturas Th1, Th2, Th17 ou iTreg	38
3.11.5 Citometria de fluxo	38
3.11.6 Marcação intracelular para o fator de transcrição Foxp3	39
3.12 Análise de apoptose via fragmentação de DNA (HFS)	40
3.13 Hipersensibilidade tardia (DTH)	40
3.14 Ensaio de proliferação	41
3.15 Análises estatísticas	41

4 RESULTADOS	42
4.1 Relevância dos receptores de membrana da melatonina no processo de AICD em linfócitos T CD4+	42
4.2 Melatonina aumenta a sobrevivência de LTCD4 estimulados por mDC+pOVA, independentemente de MT1/2	44
4.3 Melatonina inibe a expressão de CD95L nas quatro populações de LTCD4	47
4.4 As populações de LTCD4 são resistentes à morte por AICD induzida com anti-CD3	49
4.5 Melatonina promove a diferenciação para os perfis Th1 e Th2 e reprime a diferenciação de Th17	51
4.6 Efeito estimulador da melatonina em uma resposta imune mediada pelos LTCD4	54
4.7 O efeito estimulador da melatonina não depende da sinalização de CD95	58
4.8 A melatonina provoca o aumento do número de LTCD4 específicos do antígeno	60
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Linfócitos TCD4+

Os linfócitos T CD4 (LTCD4) compõem uma população importante na resposta imune adaptativa. Estas células colaboram com outras da imunidade inata e adaptativa, para montar uma adequada resistência a infecções e tumores dependendo do patógeno ou agente imunógeno. Assim, elas se diferenciam para um perfil Th1, na presença de infecções por microrganismos intracelulares e Th2, para os extracelulares, prevalecendo uma imunidade celular ou humoral respectivamente. São varias as funções dos linfócitos T CD4⁺ sendo algumas delas: a produção de citocinas determinantes do tipo de resposta mais adequada, ativação de linfócitos B específicos, ativação de linfócitos T CD8⁺ e ativação de macrófagos. Outra das principais características destas células, que é compartilhada com os linfócitos B e T CD8⁺, é a geração e a permanência de uma pequena população de memória específica e de vida longa após uma resposta imune. Por tais razões, linfócitos T CD4⁺ formam uma população de grande interesse já que orquestram o funcionamento de muitas outras células.

Os precursores de LTCD4 são gerados na medula óssea e amadurecidos no timo no qual passam pelo processo de educação tímica que consiste na eliminação por apoptose das células que são incapazes de reconhecer o MHC próprio ou ligam com alta afinidade seu receptor de linfócito T (TCR) ao complexo MHC clase II-peptídeo apresentado pelas células residentes. Logo após ter atravessado o timo, os LTCD4 naive migram para a periferia e circulam com seu tempo de vida limitado.

Durante uma resposta imune contra um determinado patógeno, as células apresentadoras de antígenos (APCs) da imunidade inata, macrófagos e células dendríticas, fazem o primeiro contato com o microrganismo. Isso acontece mediante ligação dos receptores de reconhecimento de padrões (PRR - *Pattern recognition receptor*), tais como membros da família TLR (*TOLL-like receptors*) ou NLR (*NOD-like receptors*), localizados na superfície e no interior das APCs, respectivamente, com moléculas provenientes de microrganismos chamadas PAMPs (*Pathogen-associated molecular pattern*) (AKIRA et al., 2006). Em seguida, a sinalização destes receptores da imunidade inata, levam à secreção de citocinas pró-inflamatórias e estimulação das moléculas coestimuladoras CD80 e CD86. Com

isso forma-se um contexto inflamatório no qual LTCD4 específicos de antígenos, conseguem ser ativados. LTCD4 naives circulantes ligam especificamente seu TCR ao complexo MHC-peptídeo apresentado pela APC, com isto tem-se o primeiro sinal recebido pelo LTCD4. Em seguida, o segundo sinal é fornecido pela ligação das moléculas coestimuladoras CD80 e CD86, expressas pelas APCs, com a molécula CD28 do LTCD4. Finalmente, citocinas do microambiente representam o terceiro sinal de ativação de LT e fazem com que os LTCD4 específicos se diferenciem para um perfil Th1 na presença de IL-12, Th2 na presença de IL-4, Th17 na presença de IL-23, IL-21 e IL-6 ou iTreg na presença de TGF- β e IL-6 (SCHMITT; UENO, 2015). Em conjunto esses três sinais proporcionados pela APC levam o linfócito TCD4⁺ a se diferenciar em um linfócito T efetor. LTCD4 ativados produzem e utilizam IL-2 para iniciar a expansão clonal e assim aumentar o número de linfócitos da mesma especificidade. Consequentemente, aumenta o número de células efetoras que eliminarão o patógeno através da secreção de citocinas moduladoras da atividade de outras células como o IFN- γ que ativa a ação microbicida dos macrófagos que contém patógenos no interior deles.

Uma vez que o sistema imune eliminou o patógeno, o organismo deve voltar ao equilíbrio caracterizado pela ausência de inflamação e de células ativadas. Para isso a população de linfócitos expandidos diminui na “fase de contração” da resposta imune mediante a morte celular dos clones produzidos durante a resposta. Este fenômeno caracteriza-se também pela permanência de uma pequena população de T CD4⁺ de memória que sobreviverá e agirá rapidamente nas respostas futuras contra o mesmo patógeno invasor. Desta forma se evita a presença de clones cronicamente ativados, potenciais geradores de desordens autoimunes. Além disto, caso não ocorra esta retração clonal, a população linfocitária expandida pode competir por fatores de crescimento durante a geração de novas respostas imunes. A morte acontece através de um programa geneticamente controlado denominado apoptose (GREEN; AMARANTE-MENDES, 1998). Existem duas vias de indução de apoptose: a **via extrínseca**, que é ativada pela ligação dos receptores de morte (CD95, TRAIL-R1 e -R2, TNF-R1) com seus respectivos ligantes (CD95L, TRAIL e TNF- α), e a **via intrínseca**, que se desencadeia pela ativação de membros pró-apoptóticos da família BCL-2. Ambas as vias provocam a ativação de membros da família das caspases (*cysteine-aspartic acid proteases*), particularmente das caspases efetoras, como a CASPASE-3, 6 e 7 as quais promovem a clivagem de diversos substratos que darão o fenótipo de apoptose.

O estudo da morte dos LTCD4 durante a fase de retração da resposta imune é de grande relevância devido às complicações observadas na sua ausência em situações de linfoacumulação e geração de doenças autoimunes, ou na situação contrária frente ao aumento exagerado e patológico desta morte provocado às vezes por infecções retrovirais que diminuem as quantidades normais de Linfócitos T ao ponto de comprometer imunologicamente o indivíduo afetado.

1.2 Morte celular de LTCD4 ativados após resposta imune, ACAD e AICD

No ambiente há uma imensa variedade de antígenos que entrarão em contato com as APCs para serem apresentados aos linfócitos T. Mas o sistema imune reage quando reconhece estruturas moleculares diferentes àquelas que compõem nosso organismo. Isso porque durante a educação tímica, LTCD4 autorreativos foram eliminados através da tolerância central. Portanto, os linfócitos que se encontram na periferia estão prestes a reconhecer todo tipo de antígenos provenientes do exterior, sendo que antígenos de alimentos ou inócuos não provenientes de microrganismos, são apresentados num microambiente em que existem diversos meios de regulação do sistema imunológico (CHAHINE; BAHNA, 2010).

No desenvolvimento de uma resposta imune, foi mostrado que a troca de estado de resistente para sensível à morte de LTCD4 *naive* para diferenciados respectivamente, durante a ativação celular, está associada à diminuição dos níveis proteicos de c-FLIP, regulador anti-apoptótico da sinalização de receptores de morte (SCHMITZ et al., 2004). Também a proteção à morte pode ser dada pela expressão de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2, como Bcl-_{XL} e Bcl-2 (SCHMITZ et al., 2003). Por fim, outra forma de inibir a morte de LTCD4 é através da inibição da expressão de CD95L pela sinalização do co-estímulo de CD28 (KIRCHHOFF et al., 2000).

Infecções com microorganismos podem desencadear dois tipos de respostas dependendo do tempo que leva para sua resolução. Eles podem desencadear uma resposta de curta duração em infecções agudas com eliminação rápida do patógeno, ou longa durante as infecções crônicas que ainda apresentam antígenos devido à latência intracelular de alguns tipos de patógenos. A permanência de LTCD4 ativados, protegidos da morte, permite a continuação da ação efetora destes até resolver a infecção. Por tanto, a regulação

da morte de LTCD4 ativados determina a extensão da resposta e dentro desse contexto são conhecidos dois tipos de morte de LTCD4 executados por mecanismos diferentes: **ACAD** e **AICD**.

Na presença de um patógeno, o sistema imune tenta erradicá-lo com a ativação das células do sistema imune adaptativo, até limpar o organismo de antígenos procedentes do microrganismo. Assim, enquanto houver antígenos sendo apresentados, citocinas pró-inflamatórias serão produzidas, e o sistema continua trabalhando. Por sua vez, na fase final da resposta imune, há diminuição de antígenos patogênicos e em seguida, diminuição da apresentação antigênica, que levará à detenção da produção de fatores de crescimento pelas APCs. Com isto, LTCD4 que foram ativados, percebem a carência de sinais de sobrevivência e aumentam a produção da molécula BIM, um membro pro-apoptótico da família BCL-2, que posteriormente induzirá a ativação de BAK e BAX para executarem o primeiro e irreversível evento de morte; a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol (HILDEMAN et al., 2002). Este processo é conhecido morte autônoma de linfócitos T ativados, **ACAD** (*Activated T Cell Autonomous Death*).

A segunda via de indução de apoptose em LTCD4 corresponde à morte por reativação do complexo TCR/CD3 ou **AICD** (*Activation-Induced Cell Death*) que foi descoberta pelo grupo do Dr. Douglas Green, quem a denominou e viu que tanto em hibridoma de linfócitos T quanto timócitos morrem por apoptose após estímulo da molécula CD3 do complexo TCR (BRUNNER et al., 1995). Esta morte se dá quando há constante estímulo do complexo TCR pelo complexo MHC-peptídeo da APC. LTCD4 primários, quando ativados possuem altos níveis da molécula c-FLIP, um homólogo “inerte” de CASPASE-8 que inibe por competição a apoptose iniciada pela via extrínseca na ativação dos receptores de morte (ALGECIRAS-SCHIMNICH et al., 1999). Porém, quando LTCD4 reconhecem seu antígeno específico e são ativados, se inicia a produção de IL-2 e a expansão clonal, o que leva consequentemente à diminuição das quantidades protéicas de c-FLIP e as células ficam susceptíveis à morte induzida pelos receptores CD95, TNF-R1 ou TRAIL-R (LENARDO et al., 1999). Simultaneamente, há indução da expressão da molécula CD95L (molécula altamente regulada) na superfície de linfócitos ativados que ao ligar com seu receptor de morte CD95, colabora com a indução de morte parácrina destes (BRUNNER et al., 1995; DHEIN et al., 1995; RUSSELL et al., 1993). Com isto, se tem a diminuição drástica do número de LTCD4 permanentemente ativados e a eliminação daqueles clones possivelmente autorreativos,

remanescentes de uma resposta imune (KIVITY et al., 2009). A expressão de CD95L nos LTCD4, também pode induzir a morte por apoptose das células apresentadoras de antígenos e indiretamente diminuir a produção de citocinas (GREEN, 2008).

1.3 AICD, papel do CD95L

A regulação da expressão de CD95L (FASL) em linfócitos T ativados no final da resposta imune determina indiretamente o destino destas células e define a população de memória que será resistente à morte por AICD. O mecanismo pelo qual células de memória são protegidas da morte ainda não foi revelado, mas provavelmente exista um nível de diferenciação que as torna resistentes frente a um segundo estímulo do TCR. Alguns trabalhos suportam esta hipótese ao demonstrarem como o nível de diferenciação do linfócito T pode modificar a sinalização do complexo TCR/CD3 para determinar a susceptibilidade ou a resistência à morte por AICD. A determinação de resistência a AICD pode ser explicada através da interferência da sinalização do TCR sobre a cascata *downstream* do receptor FAS (SUDA et al., 1996; VARADHACHARY et al., 1997). Em relação a isto, as proteínas tirosina quinases que formam parte da ativação de linfócitos T, também participam da apoptose dessas células. A expressão de CD95L induzida pelo TCR é dependente da ação das quinases Lck e ZAP-70. A ativação dessas proteínas iniciais da sinalização do complexo TCR/CD3 sensibiliza as células para a morte por AICD (ZHANG et al., 2004). Por outro lado, a resistência à morte pode ser devida pela ação de fatores liberados no meio extracelular durante a apresentação antigênica que podem influenciar a transcrição gênica do CD95L, aumentando-a ou reprimindo-a. Em relação a isto, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a PGE2 (prostaglandina E2), produzida por macrófagos estimulados com LPS (lipopolisacarídeos), consegue modular negativamente o CD95L de LTCD4 ativados e bloquear a morte por AICD (WEINLICH et al., 2008).

Foram descritos vários fatores de transcrição que reconhecem os elementos de resposta no promotor de CD95L, dentre deles temos NFAT, NF κ B, Egr1 e 3, AP-1, SP-1, IRF-1 (ZHANG et al., 2004). Na ativação dos linfócitos T pela ligação de seu TCR na presença de moléculas coestimuladoras, o fator de transcrição NFAT é desfosforilado de maneira dependente da calcineurina e, portanto ativado para translocar ao núcleo induzindo a produção de CD95L dentre outras moléculas (HOLTZ-HEPPELMANN et al., 1998; LATINIS et

al., 1997). Assim como a via do NFAT, outras vias de sinalizações podem agir diretamente na indução deste ligante de morte chave de apoptose. Na procura de moléculas capazes de regular CD95L foi que nosso grupo publicou um trabalho que mostra a melatonina (MLT) capaz de inibir a morte por AICD de hibridomas de LTCD4 DO11.10 (PEDROSA et al., 2010). O mecanismo pelo qual a MLT consegue inibir a morte de linfócitos T baseia-se na inibição da desfosforilação do NFAT impedindo a translocação deste fator para o núcleo celular (PEDROSA et al., 2010).

1.4 Melatonina

A melatonina (MLT) foi considerada por muito tempo apenas um hormônio importante para o controle do ritmo circadiano dos organismos vivos. Ela é uma molécula evolutivamente ancestral e esta presente em bactérias, organismos eucariotos unicelulares, invertebrados e vertebrados, algas, plantas e fungos, assim também em frutos e sementes (HARDELAND; POEGGELER, 2003). MLT é secretada principalmente pela glândula pineal no cérebro e cuja concentração no soro varia durante o dia, sendo observado um pico de produção no período da noite entre as 0-2 da madrugada. O padrão circadiano da produção pineal de MLT é regulado pelo relógio biológico central residente em mamíferos dentro do núcleo supraquiasmático hipotalâmico. Esta região do cérebro é controlada pelo ciclo claro-escuro na qual a luz percebida pela retina é transmitida para o núcleo hipotalâmico via o trato retinohipotalâmico (BERSON, 2007). Por meio da sinalização dos receptores β -adrenérgicos em resposta a noradrenalina, a pineal recebe informação do período do escuro e é induzida, por sua vez, a produção da principal proteína de síntese da melatonina, a AANAT que irá transformar a serotonina em melatonina (ZAWILSKA et al., 2009). Também em decorrência desta sinalização nervosa, há a ativação da PKA (proteína Kinase A) a qual fosforila a AANAT estabilizando-a e evitando a degradação dela (SCHOMERUS et al., 2000)

MLT é uma indoleamina (N-acetyl-5-methoxytryptamine) sintetizada a partir do triptofano coletado da circulação sanguínea e logo convertido em serotonina pela ação da enzima triptofano hidroxilase (TPH). A serotonina é convertida em N-acetilserotonina pela enzima arilalkilamina-N-acetil transferasa (AANAT), em seguida a N-acetilserotonina é metabolizada em melatonina pela enzima hidroxindole-O-metiltransferase (HIOMT) (PANDIPERUMAL et al., 2008). Esta molécula, além de possuir funções cronobiológicas, também

exerce funções importantes como antioxidante, oncostática e imunomoduladora (CARRILLO-VICO et al., 2013). Inicialmente a MLT foi purificada e identificada como um hormônio exclusivo da glândula pineal, mas posteriormente e com uso de anticorpos específicos foram encontrados outros sítios de produção extra-pineal tais como olho, trato gastrointestinal, órgãos principais do sistema imune (medula óssea e timo) e até a própria pele (CARRILLO-VICO et al., 2005a; GOMEZ-CORVERA et al., 2009).

Existem dois receptores de membrana de alta afinidade de MLT, denominados MT1 e MT2. Ambos são receptores acoplados a proteína G (GPCRs) e desencadeiam uma sinalização que leva à diminuição da produção de cAMP pela ativação da subunidade Gi do complexo GPCR (HARDELAND et al., 2012). Células imunes respondem a MLT pelo seu receptor MT2 e por meio deste regulam ambas as repostas, celular e humoral (DRAZEN; NELSON, 2001). Um terceiro receptor é o MT3, também conhecido como enzima quinone redutase 2, e a função dele não está bem compreendido embora sabe-se que pertença a um grupo de reductases que participam na proteção contra o estresse oxidativo (NOSJEAN et al., 2000). A MLT também se liga a alguns fatores de transcrição da superfamília do receptor orfão do ácido retinoico RZR/ROR, em particular a ROR α 1, ROR α 2, RZR α e RZR β (CARLBERG, 2000). Embora se saiba que a melatonina é um ligante destes receptores nucleares, a maioria dos trabalhos que envolvem o estudo da ativação deles usa o ligante sintético CGP52608, e não a melatonina propriamente dita, na transativação de genes *reporters* contendo elementos de resposta para estes fatores de transcrição (CARRILLO-VICO et al., 2003). Ainda não estão bem definidos os genes que estes receptores nucleares modulam. As expressões dos receptores nucleares foram descritos em monócitos e linfócitos e foram associados com a modulação imune (GARCIA-MAURINO et al., 2000). Outros sítios de ligação intracelular da MLT são às proteínas calmodulina (BENITEZ-KING et al., 1993) e calreticulina (MACIAS et al., 2003) do metabolismo de Ca²⁺ cuja afinidade é menor comparada a dos receptores de membrana, sendo requerida uma maior concentração (μ M) de MLT para sua ligação (**Figura 1**).

Figura 1. *Sítios de ligação para melatonina e suas faixas de afinidade.* FONTE: adaptado de (RADOGNA et al., 2010)

Começou-se a relacionar a ação da melatonina sobre o sistema imunológico através de algumas evidências. Fatos como a diminuição do timo e o baço após a pinealectomia e posterior reversão da involução tímica pela administração de MLT levaram a pensar sobre sua importância no controle do sistema imunológico (SRINIVASAN et al., 2008). Observou-se também que a pinealectomia alterou o ritmo de proliferação de leucócitos (DRAZEN et al., 2001), a produção de citocinas e a atividade de linfócitos NK em mamíferos (DEL GOBBO et al., 1989). A maioria das evidências mostrou a melatonina como uma molécula capaz de ativar e estimular o sistema imunológico. No entanto, ainda é controversa a verdadeira atuação da MLT na regulação do sistema imune, pois dependendo da fase da resposta ela poderia ter também um efeito anti-inflamatório (RADOGNA et al., 2010). Embora a melatonina da glândula pineal tenha mostrado uma função importante sobre o

funcionamento do sistema imunológico (ação endócrina), hoje se sabe que a melatonina produzida pelas células do sistema imune também influenciam de forma parácrina na função de células vizinhas. Em relação a isto, foi demonstrada a existência de um mecanismo de regulação da produção de melatonina que é mediado por citocinas no qual no decorrer de uma resposta imunológica a MLT da pineal não é mais produzida e inicia-se a produção de MLT pelas células imunes (MARKUS et al., 2013; PONTES et al., 2006).

A imunidade inata, também conhecida como natural, é a primeira linha de defesa do organismo contra microrganismos patogênicos que são rapidamente erradicados através de mecanismos bioquímicos e celulares presentes nesse tipo de imunidade. Por ser o primeiro contato com os agentes infecciosos, os elementos da imunidade inata tem a importante função de processar, apresentar e delinear uma efetiva resposta na conversa com o sistema adaptativo. Portanto, e considerando que a melatonina mostrou ter capacidade de incrementar a funcionalidade do sistema imunológico deprimido (SRINIVASAN et al., 2005) é que diversos estudos tem sido documentados sobre o efeito da MLT nas células do sistema imune inato (RADOGNA et al., 2010). Em monócitos e macrófagos foi reportado que a administração de MLT exógena estimula a produção destes na medula óssea e no baço de camundongos (CURRIER et al., 2000). MLT ajuda na secreção de citocinas IL-1, IL-6 assim como melhora a apresentação antigénica para linfócitos T pelo aumento da expressão de MHC-II (MORREY et al., 1994; PIOLI et al., 1993). O hormônio mostrou ter um efeito adjuvante na capacidade fagocítica de macrófagos em células de rato e murinas (MUXEL et al., 2012; PAWLAK et al., 2005).

As células dendríticas formam a população mais importante dentre as células apresentadoras de antígenos. Durante uma resposta imune, elas são as primeiras a migrar para os linfonodos drenantes próximos do local de infecção. Há poucos relatos sobre os efeitos que a MLT tem sobre esta população celular e entre esses achados se observou que a melatonina da pineal estimula ativamente a produção de IL-12 pelas células dendríticas (LISSONI, 1999; LISSONI et al., 1999). Reforçando este resultado viu-se também que a pinealectomia em hamster levou à diminuição da capacidade migratória de células dendríticas durante uma resposta imune (PRENDERGAST et al., 2013).

Os linfócitos matadores naturais (NK- *Natural killer cells*) compõem o terceiro maior subgrupo de linfócitos, correspondente a 10-15% dos linfócitos circulantes. Estas células cumprem um papel de relevância na eliminação de vírus e bactérias intracelulares. Em

relação aos efeitos reportados da MLT sobre os linfócitos NK podemos citar o resultado obtido em modelo *in vivo* no qual a administração de MLT induz o aumento no número dessas células na medula óssea e no baço (CURRIER et al., 2000). Paralelamente, existe evidência na clínica de pacientes com câncer que receberam tratamento de IL-2 e melatonina e obtiveram um incremento significativo no número de linfócitos NK após tratamento (LISSONI et al., 1992). Além do aumento no número celular, a MLT também influencia positivamente na atividade de linfócitos NK imunocomprometidos de animais idosos (TIAN et al., 2003). Em outro estudo comprovou-se que a MLT aumentou a capacidade de ADCC (citotoxicidade celular dependente de anticorpos) de linfócitos NK (GIORDANO; PALERMO, 1991).

Leucócitos possuem a maquinaria enzimática necessária para sintetizar MLT que atua de forma parácrina ou autócrina na comunicação com outras células do sistema imune independente da glândula pineal (PANDI-PERUMAL et al., 2008). De forma complementar com estes achados, viu-se que a quantidade de MLT endógena produzida por células imunes foi superior à encontrada no soro humano noturno (CARRILLO-VICO et al., 2004). Simultaneamente, estas células também expressam os receptores nucleares e de membrana da MLT, o que suporta a ideia da ação local da MLT por elas produzida. De fato, esta inter-relação entre a MLT produzida e sua função pode ser exemplificada em estudos feitos em linfócitos T CD4 da linhagem Jurkat que produzem IL-2 em resposta à MLT endógena. Dita produção de IL-2 foi bloqueada pelo uso do antagonista dos receptores MT1/MT2, luzindole (LARDONE et al., 2009). Dessa forma, observa-se a função direta na própria célula Jurkat da MLT produzida. O bloqueio da síntese de MLT pelos LTCD4 ou a inibição da sinalização do receptor MT1 tem como consequência a diminuição do nível de ativação evidenciado através da diminuição de CD25 e IL-2 (CARRILLO-VICO et al., 2005b; LARDONE et al., 2010). Fenômeno que foi revertido com a adição de MLT no meio de cultura de células que foram privadas de sintetizar melatonina (LARDONE et al., 2006).

Outros estudos foram realizados a fim de verificar o efeito da MLT (exógena) sobre as células do sistema imune. Para tanto, mostraram-se que células mononucleares de sangue periférico humanas (PBMC-*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) contendo por sua vez monócitos e linfócitos, que foram induzidas com MLT produziram IL-2, IL-6 e IFN- γ (GARCIA-MAURINO et al., 1997). Também, por aumentar a produção de IL-12, a melatonina consegue diferenciar os linfócitos TCD4 para um perfil Th1 e assim auxiliar a atividade dos linfócitos NK

(*natural killer*) através da produção de IFN- γ (GARCIA-MAURINO et al., 1999). Por outro lado, alguns estudos demonstram que a melatonina também pode agir como um terceiro sinal para promover a proliferação de LTCD4 em resposta ao estímulo TCR/CD3 + anti-CD28 (RAGHAVENDRA et al., 2001). Contudo, uma das primeiras evidências que demonstraram o efeito direto da MLT sobre a sobrevivência da população de LTCD4 vem de observações feitas em rato nas quais se viu que a administração de MLT em animais imunizados com CFA resultou em um aumento do número de células no compartimento T CD4 em relação ao controle não imunizado (CASTRILLON et al., 2000).

1.5 Melatonina controla a morte de células imunes

A participação da melatonina no processo de apoptose de diversos tipos celulares é alvo de intenso estudo em uma variedade de doenças tais como imunodeficiências, neurodegeneração e câncer. A versatilidade da MLT para agir como molécula pró-apoptótica em células transformadas e anti-apoptóticas em células saudáveis é a qualidade que mais atrai os pesquisadores (SAINZ et al., 2003). Neste trabalho, considera-se com maior atenção o estudo da capacidade da MLT em resgatar da morte células já comprometidas como é o caso de linfócitos T CD4⁺ no fim da resposta imune.

As ações anti-apoptóticas de melatonina na via extrínseca de apoptose foi observado em modelo de colite, induzido por DNBS, que na presença de MLT (15 mg/Kg) houve uma redução da expressão de CD95L nas células não imunes do colón (MAZZON et al., 2006). Este resultado confirma a habilidade que a MLT tem para regular negativamente a expressão gênica do ligante de morte CD95L, corroborando dessa maneira os dados por nós publicados (PEDROSA et al., 2010).

Diversos achados mostraram a ação anti-apoptótica da melatonina por modificações na expressão proteica e nível de ativação de membros pró-apoptóticos e anti-apoptóticos da família Bcl-2. A proteína anti-apoptótica Bcl-2 exerce sua função ao inibir a dimerização de BAX e a subsequente translocação para a membrana externa da mitocôndria, evitando dessa maneira a indução de apoptose pela permeabilização da membrana mitocondrial e liberação para o citosol de componentes pró-apoptóticos como citocromo c (RADOGNA et al., 2008). O balanço entre Bcl-2 e Bax, determina a predisposição à morte por apoptose ou sobrevivência das células. Melatonina possui a capacidade de interferir nesse balanço por

regular positivamente Bcl-2 e negativamente Bax via ativação de NF- κ B (CRISTOFANON et al., 2009; ESPINO et al., 2010). No entanto, melatonina também poderia alterar o estado de sobrevivência da célula ao evitar a dimerização mediada por ligações di-ssulfeto de Bax, que estimulam a mobilização da proteína para a mitocôndria (D'ALESSIO et al., 2005). Este fenômeno é estimulado principalmente pela capacidade antioxidante da melatonina ao induzir a redução da ligação S-S e bloquear assim a dimerização de BAX. A inibição da ativação de BAX pela MLT também pode ser devida através da re-localização na mitocôndria de BCL-2 e posterior sequestro de BAX em prevalentes heterodímeros BCL-2/BAX (RADOGNA et al., 2008; RADOGNA et al., 2010).

1.6 Melatonina e doenças mediadas por LTCD4

A população de LTCD4 é ativada para direcionar e construir a resposta mais eficiente. Por isso, o perfil de diferenciação e a sobrevivência destas células são duas particularidades relevantes para a regulação imune. A maioria das doenças autoimunes humanas inicia-se pela ativação de linfócitos T CD4 específicos para auto antígenos, deixando as populações de linfócitos T citotóxicos, linfócitos B e macrófagos como participantes ativos da lesão. E os modelos animais de muitas delas representam a ferramenta de escolha para o estudo do comportamento de linfócitos T CD4 e dos fatores que contribuem para o controle da severidade de tais doenças. Dessa maneira, sobre a associação da melatonina com as doenças autoimunes foram publicados dados que mostram os diversos impactos do hormônio sobre algumas dessas doenças. A esclerose múltipla é uma doença autoimune desmielinizante e inflamatória do sistema nervoso central e caracteriza-se pela perda da bainha de mielina dos neurônios pelo ataque de linfócitos T CD4 específicos do antígeno. A encefalomielite autoimune experimental (EAE) é o modelo animal frequentemente utilizado devido as similaridades clínicas e histopatológicas. Há evidências divergentes sobre a associação da melatonina com o desenvolvimento do EAE. Por um lado, foi registrado que o tratamento com melatonina contribuiu para a resistência do desenvolvimento do EAE (ALVAREZ-SANCHEZ et al., 2015; FAREZ et al., 2015) e por outro viu-se que a melatonina poderia participar na estimulação da doença (CONSTANTINESCU et al., 1997).

A artrite reumatoide é uma doença autoimune inflamatória desencadeada pela geração de LTCD4 que reconhecem autoantígenos localizados nas junções e caracteriza-se

pela erosão da cartilagem e o osso. O modelo animal mais usado é a artrite induzida com colágeno (CIA – *collagen-induced arthritis*). Em relação à melatonina sobre a artrite reumatoide foi reportado um estudo no qual observou-se que o escuro constante, isto é com alta produção de melatonina, promoveu o desenvolvimento de CIA (HANSSON et al., 1990), da mesma forma que injeções subcutâneas diárias de 1mg/Kg de melatonina em camundongos DBA/1 agravou a CIA via o aumento do *priming* para linfócitos T (HANSSON et al., 1992). Assim estes achados sugerem um efeito estimulador da melatonina na doença da artrite reumatoide.

A diabetes mellitus Tipo 1 é uma doença autoimune órgão específica que resulta da destruição das células β das ilhotas pancreáticas e foi caracterizada como sendo mediada por linfócitos T CD4. O camundongo NOD que espontaneamente desenvolve diabetes, muito similar à doença em humanos, é considerado o modelo animal para esta doença. Foi mostrado um fenótipo dominante do perfil Th1 nos animais NOD, o qual manifesta um aumento de IFN- γ pelos LTCD4 ativados (KOARADA et al., 2002). Ao contrario do reportado para a doença da artrite reumatoide, na diabetes mellitus tipo 1 foi feito um estudo no qual observou-se que o tratamento prolongado com melatonina nos animais NOD aumentou o tempo de vida media dos animais, enquanto a pinealectomia acelerou o desencadeamento da diabetes autoimune (CONTI; MAESTRONI, 1996). Confirmando o efeito supressor da melatonina na diabetes, demonstrou-se que o tratamento com altas doses de melatonina prolongou a sobrevivência de ilhotas pancreáticas transplantadas e observaram um aumento da produção da citocina supressora IL-10 (LIN et al., 2009).

As doenças de Crohn e a colite ulcerativas são desordens autoimunes coletivamente referidos como doenças de intestino inflamado (IBD – *Inflammatory Bowel Disease*). O acúmulo de células do sistema imune no tecido intestinal em pacientes com IBD é uma característica marcante. Th1 e Th2 são os perfis envolvidos no desenvolvimento da doença de Crohn e colite ulcerativa, respectivamente (NEURATH; FINOTTO, 2006). Porém, em estudos nos modelos murinos de IBD demonstrou-se que a via IL-23-Th17 tem um papel importante na patogênese dessas doenças (BARRETT et al., 2008). Os modelos animais mais comumente utilizados são aqueles induzidos com químicos, por exemplo, colite induzida com ácido sulfônico dinitrobenzeno (DNBS), ou com sulfato de sódio dextrano (DSS). Também estão os modelos de animais modificados geneticamente como os desenvolvidos no animal knockout de IL-10, transgênico de T-bet e STAT-4 (STROBER et al., 2002). Sobre a

ação da melatonina na IBD, um estudo viu que no modelo de colite com DSS a administração de melatonina reduziu a severidade da colite (NOSAL'OVA et al., 2007). Este resultado é consistente com outro estudo que utilizou o modelo de DNBS onde viram que a melatonina diminuiu a inflamação da colite através da sua ação anti-apoptótica, ao inibir a expressão de CD95L nas células do tecido intestinal (MAZZON et al., 2006).

Em consideração aos dados descritos na literatura sobre a ação da melatonina no função do sistema imune, observamos que alguns deles relatam a melatonina como um regulador positivo da resposta e por outro lado tem sido mostrado um efeito oposto, controlando a resposta. Esta divergência se observa melhor na descrição sobre a ação do hormônio em determinadas doenças autoimunes. Por tal motivo, nós achamos necessário o estudo da ação da melatonina sobre algumas características de LTCD4 para conseguir entender o impacto desta molécula nessa população linfocitária e ao mesmo tempo definir as circunstâncias nas qual isto acontece.

2 OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o efeito da melatonina na sobrevivência e na função de linfócitos T CD4 antígeno específico durante o desenvolvimento de uma resposta imunológica.

Metas específicas:

- Verificar em modelo in vitro a ação protetora da melatonina na morte por AICD de LTCD4;
- Verificar o efeito da melatonina na diferenciação para os perfis Th1, Th2, Th17 e Treg de linfócitos T CD4 efetores;
- Avaliar a ação imunomoduladora da melatonina em respostas imunes mediada por LTCD4;

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais

Os animais BALB/c, transgênico DO11.10, C57BL/6 (B6), transgênico OTII, C57BL/6^{lpr/lpr} (B6^{lpr/lpr}), duplos mutantes OTII^{lpr/lpr} e C57BL/6 CD4KO que foram utilizados são procedentes do biotério de animais isogênicos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas IV da USP. Para a realização dos experimentos foram utilizados animais machos de 8 semanas de idade.

Os procedimentos experimentais foram avaliados pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) do ICB-USP e cuja aprovação está registrada como protocolo N°52.

Os animais foram alojados em microisoladores mantidos em estantes ventiladas e tiveram acesso irrestrito à comida e água em ambiente com temperatura e umidade controladas, além de ciclo claro/escuro de 12 horas. Em todos os experimentos com animais, a melatonina foi adicionada às 18 horas, no início do período do escuro.

Os animais transgênicos DO11.10 (fundo BalbC) e OTII (fundo C57BL/6) possuem uma construção gênica de TCR bem sucedido em linfócitos T CD4 que reconhece o peptídeo da OVA₃₂₃₋₃₃₉ no contexto de MHCII. Os animais C57BL/6^{lpr/lpr} são animais deficientes para a proteína CD95 (FAS) dado que possuem um fragmento adicional proveniente de um transposon inserido no intron 2 que alterou a pauta de leitura da proteína (WATANABE-FUKUNAGA et al., 1992).

3.2 Reagentes

Os reagentes utilizados para cultura de células, reações de PCR, extração de RNA, conversão para cDNA e PCR em tempo real foram da Life Technologies Corporation. Os anticorpos utilizados para marcação de citometria de fluxo foram obtidos da BD Biosciences. Os anticorpos conjugados utilizados neste trabalho são: CD3-FITC, CD4-APCCy7, CD69-PECy7, CD95L-PE, Anexina V-FITC, CD11c-PACIFIC BLUE, CD80-APC, CD40-PE. A melatonina, o LPS, a ovalbumina grau V e II e o adjuvante completo de Freud (CFA) foram obtidos da Sigma-Aldrich. O peptídeo OVA₃₂₃₋₃₃₉ foi providenciado pela empresa ProteinMax. Os

oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR em tempo real foram da EXXTEND. O antagonista da melatonina, luzindole foi adquirido da Alexis Biochemicals cat.550-184-M025.

3.3 Indução de morte por AICD em hibridoma DO11.10

Quinhentas mil células foram expostas ao anticorpo anti-CD3 (clone 145.2C11) em placa de 96 poços (fundo reto) por 18 h em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Para imobilização do anticorpo anti-CD3, 1 µg/ml deste anticorpo em tampão Tris 50 mM pH9,0 foram colocados em cada poço por 2 h a 37 °C e 5% de CO₂. Após esse período, as células foram marcadas com o anticorpo Anexina V-FITC e posteriormente foi avaliada a morte pelo auxílio do citômetro Calibur. Anexina V liga-se na fosfatidilserina externalizada em células que estão na fase inicial do processo de morte por apoptose.

3.4 Extração de RNA

Para a extração de RNA pelo método do TRIZOL foram ressuspensas em 0,5 ml do reagente TRIZOL uma quantidade de até 5x10⁶ da célula de interesse. Após 5 min. de incubação em temperatura ambiente, foi adicionado 0,1 ml de clorofórmio seguida de nova incubação por 2 min. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 min a 4 °C e a fase superior aquosa foi transferida para um novo tubo. Foi então adicionado 1 vol de isopropanol (0,25 ml) seguido por uma incubação a -20 °C por 1 h. As amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante foi descartado, recuperando-se o precipitado de RNA. Meio mililitro de Etanol 75% foi adicionado e as amostras foram centrifugadas a 7500 g por 5 min a 4 °C. O precipitado foi seco e ressuspensado em água destilada, livre de RNase e DNase. A quantificação foi feita utilizando-se um espectrofotômetro (SpectraMax 190 – Molecular Devices) com comprimento de onda de 260 nm, a contaminação com etanol foi verificado no comprimento de 230 nm e de proteínas no de 280 nm. A integridade do RNA obtido foi verificada por gel de agarose 1,5%.

3.5 Síntese de cDNA

Quantidade iguais de RNA, de um a três microgramas para todas as amostras, foram diluídas em 11 µl de água livre de RNase. Foi adicionado 500 ng de oligo dT, seguido de aquecimento a 70 °C por 10 min e rápido resfriamento em gelo. Acrescentou-se 8 µl do mix Superscript (4 µl de Tampão 5x; 1 µl de dNTP 10 mM; 2 µl de DTT 0,1 M e 200 U Superscript III R/T) e incubou-se a 50 °C por 50 min. A enzima foi inativada incubando a reação a 72 °C por 15 min seguidos por 5 min a 4 °C. A qualidade do cDNA sintetizado foi verificada por RT-PCR de β -actina e os primers utilizados foram os seguintes *Forward*: TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA G; *Reverse*: TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G

3.6 Quantificação da expressão gênica por qPCR

A reação de qPCR (PCR quantitativa) avalia o acúmulo do produto da reação de amplificação em sua fase logarítmica, o qual está diretamente relacionado à quantidade de molde existente no início da reação. Este é atualmente um método considerado preciso e reprodutível para quantificação da expressão gênica. Para as reações de qPCR foi utilizado o kit Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG da Life Technologies Corporation. Cada reação era composta de 6,25 µl de SYBR, 0,75 µl de cada primer (10 µM) e 50 ng de cDNA e água quantidade suficiente para o volume final de 12 µl. O perfil térmico aplicado foi o seguinte: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 30 s a 95 °C e 1 min a 60 °C. O equipamento e o *software* utilizados foram Stratagene 3005P^{TM} e MxPro^{TM}QPCR. Os primers murinos utilizados foram *Hprt* *Forward*: GAA AAG GAC CTC TCG AAG TGT TG; *Reverse*: GTA CTC ATT ATA GTC AAG GGC ATA TCC A, *cd95l* *Forward*: AAC CCC AGT ACA CCC TCT GAA A *Reverse*: GGT TCC ATA TGT GTC TTC CCA TTC.

Duas análises podem ser utilizadas para quantificar a expressão gênica, a quantificação absoluta e quantificação relativa. Os métodos de comparação de Cts foram utilizados neste trabalho para comparar a expressão relativa dos genes estudados. Para os cálculos de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, considerou-se que durante a reação de qPCR a fluorescência aumenta a cada ciclo e atinge um limiar (*threshold*) no qual as amostras podem ser comparadas. Quanto maior o número inicial de fitas molde, mais cedo a fluorescência poderá ser observada. Para cada amostra, o "*threshold cycle*" (Ct) obtido na fase exponencial da reação, foi analisado para os genes de interesse assim como para um controle endógeno cuja expressão não apresente diferença estatística, sendo nesse caso o *Hprt*. A diferença entre os

valores dos Cts (ΔC_t) foi calculada para cada gene de interesse respeito ao controle endógeno nas células em cada uma das condições. Para a obtenção dos valores de $\Delta\Delta C_t$ foi feita a subtração dos valores de ΔC_t das células dos grupos testes dos ΔC_t das células do grupo controle. Finalmente o valor $2^{-\Delta\Delta C_t}$ é calculado para a obtenção da relação entre cada grupo e sua respectiva amostra de referência. Esse valor representa quantas vezes o gene está aumentado ou diminuído respeito à amostra controle (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.7 Geração de Células Dendríticas a partir de células da medula óssea

Camundongos BALB/c machos foram sacrificados com câmara de CO₂ e tiveram seus fêmures retirados e mantidos em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 µg/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 25 mM de HEPES. As células progenitoras da medula óssea foram retiradas com jatos de meio de cultura com o auxílio de seringa e agulha. Em seguida foram centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 completo colocadas em uma placa de petri de 10 cm com 10 ng/ml de GM-CSF recombinante murino (Peprotech cat. 315-03) e incubadas a 37 °C por 4 dias em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Após este período foi adicionado 10 ng/ml de GM-CSF e as células foram incubadas por mais 3 dias a 37 °C. Ao término do protocolo de geração foram coletadas as células que encontraram-se em suspensão. Quando necessário para as diferentes condições experimentais, as células dendríticas foram estimuladas com 1,5 µg/ml de LPS (SIGMA-ALDRICH cat. L4525) no sétimo dia por 24 h.

3.8 Geração de Blastos LTCD4

Um camundongo transgênico DO11.10 macho foi sacrificado com câmara de CO₂. O baço foi removido e mantido em meio de cultura RPMI 1640 vitaminado (10% SFB, 2 mM de L-glutamina, 100 µg/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 25 mM de HEPES, 100 µM de vitamina, 100 µM de aminoácidos, 100 µM β-2-Mercaptoetanol, 1 mM piruvato de sódio, 50 ng/ml gentamicina). O baço foi processado com auxílio de agulha em placa de petri para obtenção das células contidas dentro da capsula do órgão. As células foram disgregadas, centrifugadas e posteriormente as hemácias foram lisadas com tampão

hemolítico por 2 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente foi adicionado meio de cultura vitaminado para neutralizar a ação do tampão hemolítico e as células foram centrifugadas e contadas na câmara de Neubauer. Para geração de blastos de linfócitos T CD4, 3×10^6 células foram colocadas em cultura na presença de 5 µg/ml de ConA em volume final de 2 ml/poço. Após 48 horas as células foram lavadas para retirada da ConA e plaqueadas novamente na presença de 100 U/ml de IL-2 recombinante murina em volume final de 2 ml. Após 48 horas o conteúdo de cada poço foi expandido para mais dois poços e foi adicionada 100 U/ml de rIL-2. Depois de transcorridos 4 dias, as células viáveis foram separadas por gradiente de ficoll e em seguida foram utilizadas para os experimentos de cocultura com células dendríticas.

3.9 Cocultura de células dendríticas e blastos de LTCD4

As células dendríticas foram amadurecidas com LPS 1,5 µg/ml 24hs antes da cocultura em placa de 96 fundo U. Ao término da geração de blastos, 36×10^6 células foram marcadas com 1 µM de *celltrace*-violeta (kit de proliferação- Molecular Probes cat. C34557) seguindo as instruções do fabricante. As células dendríticas foram pulsadas com 10 µg/ml do peptídeo OVA₃₂₃₋₃₃₉ por 3 horas. Um grupo de blastos de LTCD4 marcados receberam pré-tratamento de 30 min com luzindole 10 µM antes da cocultura. No momento da cocultura foi adicionado 1mM de melatonina. Finalmente, dendríticas e linfócitos T CD4 foram cultivados na proporção de 1 para 2, respectivamente por 24hs. Após este período, as células foram coletadas e marcadas com anticorpos para citometria de fluxo.

3.10 Marcação para Citometria de Fluxo

5×10^5 células foram centrifugadas a 240 g por 5 min a 4 °C e ressuspensas em 200 µl de PBS enriquecido com 5% de Soro Fetal Bovino e 0,1% azida sódica (*Staining Buffer*). Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspensado em 25 µl da mesma solução contendo os anticorpos desejados na concentração determinada pelo fabricante de cada um deles. Após 30 min de incubação a 4 °C no escuro, as células foram lavadas duas vezes em 200 µl de *Staining Buffer*. A análise foi realizada por citometria de fluxo, utilizando o

aparelho FACSCanto (BD Biosciences), que possui capacidade de leitura simultânea de sete diferentes fluorocromos.

3.11 Diferenciação de linfócitos T CD4

3.11.1 Cultura celular

Todas as culturas de células foram mantidas em DMEM (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), NaHCO_3 (40 mM), NaH_2PO_4 (1 mM), piruvato de sódio (1 mM), solução de vitaminas MEM 1x, solução de aminoácidos MEM essenciais e não-essenciais 1x, L-glutamina (2 mM), β -mercaptoetanol (55 μM), HEPES (10 mM), penicilina (100.000 U/L) e estreptomicina (100 mg/L) (todos Gibco). Todas as culturas foram mantidas a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO_2 .

3.11.2 Anticorpos e citocinas recombinantes

Os anticorpos comerciais utilizados nas marcações para citometria de fluxo, com suas especificidades, seus respectivos clones e empresas fornecedoras se encontram na tabela a seguir.

Tabela 1- Lista de anticorpos utilizados

Especificidade	Clone	Fornecedor
Anti-CD3	17A2	eBioscience
Anti-B220	RA3-6B2	BD Pharmingen
Anti-CD4	GK1.5	BD Pharmingen
Anti-CD8	53-6.7	BD Pharmingen
Anti-IFN- γ	XMG1.2	BD Pharmingen
Anti-IL-4	11B11	eBioscience
Anti-IL-17	eBio17B7	eBioscience
Anti-CD44	IM7	eBioscience
Anti-CD62L	MEL-14	eBioscience
Anti-CD69	H1.2F3	eBioscience
Anti-CD25	PC61.5	eBioscience
Anti-Foxp3	FJK-16s	eBioscience

Todas as marcações foram realizadas segundo as especificações sugeridas pelo fabricante.

Os anticorpos neutralizantes utilizados nas culturas de células foram purificados a partir do sobrenadante de cultura de hibridomas em colunas de sefarose por imunoglobulinas do tipo IgG segundo as especificações do fabricante (GammaBind G Sepharose™, Amersham Biosciences). As especificidades e respectivos clones de cada um deles se encontra a seguir; anti-IFN- γ (XMG1.2); anti-IL-4 (11B11). Os anticorpos anti-CD3 (2C11) utilizados para estimulação também foram purificados de maneira idêntica aos citados anteriormente.

Os anticorpos anti-CD28 (37.51) foram obtidos da empresa Pharmingen. Os anticorpos anti-IgG utilizados para o *coating* das placas são policlonais e foram obtidos da empresa Cappel.

As citocinas recombinantes utilizadas IL-2; IL-4; IFN- γ ; IL-12; IL-6 e TGF- β foram todas obtidas da empresa PeproTech, e as concentrações utilizadas nas culturas estão discriminadas no protocolo de diferenciação *in vitro* das células T CD4.

3.11.3 Purificação e ativação de linfócitos T CD4

Os linfócitos T CD4 foram obtidos a partir de linfonodos periféricos (cervicais, braquiais, axilares e inguinais) de animais C57BL/6 *naive* e purificados por coluna magnética de seleção negativa (Dynabeads™) segundo as especificações do fabricante. Os graus de pureza obtidos após a purificação foram analisados por citometria de fluxo através de marcações com anticorpos monoclonais específicos para CD3, B220, CD4 e CD8. Após a purificação, as células foram cultivadas na concentração inicial de 10^6 células/ml de meio em poços de placas de cultura previamente tratados com 0,3 mg/mL de anti-IgG por 40 min a 37 °C. Aos poços foram adicionados 1 μ g/mL de anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 para o estímulo além de citocinas recombinantes e anticorpos neutralizantes indicados para cada condição. As placas foram mantidas em estufa úmida a 37 °C com uma atmosfera de 5% de CO₂.

Para o experimento que envolveu o acréscimo da melatonina no protocolo de diferenciação linfocitária, 1 mM de melatonina foi adicionada apenas no momento da ativação com anti-CD3 e anti-CD28.

3.11.4 Diferenciação *in vitro* de linfócitos T CD4 em culturas Th1, Th2, Th17 ou iTreg

Para obtenção de células diferenciadas nas populações Th1, Th2, Th17 ou iTreg, 10^6 células T CD4 *naïve* foram obtidas e ativadas *in vitro* com anti-CD3 e anti-CD28, de maneira idêntica à descrita no item anterior, na presença de citocinas e anticorpos neutralizantes que promovam condições polarizantes para cada um destes perfis conforme descrito a seguir:

Para a diferenciação Th1, utilizamos 5 ng/ml de IFN- γ , 5 ng/ml de IL-12 e 20 μ g/ml de anticorpo anti-IL-4. Para a diferenciação Th2, utilizamos 50 ng/ml de IL-4 e 100 μ g/ml de anticorpo anti-IFN- γ . Para a diferenciação Th17, utilizamos 5 ng/ml de TGF- β , 50 ng/ml de IL-6, 20 μ g/ml de anticorpo anti-IL-4 e 100 μ g/ml de anticorpo anti-IFN- γ . Para a diferenciação iTreg, utilizamos 5 ng/ml de TGF- β , 10 μ M de ácido retinóico (RA), 20 μ g/ml de anticorpo anti-IL-4 e 100 μ g/ml de anticorpo anti-IFN- γ .

A partir do dia 2 de cultura, as células foram expandidas dobrando-se diariamente a área e o volume das culturas através da transferência das mesmas para placas cujos poços possuísem o dobro da área e adição de mesmo volume de meio DMEM fresco contendo IL-2 recombinante (20 U/mL) para Th1, Th2 e iTreg ou em meio fresco livre de IL-2 para Th17.

No sexto dia de diferenciação a confirmação da polarização das culturas foi realizada por marcação intracelular para as citocinas específicas de cada um dos perfis efetores ou para o fator de transcrição Foxp3 para as culturas iTreg.

Uma vez obtidas as populações de linfócitos T CD4 diferenciadas pros diferentes perfis, nós separamos 1×10^6 células de cada perfil para a marcação intracelular de citocinas; 2×10^5 células por poço para a indução de AICD com anti-CD3 (1 μ g/ml) estimuladas na presença ou não de melatonina (1 mM) por 18 horas e posterior marcação em tampão HFS (*Hypotonic Fluorescent Solution*); e 5×10^5 células por poço estimuladas com anti-CD3 (1 μ g/ml) com e sem melatonina (1 mM) pelo período de 4 horas para posterior preparo para extração de RNA com TRIZOL.

3.11.5 Citometria de fluxo

A verificação dos percentuais de ativação dos linfócitos foi realizada através de marcações com anticorpos específicos para CD44, CD25 e CD62L, apenas no experimento onde as diferenciações foram feitas na presença ou não de melatonina.

Depois de ter realizado as diferenciações pros diferentes perfis, foram feitas as marcações intracelulares de citocinas. Pra isto, 2×10^6 células foram lavadas e ressuspensas em 3 ml de meio DMEM 10% SFB, e estimuladas com PMA e ionomicina, nas concentrações finais de 10 nM e 1 μ M respectivamente, por 6 horas a 37 °C em estufa úmida com uma atmosfera de 5% de CO₂. Após as 4h iniciais do estímulo, foi adicionada às culturas 10 μ g/mL de brefeldina para promover a estocagem das citocinas produzidas no citoplasma da célula. Após o estímulo, as células foram lavadas e fixadas por 16 h em uma solução de PBS contendo 2% de paraformaldeído.

Após a fixação, as células foram permeabilizadas em tampão de permeabilização (PBS contendo 1% de BSA e 0,5% de saponina), por 5 min a temperatura ambiente (T.A.). Após a permeabilização, foram adicionados anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos para a marcação de IFN- γ , IL-4 ou IL-17, e incubados por 40 min a T.A. no escuro. As marcações foram realizadas em um volume final de 100 μ l de tampão de permeabilização e as concentrações finais utilizadas de cada anticorpo foram as sugeridas pelo fabricante.

Após as marcações, as células foram lavadas 1x em tampão de permeabilização e 1x em tampão de FACS, e ressuspensas em tampão de FACS para a aquisição.

3.11.6 Marcação intracelular para o fator de transcrição Foxp3

Para avaliar a diferenciação para o perfil iTreg, 2×10^6 células de culturas diferenciadas para este perfil foram marcadas com anticorpos anti-CD25, segundo as especificações sugeridas pelo fabricante e posteriormente centrifugadas a 400 g por 7 min a 4 °C e ressuspensas em solução de fixação e permeabilização (*Fix/Perm buffer*) do kit para marcação intracelular para Foxp3 (eBioscience) por 16 h. Após este período, as células foram centrifugadas novamente e ressuspensas na solução permeabilização (*Perm. buffer*) do mesmo kit e posteriormente marcadas por 40 min através da adição de anticorpos específicos contra Foxp3. A marcação foi realizada por 40 min utilizando a concentração de anticorpo sugerida pelo fabricante a 4 °C, no escuro. Após a marcação, as células foram lavadas 2x em solução *Perm. buffer* e ressuspensas em tampão de FACS para a aquisição.

Para todos os experimentos realizados, as células foram adquiridas em citômetro de fluxo Becton Dickinson FACScan e analisadas utilizando o *software* FlowJo.

Para o ajuste das marcações em todos os casos foi utilizado um controle não marcado exceto para a marcação com o anticorpo Foxp3, em que foram utilizadas células T CD4 *naive* marcadas para a remoção do *background* da marcação.

3.12 Análise de apoptose via fragmentação de DNA (HFS)

O conteúdo de cada poço derivado dos tratamentos realizados, contendo 5×10^5 células, foi centrifugado a 240 g por 5 minutos a 4 °C e ressuspensionado em tampão hipotônico HFS [0,1% de Triton X-100, 0,1% de citrato de sódio e 50 µg/ml de iodeto de propídeo (PI)]. Estas células permaneceram por um período mínimo de 1 hora de incubação a 4 °C antes de serem analisadas por citometria de fluxo no citômetro FACScalibur (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA). O conteúdo de DNA produz um perfil gráfico dependente da fase do ciclo em que estas se encontram. Foram considerados eventos apoptóticos os núcleos hipodiplóides, que no gráfico aparecem à esquerda do pico G0-G1. Foi feito um *gate* utilizando-se os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) para a exclusão dos *debris*. Finalmente as amostras adquiridas no citômetro foram analisadas pelo *software Cell Quest*.

3.13 Hipersensibilidade tardia (DTH)

O protocolo de DTH foi realizado segundo os procedimentos descrito no trabalho de Titus (TITUS; CHILLER, 1981). Foram utilizados seis animais C57BL/6 machos de oito semanas de idade para cada grupo (n=6). Cada camundongo foi imunizado com 100 µg de ovalbumina (OVA) grau V (Sigma-Aldrich cat. A5503) emulsificada em parte igual com Adjuvante Completo de Freud (CFA Sigma-Aldrich cat. F5881). Um animal recebeu duas injeções de 50 µl da emulsão em ambos os lados na base da cauda. As injeções foram realizadas sempre no início do escuro. A injeção da emulsão contendo o antígeno nos grupos experimentais foi realizada seguindo uma ordem na qual primeiro foi imunizado o grupo controle sem melatonina, seguidamente adicionamos na emulsão quantidade necessária de melatonina diluída em etanol a 50 mg/ml de forma tal que cada animal receba 60 µg de melatonina na imunização do grupo experimental 3 mg/Kg. Quando foi a vez de imunizar o grupo experimental de 9 mg/Kg, nós adicionamos o restante da melatonina para que cada

animal receba 180 µg na imunização. Nos seguintes três dias foram realizadas injeções intraperitoneais de 3 e/ou 9 mg/kg de melatonina e etanol no grupo controle. No quarto dia após a imunização nós fizemos o desafio desses animais com 2% de OVA grau II agregada (Sigma-Aldrich cat. A5253). Previamente nós a preparamos com aquecimento em banho maria a 80 °C com agitação cada 15 minutos no período de uma hora, logo centrifugamos a 3000 rpm por 10 minutos e ressuspendemos em salina a 2%. Todos os animais em estudo receberam injeção no coxim plantar de OVA II na pata direita e salina na pata esquerda. As medições de incremento de espessura (mm) produzido pela resposta imunológica foram realizadas com auxílio de paquímetro por 24, 48 e 72 horas. Os dados da diferença entre as medições da pata que recebeu OVA da salina foram colocados em um gráfico e foi feita a análise estatística One-way ANOVA.

3.14 Ensaio de proliferação

Células de baço de animal OTII foram marcadas com 5 µM do corante vital *celltrace-VIOLETA* segundo indicações do fabricante. Por animal foram injetadas via intraorbital 1×10^7 células marcadas. Após 48 horas foi realizada a imunização com CFA+OVA com ou sem melatonina. Depois de três dias, os linfonodos drenantes (linfonodos inguinais) foram removidos e as células foram separadas com auxílio de lâminas de microscópio. Posteriormente as células foram marcadas com os anticorpos anti-CD4 e anti-TCR B6 Vβ5.1,5.2 e analisadas por citometria de fluxo. O cálculo de proliferação foi determinado através da seguinte fórmula (LIU et al., 2009):

$$\text{Índice de replicação} = \frac{((\% \text{ de células sem replicar}) + (2 \times \% \text{ divisão 1}) + (3 \times \% \text{ divisão 2}) + \dots)}{100} - 1$$

3.15 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software computacional Graphpad Prism v. 3.02 (Graphpad Software Inc.). O teste a ser usado foi One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Relevância dos receptores de membrana da melatonina no processo de AICD em linfócitos T CD4+

Inicialmente, fizemos uma nova curva de dose-resposta a proteção da melatonina sobre o fenômeno do AICD. Nós avaliamos três concentrações de melatonina, com diferenças de mil vezes entre elas, desde a concentração farmacológica (1 mM) até a fisiológica (1 nM). Na **Figura 2** observa-se que a melatonina somente na concentração de 1 mM de melatonina houve resposta de proteção da morte por AICD nos linfócitos T CD4, não havendo alteração dessa resposta nos tratamentos com as doses de 1 μ M e 1 nM. Isto foi avaliado tanto no nível de morte celular (A) quanto no da repressão da expressão do ligante de morte CD95L (B).

Figura 2. Melatonina inibe a morte por AICD e reprime a expressão de CD95L em hibridoma DO11.10 estimulado com anticorpo anti-CD3. (A) Células DO11.10 foram induzidas ao AICD com anti-CD3 (1 μ g/ml) e após 18 horas de incubação, as células foram marcadas com anexina V para a posterior avaliação por citometria de fluxo. (B) Para os experimentos de real time, as células foram incubadas por 5 horas com anti-CD3 (1 μ g/ml) e depois ressuspensas no reagente TRIZOL para a extração de RNA. O gene Hprt foi utilizado como controle endógeno. Para a análise estatística foi utilizado o teste One-way ANOVA post-test Tukey. P-value * $p < 0,05$ e *** $p > 0,001$.

Apesar de nosso grupo ter demonstrado que este efeito da melatonina é mediado pela sua ação sobre a calcineurina e, portanto, sobre a ativação de NFAT, o que independe dos receptores MT1 e MT2, não afastamos a possibilidade de que estes receptores pudessem também participar de alguma forma do efeito da melatonina sobre os LTCD4. Portanto, nós decidimos verificar o efeito do luzindole, um antagonista destes receptores sobre a ação da melatonina sobre o AICD. Previamente, nós realizamos uma curva dose-resposta para o luzindole na ausência da melatonina, para determinar um possível efeito citotóxico do antagonista. Fizemos nova indução de AICD com anti-CD3 em hibridomas DO11.10 e para os grupos experimentais tratados com luzindole, nós fizemos um pré-tratamento de 15 minutos a 37 °C com o reagente nas concentrações determinadas. Pudemos observar na **Figura 3** que as concentrações de 1 e 0,1 mM foram tóxicas para as células, no entanto as concentrações de 0,01 mM e 0,001 mM não alteraram a indução do AICD provocada pelo anti-CD3.

Figura 3. Receptores de membrana de melatonina MT1/2 AICD. Células DO11.10 foram previamente tratadas com quatro concentrações de luzindole por 15 minutos a 37 °C (1; 0,1; 0,01 e 0,001 mM) e induzidas ao AICD com anti-CD3 (1 µg/ml). Após 18 horas de incubação, as células foram marcadas com anexina V para a posterior avaliação de morte celular por citometria de fluxo. A análise estatística utilizada foi o teste One-way ANOVA post-test Tukey. P-value ***p>0,001.

Uma vez observado que as concentrações adequadas de uso do luzindole foram de 0,01 e 0,001 mM, foi possível avaliar, em seguida, o envolvimento dos receptores de membrana MT1/2 na proteção conferida pela melatonina no AICD. Para isso, colocamos a melatonina no meio de cultura após o pré-tratamento com luzindole e avaliamos morte

celular e expressão de CD95L. Nós observamos que a inibição da via de sinalização dos receptores MT1/2 não modificou a proteção da morte conferida pela melatonina (**Figura 4A**). Da mesma maneira, não houve alteração no efeito da melatonina sobre a expressão de CD95L na presença ou ausência de luzindole (**Figura 4B**). Em conclusão, podemos afirmar que a proteção contra AICD e o bloqueio da expressão de CD95L pela melatonina não envolvem os receptores MT1/2.

Figura 4. Proteção contra AICD pela melatonina não depende da sinalização via receptores MT1/2. Células DO11.10 pré-tratadas por 15 minutos com 0,01 e 0,001 mM de luzindole foram estimuladas com anti-CD3 (1 µg/ml) por 18 horas na presença ou não de 1 mM de melatonina. O luzindole foi também adicionado no meio de cultura durante a incubação com anti-CD3. Após a incubação as células foram marcadas com anexina V para a posterior avaliação da morte por citometria de fluxo. A análise estatística utilizada foi o teste One-way ANOVA post-test Tukey. P-value ***p>0,001.

4.2 Melatonina aumenta a sobrevivência de LTCD4 estimulados por mDC+pOVA, independentemente de MT1/2

O passo seguinte foi entender o papel da melatonina sobre LTCD4 em um contexto de apresentação antigênica. As células dendríticas são as encarregadas de apresentar peptídeos, direcionar a ativação de LTCD4 assim como controlar a morte por AICD através de

fatores solúveis liberados por elas (WEINLICH et al., 2008). Portanto, incubamos células dendríticas maduras apresentando peptídeo específico da ovalbumina com blastos pré-ativados de animal DO11.10 na presença ou não de melatonina.

A susceptibilidade à morte por AICD dos blastos foi observada quando pusemos células dendríticas maduras apresentando o antígeno específico da ovalbumina (**Figura 5A**). Dita morte não aconteceu na presença da célula apresentadora sem o peptídeo. Isto demonstra a necessidade do engajamento do complexo MHC:peptídeo com o TCR do linfócito T CD4 para a indução da morte por AICD, fenômeno que foi demonstrado em cultura de hibridomas de LTCD4 sem APC e por meio do uso de anti-CD3 como estímulo do TCR.

Como mostrado na **Figura 5**, a melatonina preveniu parcialmente a morte dos blastos provocada pelo contato com mDC+pOVA. Isto foi evidenciado mediante marcação com anexina V (**Figura 5B**). Um resultado similar foi observado ao avaliar a expressão proteica de CD95L no qual a melatonina também bloqueou de forma parcial, mas estatisticamente significativo, a expressão desta molécula (**Figura 5C**). Os resultados obtidos com a apresentação antigênica mostraram que na proteção da morte induzida por AICD pela melatonina, não haveria participação dos receptores de membrana da melatonina MT1/2, uma vez que o pré-tratamento com luzindole não alterou a porcentagem da morte medida apenas com melatonina e corroborando os resultados obtidos com a indução de AICD por anti-CD3 (**Figura 4**).

Quando colocamos os blastos junto com mDC+pOVA o nível de ativação, dimensionada pela medição da expressão de CD69, se mostrou superior frente à ausência do peptídeo. Também foi possível observar que nem a presença de melatonina e tampouco a do luzindole modificou este resultado (**Figura 5**). Isto indica que nessas condições experimentais, a melatonina não é capaz de regular o nível de ativação de linfócitos T CD4.

Figura 5. Melatonina protege LTCD4 da morte por reestimulação do TCR e reprime a expressão de CD95L. **A)** Expressão de CD69, CD95L e marcação por anexina V em subpopulação de linfócitos T CD4+CELL TRACE+ submetidos à cocultura por 24 horas com mDC+/-OVA, na presença ou não de melatonina 1 mM, com e sem pré-tratamento de 30 min dos blastos com luzindole (10 μ M). **B)** O gráfico representa os valores obtidos com a marcação com anexina V (FITC) na citometria de fluxo **C)**

O gráfico representa os valores obtidos para marcação de CD95L (PE) na citometria de fluxo. Para a análise estatística foi utilizado o teste One-way ANOVA P-value: *** $p < 0,001$. Os dados são representativo de dois experimentos independentes.

4.3 Melatonina inibe a expressão de CD95L nas quatro populações de LTCD4

Uma vez observado que a melatonina é capaz de proteger da morte por AICD os hibridomas de LTCD4 induzidos por anti-CD3 e os blastos estimulados pelas APCs, em seguida nós fomos avaliar a ação da melatonina na morte por AICD dos diferentes perfis de linfócitos T CD4: Th1, Th2, Th17 e iTreg. Para isso, foi necessário purificar a população de LTCD4 naive proveniente de linfonodos de animais C57BL/6. Como mostrado na **Figura 6**, a pureza de LTCD4 foi de 95,8% após purificação em coluna de seleção negativa. A partir desse momento, as células foram colocadas em cultura e submetidas às diferentes condições de polarização por 4 dias. Após esse período, nós fizemos a marcação intracelular de citocinas e marcadores característicos de cada perfil. Sendo assim, foram marcadas as citocinas IFN- γ para a população de Th1, IL-4 para Th2, IL-17 para Th17 e o marcador de superfície e o fator de transcrição, CD25 e Foxp3 respectivamente para iTreg. Como mostrado na **Figura 7**, Th1 e iTreg foram as populações que melhores diferenciaram obtendo-se uma proporção de 65,4% e 88,6% respectivamente.

Figura 6. Frequência de linfócitos T CD4 naive pré e pós-coluna de purificação. Células dos linfonodos periféricos (cervicais, axilares, braquiais e inguinais) foram removidos do animal C57BL/6. Após o processamento dos órgãos, os LTCD4 foram purificados por coluna magnética de seleção negativa (Dynal) e o grau de pureza foi avaliado por citometria de fluxo através das marcações para CD3, B220, CD4, CD8. **A)** O gráfico representa *dot plot* das células pré-coluna. **B)** O gráfico representa *dot plot* das células pós-coluna.

Figura 7. Diferenciação dos diferentes perfis de linfócitos T CD4. Após o período de diferenciação de 4 dias, as células dos perfis Th1, Th2 e Th17 foram estimuladas com PMA (10 nM) e ionomicina (1 μ M) por 6 horas. Depois das primeiras 4 horas foi adicionado na cultura de células 10 μ g/ml de brefeldina A. As células foram submetidas a marcação intracelular das citocinas INF- γ , IL-4 e IL-17. Para as Treg, foi realizada marcação intracelular direta do fator de transcrição FoxP3 e de superfície CD25.

Após purificação e diferenciação dos perfis de linfócitos T CD4, essas células foram induzidas a AICD com anti-CD3 e incubadas por 4 horas. Preparamos amostras de trizol e avaliamos o estado de expressão gênica de CD95L nessas células. Como pode ser observado na **Figura 8** o estímulo com anti-CD3 induziu a produção de mRNA de CD95L e a melatonina reprimiu-a em todas as populações de LTCD4.

Figura 8. A melatonina inibe a expressão de CD95L nas quatro populações de linfócitos T CD4. 5×10^5 células foram estimuladas com anti-CD3 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) na presença ou não de 1 mM de melatonina. Após 4 horas as células foram lisadas com o reagente TRIZOL® para a extração de RNA total e a expressão gênica de CD95L foi avaliada por *real time*. Como controle endógeno foi utilizado a expressão do gene *Hprt*. Para a análise estatística foi utilizado o teste One-way ANOVA P-value: ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ respeito do controle anti-CD3. Os dados são representativo de um experimento independente.

4.4 As populações de LTCD4 são resistentes à morte por AICD induzida com anti-CD3

Em seguida, procedemos à indução de AICD com anti-CD3 por 18 horas das células já diferenciadas. Como mostrado na **Figura 9**, apesar das células diferenciadas terem expressado mRNA de CD95L, não houve indução de morte celular em nenhuma das populações de LTCD4 e o tratamento com melatonina não alterou estes resultados, o que sugere que é preciso realizar mais estímulos via TCR para atingir a condição de susceptibilidade à morte por AICD.

Figura 9. Indução de AICD nos diferentes perfis de linfócitos T CD4. 5×10^5 células foram estimuladas com anti-CD3 (1 $\mu\text{g/ml}$) na presença ou não de 1 mM de melatonina por 18 horas. A análise foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. Nos gráficos esta é representada a média de porcentagem de morte indicada pela frequência de núcleos hipodiploides $\pm$ o desvio padrão. Para a análise estatística foi utilizado o teste One-way ANOVA P-value $p < 0,05$. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos anti-CD3 e anti-CD3+MEL 1mM.

Em vista do resultado da **Figura 9**, nós fomos verificar o estado de expressão gênica do principal inibidor da ativação da morte pela via extrínseca, a proteína c-FLIP. Esta molécula anti-apoptótica compete com a pro-caspase 8 no recrutamento ao complexo proteico de morte, DISC, impedindo o desencadeamento da morte pela falta do domínio catalítico na sua estrutura proteica. A melatonina não alterou significativamente a expressão gênica de c-FLIP em nenhuma das populações de LTCD4 quando comparada a expressão em células induzidas pelo anti-CD3 (**Figura 10**). Esses resultados indicam que, a ausência de morte após 18 horas de ativação com anti-CD3 possa ser explicada pela alta expressão de c-FLIP.

Figura 10. Expressão induzida de c-FLIP nas células ativadas com anti-CD3 dos diferentes perfis de LTCD4. 5×10^5 células foram estimuladas com anti-CD3 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) na presença ou não de 1 mM de melatonina. Após 4 horas as células foram lisadas com o reagente TRIZOL® para a extração de RNA total e a expressão gênica de c-FLIP foi avaliada por *real time*. Como controle endógeno foi utilizado a expressão do gene *Hprt*. Para a análise estatística foi utilizado o teste One-way ANOVA P-value $p < 0,05$. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos anti-CD3 e anti-CD3+MEL 1 mM.

4.5 Melatonina promove a diferenciação para os perfis Th1 e Th2 e reprime a diferenciação de Th17

Independentemente do efeito da melatonina sobre o processo do AICD no fim da resposta imune, nós fomos avaliar o efeito da melatonina no início do processo de diferenciação para os diferentes perfis de linfócitos Th. O objetivo foi verificar a influência da melatonina para o desvio a determinado tipo de população de linfócitos T CD4. Para isso, a melatonina foi adicionada uma única vez no início das diferenciações na concentração de 1mM. Na **Figura 11** pode ser observado que a melatonina promoveu a diferenciação tanto para o perfil Th1 quanto para o perfil Th2. Durante a diferenciação para Th17, a melatonina pareceu inibir a produção de células com este perfil. E não vimos alteração em relação ao grupo controle no caso dos linfócitos iTreg.

Figura 11. Efeito da melatonina na diferenciação para os perfis Th1, Th2, Th17 e iTreg. A melatonina (1 mM) foi adicionada apenas uma vez no início do protocolo de diferenciação dos diferentes perfis como descrito em Material e Método. Após 4 dias de diferenciação, as células dos perfis Th1, Th2 e Th17 foram estimuladas com PMA (10 nM) e ionomicina (1 μ M) por 6 horas. Depois das primeiras 4 horas foi adicionado na cultura de células 10 μ g/ml de brefeldina A. As células foram submetidas a marcação intracelular das citocinas INF- γ , IL-4 e IL-17. Para as Treg, foi realizada marcação intracelular direta do fator de transcrição FoxP3 e de superfície CD25. Os dados são representativo de um experimento.

Também avaliamos marcadores de ativação linfocitária CD44, CD69, CD25 e CD62L. Vimos que a melatonina diminuiu a expressão de CD44 em Th17 e de CD69 nas populações de Th1 e Th17 (**Figura 12**). Por outro lado, observou-se aumento da expressão de CD62L em

quase todas as populações Th, em maior medida na população de Th1 (**Figura 13**). Este marcador é a principal molécula de migração para os linfonodos e é expressa principalmente pelos linfócitos T *naive*. No que diz respeito ao marcador CD25, não houve alteração com o tratamento com melatonina. Nossos resultados indicam que a melatonina na concentração utilizada nos experimentos *in vitro* (1 mM), provoca a diminuição dos marcadores de ativação linfocitárias em determinados perfis Th.

Figura 12. Influência da melatonina na expressão dos marcadores de ativação linfocitária CD44 e CD69. Células diferenciadas para os perfis Th1, Th2 e Th17 na presença ou não de 1 mM de melatonina foram marcadas com os anticorpos de ativação linfocitárias anti-CD44 e anti-69 para análise por citometria de fluxo. No gráfico estão representadas as curvas de intensidade de fluorescência média (MFI) para o grupo controle (linha preta) e o grupo tratado com melatonina (linha vermelha).

Figura 13. Influência da melatonina na expressão dos marcadores de ativação linfocitária CD62L e CD25. Células diferenciadas para os perfis Th1, Th2 e Th17 na presença ou não de 1 mM de melatonina foram marcadas com os anticorpos de ativação linfocitária anti-CD62L e anti-25 para análise por citometria de fluxo. No gráfico estão representados os *dot plot* do grupo controle e do grupo tratado com melatonina.

4.6 Efeito estimulador da melatonina em uma resposta imune mediada pelos LTCD4

Devido ao nosso interesse em estudar o efeito da melatonina em linfócitos T CD4 durante o desenvolvimento da resposta imune, nós optamos por usar o modelo de Hipersensibilidade Tardia (DTH) para realizar os ensaios. Esta resposta é induzida em animal B6 macho através de uma etapa de sensibilização com ovalbumina emulsificada em CFA no

dia zero, e uma segunda etapa de desafio realizado no quarto dia pós-imunização com ovalbumina agregada. Desta maneira, tem-se uma resposta primária com a ativação e expansão de clones específicos contra a proteína ovalbumina e uma resposta secundária com a ação efetora destes clones de LTCD4 antígeno-específicos.

Para avaliar a especificidade antigênica do modelo *in vivo* utilizamos dois grupos experimentais, um dos quais foi sensibilizado com a emulsão contendo o antígeno e o outro não. Após o desafio com a ovalbumina agregada foram realizadas medições da reposta inflamatória às 24, 48 e 72 horas.

A evolução da resposta inflamatória no DTH caracteriza-se por apresentar um pico após 48 horas do desafio e uma etapa de resolução da resposta após 72 horas. Na **Figura 14** pode ser observada a representação gráfica na forma de sino com os três tempos (24, 48 e 72 horas) do grupo imunizado com OVA (CFA+OVA). Além disso, pode ser observado também que a resposta imune é específica para o antígeno ovalbumina utilizado na sensibilização, uma vez que não há evidências de inflamação no grupo imunizado com CFA+salina. Desse modo, descarta-se a possibilidade da ação exclusiva de um efeito inflamatório desencadeado pela injeção.

Figura 14. A resposta de DTH é estimulada por antígeno proteico. Animais C57BL/6 machos de cada grupo (n=6) foram imunizados com a proteína OVA grau V (100 μ g) em CFA e o desafio foi realizado com OVA grau II (2%) no quarto dia após a imunização. A espessura em mm corresponde à diferença entre a pata desafiada com o antígeno e a desafiada com salina no mesmo animal.

Com o objetivo de confirmar a importância da população de linfócitos T CD4 no modelo de DTH, comparamos a resposta de DTH induzida em animais C57BL/6 CD4KO, sem a população celular de interesse, e os mesmos animais, porém, com transferência de células

do baço de animais transgênico C57BL/6 OTII. Esses animais C57BL/6 OTII possuem linfócitos T CD4 que apresentam o mesmo TCR, reconhecendo um único complexo MHC:peptídeo da ovalbumina. Na **Figura 15**, observa-se que, há resposta apenas quando a população de LTCD4 esta presente. Este resultado, portanto mostra que o processo de DTH é um fenômeno celular mediado por linfócitos T CD4.

Figura 15. A resposta de DTH é mediada por linfócitos T CD4. Dez milhões de esplenócitos de animal transgênico OTII foram transferidos para o animal knockout de CD4 (CD4 KO). Após 48 horas foi realizada a imunização com CFA+OVA V (100 µg). O desafio foi realizado no quarto dia da imunização com 2% de OVA II e as medições foram registradas após 24, 48 e 72 horas.

Os resultados *in vitro* demonstraram anteriormente que a melatonina promove a sobrevivência dos LTCD4 reestimulados via TCR/CD3. Dessa maneira, espera-se que a resposta imune dos animais tratados com melatonina seja superior, uma vez que houve um aumento no número de LTCD4 efetores. Para avaliar essa hipótese, aprimoramos o protocolo de indução de DTH para obtenção de uma resposta subótima, ou seja, baixa o suficiente para conseguirmos observar o efeito estimulador da melatonina.

Com esse objetivo, foram feitas induções de DTH com diferentes combinações de quantidade de OVA grau V e a OVA grau II, utilizadas na imunização e no desafio, respectivamente. A condição utilizada até agora nos experimentos mostrados anteriormente corresponde a 100 µg de OVA grau V e 2% de OVA grau II. Como pode-se observar na **Figura 16**, a melhor condição para evidenciar o efeito estimulador da melatonina no DTH foi a de OVA V 25 µg e OVA II 0,5% (quatro vezes menor em relação às quantidades originais de ambas as ovalbuminas). Todas as condições apresentaram um pico às 48 h, mas a resposta diminuiu progressivamente, primeiro com a diminuição da OVA grau V e depois com a diminuição da OVA grau II.

Figura 16. Padronização do modelo de DTH para o estabelecimento de uma resposta imunológica subótima. Animais C57BL/6 machos de cada grupo (n=6) foram imunizados com emulsões preparadas com diferentes quantidades da proteína OVA grau V (25 e 100 µg) em CFA e o desafio foi realizado com diferentes quantidades de OVA grau II (0,5 e 2%) no quarto dia após a imunização.

Após a padronização do modelo de DTH, avaliou-se o desempenho da melatonina na condição subótima escolhida. Como mostrado na **Figura 17**, a melatonina aumentou significativamente a resposta inflamatória no pico da doença e de uma maneira dose dependente mostrando a maior inflamação com a dose de 9 mg/Kg de melatonina. Nota-se que nesta dose, a resposta permaneceu aumentada às 72 horas.

Figura 17. Efeito imunoestimulador dependente de dose da melatonina no modelo de DTH. Animais C57BL/6 machos de cada grupo foram imunizados com a proteína OVA grau V (25 µg) em CFA e o desafio foi realizado com OVA grau II (0,5%) no quarto dia após a imunização. Melatonina foi adicionada na emulsão em duas concentrações, 3 e 9 mg/Kg, durante a imunização junto às injeções i.p. como descrito na seção material e método. Análise estatística utilizada foi One-way ANOVA. P-value *p<0,05; **p<0,01 e ***p>0,001. Os dados são representativo de seis experimentos independentes.

4.7 O efeito estimulador da melatonina não depende da sinalização de CD95

Para comprovar o envolvimento da via CD95-CD95L na ação imunoestimuladora da melatonina no modelo *in vivo* de DTH, foi realizada uma nova indução de DTH em animais C57BL/6 selvagem (B6) e em animais C57BL/6^{lpr/lpr} (B6^{lpr/lpr}). Esta linhagem de animais contém uma mutação espontânea que leva à ausência total da proteína do receptor de morte CD95.

Na **Figura 18** é possível observar que a melatonina continuou a atuar como estimulador da resposta tanto no animal WT (*wildtype*) quanto no LPR nos tempos de 48 e 72 horas. Porém, observa-se também que o efeito da melatonina no grupo LPR foi menor do que o efeito provocado no animal WT. Nota-se que o grupo LPR veículo mostrou uma menor resposta quando comparada com o grupo WT Veículo (#) em 48 e 72 horas, mostrando que este animal mutante não responde eficientemente à indução de DTH. Em conclusão, a melatonina promove o mesmo efeito estimulador no modelo de DTH tanto nos animais WT como nos animais cujo receptor de morte CD95 esta ausente.

Figura 18. Efeito da melatonina em animais transgênicos mutante não funcional para FAS (B6^{LPR/LPR}) no modelo de DTH. Animais C57BL/6 e C57BL/6^{lpr/lpr} machos (n=6 para cada grupo) foram imunizados com a proteína OVA grau V (25 µg) em CFA e o desafiados com OVA grau II (0,5%) no quarto dia após a imunização. A melatonina foi adicionada tanto na emulsão na concentração de 9 mg/Kg, como também durante o tratamento com 3 injeções intraperitoneais. Para a análise estatística foi utilizado o teste One-way ANOVA entre grupo tratado com melatonina e grupo não tratado da mesma cepa de animal. P-value *p<0,05; **p<0,01 e ***p>0,001; ## p<0,01 indica diferença significativa entre os grupos veículos de ambos os grupos de animais e && p<0,01 indica diferença significativa entre os grupos de animais tratados com melatonina. Os dados são representativo de três experimentos independentes.

Apesar do uso de animais knockout para CD95, não foi possível demonstrar claramente a participação deste receptor de morte no aumento do DTH provocado pela melatonina. Principalmente no que diz respeito à via de sinalização de CD95 nos linfócitos T CD4. Para contornar essa dificuldade, decidimos realizar um experimento de transferência adotiva de células esplênicas de animal transgênico OTII e de animal duplo mutante OTII^{lpr/lpr}, para animais B6CD4KO. Com esta estratégia, pudemos avaliar o comportamento de ambas as populações transferidas e a influência da melatonina nas mesmas. Ao compararmos os grupos experimentais que não receberam melatonina, não observamos diferença na resposta induzida de DTH em nenhum dos tempos avaliados (**Figura 19**). Este fato surpreendente, indica um desempenho parecido das populações OTII e OTII^{lpr/lpr} durante o DTH sem função aparente do receptor CD95 no desenvolvimento da resposta. É esperado que linfócitos T CD4 OTII^{lpr/lpr} tenham uma maior sobrevivência, visto que, devido à mutação, há o impedimento da ativação da via de morte, e como consequência a permanência da resposta aumentada em 72 horas. Por outro lado, neste experimento não foi possível detectar uma resposta suprimida dos animais transferidos com células OTII^{lpr/lpr} como visto no experimento anterior, em animais LPR. Isto nos mostra que a falta do receptor CD95 nos linfócitos T CD4 não está relacionada com a causa que provoca esse efeito. Assim, concluímos que a sinalização do receptor CD95 não tem participação no desenvolvimento do DTH.

Figura 19. Melatonina estimulou a resposta de DTH em animais transferidos com esplenócitos OTII e OTII^{lpr/lpr}. Dez milhões de esplenócitos de animal transgênico OTII e OTII^{lpr/lpr} foram transferidos para animal knockout de CD4 (CD4 KO). Após 48 horas foi realizada a imunização com CFA+OVA V (25 µg) e o desafio foi realizado quatro dias depois com 0,5% de OVA II. A melatonina foi colocada na emulsão de imunização na concentração de 9 mg/Kg e nos três dias seguintes foram realizados tratamentos i.p. As medições foram registradas após 24, 48 e 72 H. Análise estatística Two-way ANOVA pós-teste Bonferroni ***p>0,001 (OTII CTRL vs OTII MEL e OTII^{lpr/lpr} CTRL vs OTII^{lpr/lpr} MEL); ###p>0,001 (OTII MEL vs OTII^{lpr/lpr} MEL), n.s. não significativo estatisticamente. Os dados são representativo de um experimento.

4.8 A melatonina provoca o aumento do número de LTCD4 específicos do antígeno

Para verificarmos se o efeito observado pela adição da melatonina no modelo de DTH deve-se ao aumento da sobrevivência dos linfócitos T CD4 específicos para ovalbumina, realizamos o experimento de transferência adotiva de esplenócitos de animal transgênico C57BL/6 OTII para o animal selvagem C57BL/6, só que desta vez, utilizando células marcadas com corante vital *celltrace*. Dois dias após a transferência das células marcadas, foi realizada a imunização dos animais na condição subótima estabelecida anteriormente. Depois de três dias, os animais foram sacrificados, os linfonodos drenantes da resposta foram removidos e os marcadores de superfície, CD4 e TCR transgênico foram analisados por citometria de fluxo. Foi observado que a melatonina aumentou tanto a frequência de linfócitos T CD4/TCR

transgênico (**figura 20A**) quanto o seu número absoluto (**figura 20B**). Este dado sugere que a melatonina possui a capacidade de interferir na biologia dos LTCD4 específicos de antígenos promovendo a sua permanência em maior número quando comparado ao grupo sem melatonina.

Figura 20. Melatonina aumenta o número absoluto de linfócitos T CD4 específicos do antígeno. Animais C57BL/6 machos de cada grupo experimental ($n=5$) receberam 1×10^7 esplenócitos do animal C57BL/6 OTII marcados com corante vital fluorescente *cell trace* (pacific blue). Após 48 horas, os animais foram imunizados com a proteína OVA grau V ($25 \mu\text{g}$) em CFA na presença ou não de 9 mg/Kg de melatonina. Os animais foram sacrificados após 3 dias de imunizados e seus linfonodos inguinais foram removidos e as células foram marcadas para citometria de fluxo com os anticorpos anti-CD4(APCCy7) e anti-TCR B6(PE) **A**) Dot plot da população CD4+TCRB6+; **B**) Número absoluto de células TCR específicas (10^4). Para a análise estatística foi utilizado o teste One-way ANOVA post-test Tukey. P-value ** $p < 0,01$. Os dados são representativo de dois experimentos independentes.

Para averiguar se o aumento da frequência e do número absoluto de LTCD4 específicos de antígenos em animais imunizados foi devido ao aumento da proliferação dessas células, comparamos a queda da fluorescência do corante vital *celltrace* na população TCR específica que se encontra dentro da população de linfócitos T CD4. Sabe-se que a fluorescência do corante *celltrace* vai diminuindo conforme a proliferação celular e ao mesmo tempo formando gerações de replicação. Por meio da quantificação da frequência e do número de gerações que são formadas em cada grupo experimental é possível calcular o

índice de replicação como mostrado em materiais e métodos. Na **figura 21A** é possível observar que a presença da melatonina nos animais imunizados provocou um aumento no número de gerações de replicação, compostas por maior número de eventos em cada uma delas. Assim, pode-se inferir que, a melatonina estimulou a proliferação dos linfócitos específicos. A melatonina nos animais não imunizados não induziu a proliferação dos linfócitos transferidos. O aumento da proliferação estimulado pela melatonina pode ser melhor observado na **figura 21B**.

Figura 21. Melatonina estimula a proliferação de linfócitos T CD4 específicos do antígeno. A) Dot plot da população TCRB6+celltrace+ dentro da população CD4+; **B)** Índice de replicação para comparar taxa de proliferação (ver formula na seção Material e Métodos). Para a análise estatística foi utilizado o teste One-way ANOVA post-test Tukey. P-value **p>0,01. Os dados são representativo de dois experimentos independentes.

5 DISCUSSÃO

Este trabalho mostrou evidências, tanto em experimentos *in vitro* quanto *in vivo*, de que melatonina é capaz de influenciar algumas características na biologia de LTCD4. De modo geral, nossos dados indicam uma regulação positiva na sobrevivência destes linfócitos. Isto é, experimentos *in vitro* demonstraram que a melatonina protegeu os LTCD4 da morte por AICD através do bloqueio da expressão de CD95L, o qual não tem participação da sinalização via os receptores de membrana da melatonina MT1/2. Além disto, constatamos que a melatonina é capaz de regular a expressão e a diferenciação dos LTCD4 para os diferentes perfis Th1, Th2, Th17. Mais precisamente, a melatonina estimula a produção de células do perfil Th1 e Th2 e inibe a diferenciação de Th17, enquanto que não interfere com a diferenciação das Treg. Já *in vivo*, utilizando o modelo de DTH, vimos que a melatonina se desempenhou como adjuvante da resposta imune, dado que sua presença no momento da imunização refletiu mais tarde, em um aumento da resposta imune local secundária. Com relação a isto, verificamos que o tratamento com melatonina provocou um aumento no número de LTCD4 antígeno-específicos e que este incremento deve-se ao aumento da proliferação celular.

Desta forma, nossos dados indicam que a administração de melatonina interfere positivamente no desenvolvimento de uma resposta imune mediada por LTCD4.

Várias são as proteínas intracelulares que interagem com a melatonina. Dentre elas, encontramos os receptores MT1 e MT2, os membros da família de receptores nucleares ROR e RZR de melatonina, o receptor MT3 que é uma quinone redutase e proteínas da via de sinalização do Ca^{2+} como calmodulina e calreticulina (BENITEZ-KING et al., 1993). Os nossos resultados prévios do nosso grupo demonstraram que o efeito da melatonina é mediado, principalmente, através da sua ação negativa sobre a ativação do fator de transcrição NFAT (PEDROSA et al., 2010). A princípio esta ação é mediada por um efeito direto da melatonina sobre a calcineurina e, portanto, independente dos receptores MT1 e MT2. É importante ressaltar que a interação entre melatonina e calcineurina é de baixa afinidade, enquanto a associação entre melatonina e os receptores MT1/2 é de alta afinidade. Por tanto, é preciso uma concentração alta (mM) de melatonina para inibir a ação da calcineurina, enquanto concentrações menores (nM) já são capazes de estimular os receptores MT1/2 (LUCHETTI et al., 2010). Neste sentido, o fato de que nossos resultados anteriores (PEDROSA et al., 2010) e

atuais (**Figura 2**) demonstram que o efeito inibidor da melatonina sobre o fenômeno de AICD ocorre apenas em altas concentrações de melatonina. Sugerem fortemente que estes receptores não participam da proteção ao AICD conferida pela melatonina. Ainda assim, a participação de MT1 e MT2 no fenômeno de proteção ao AICD não havia sido formalmente descartada. Desta maneira, fizemos uma abordagem farmacológica utilizando um antagonista dos receptores MT1/2 da melatonina conhecido como luzindole que consegue se ligar de forma competitiva a ambos os receptores, porém tem maior afinidade pelo receptor MT2 (DUBOCOVICH; MARKOWSKA, 2005). Primeiramente, avaliamos a toxicidade dele nas células de hibridoma DO11.10 e vimos que esta droga pode ser usada abaixo da concentração de 10 μ M. Este dado corrobora com as concentrações de luzindole utilizadas em trabalhos com cultura celular (PIRES-LAPA et al., 2013; WONGPRAYOON; GOVITRAPONG, 2015). Em seguida, induzimos AICD com anti-CD3 na presença de melatonina e luzindole e observamos que a inibição do AICD pela melatonina não é alterada pelo bloqueio da sinalização dos receptores MT1/2. O mesmo resultado foi observado quando foi utilizado o modelo de apresentação antigênica, no qual a indução do AICD dos linfócitos T CD4 é feita pela ligação no TCR do complexo MHC:peptídeo de células dendríticas. Assim, em conjunto podemos afirmar que a prevenção do AICD pela melatonina não envolve a sinalização dos receptores MT1/2.

A respeito do efeito da melatonina na diferenciação dos perfis de linfócitos T CD4, nós vimos que a melatonina estimulou o aumento da diferenciação para os perfis Th1 e Th2 e inibiu discretamente a diferenciação para o perfil Th17 (**Figura 11**). Alguns fatos descritos na literatura que sustentam o aumento da produção de LTCD4 do perfil Th1 pela melatonina são que a melatonina aumentou a produção de IL-12 pelas APC maduras (GARCIA-MAURINO et al., 1999) e aumentou a produção de IFN γ pelos LTCD4 ativados (GARCIA-MAURINO et al., 1997). Por outro lado e em relação ao aumento produzido pela melatonina na diferenciação para Th2 se tem poucos dados confirmando este fenômeno, somente o resultado de um trabalho onde se viu, *in vitro*, o aumento da produção de IL-4 por linfócitos T antígeno-específico em resposta a melatonina (SHAIJ et al., 1998). Sobre o efeito de repressão pela melatonina na diferenciação para o perfil Th17, um trabalho publicado recentemente demonstrou de forma elegante o mecanismo pelo qual a melatonina inibe a geração de linfócitos Th17. Os autores descreveram a participação do receptor MT1 da melatonina no bloqueio da molécula REV/ERB α que reprime a ação de NFIL3, um repressor transcripcional

que por sua vez inibe a ação do fator de transcrição mestre da diferenciação de Th17 ROR γ T (FAREZ et al., 2015). É importante notar que o receptor nuclear da melatonina ROR α trabalha sinergicamente com ROR γ T para a indução da diferenciação para o perfil Th17 (YANG et al., 2008). E por tal motivo, pensava-se que a melatonina ao invés de inibir a produção de Th17 poderia estimulá-las (KUKLINA, 2014). O envolvimento deste fator nuclear na indução de Th17 foi comprovado ao submeter células *knockout* para esta proteína ao protocolo de diferenciação para o perfil Th17 e obter uma baixa frequência de células IL-17+, sem adição nenhuma de melatonina na cultura celular (YANG et al., 2008). Por tanto, ainda não foi demonstrado se a ligação da melatonina diretamente no ROR α promove a diferenciação para Th17. Em conclusão, podemos observar a versatilidade da melatonina na ligação a seus diferentes sítios e provocar resultados distintos, como o aumento para o perfil Th1 ou a inibição para o perfil Th17. O mecanismo e as condições pelo qual a melatonina estimula a produção de Th1 não foram revelados e acreditamos que é de extrema importância para compreender melhor a sua influência no destino de LTCD4 efetores no desenvolvimento da resposta imune.

Além dos experimentos *in vitro* de AICD e da diferenciação linfocitária, este trabalho tinha como objetivo contextualizar o efeito da melatonina na sobrevivência dos linfócitos em uma resposta imunológica mediada por LTCD4. Para isto, optamos por utilizar o modelo de hipersensibilidade tipo tardia (DTH) em camundongos. Nós observamos duas características interessantes deste modelo murino para alcançar o objetivo do projeto, sendo uma delas a de ser uma resposta imune para um antígeno proteico cujos animais transgênicos contendo LTCD4 com TCR específico para um peptídeo daquela proteína estão disponibilizados. A outra de ser mediada por LTCD4. A ovalbumina foi a proteína utilizada na indução da resposta de DTH. Inicialmente, nós confirmamos que o modelo é dependente da ação de LTCD4, ao demonstrar que não houve indução de DTH em camundongos CD4 KO. Muito embora nossos resultados com os animais CD4 KO não tenham sido nenhuma novidade, eles foram muito importante para amparar nossos experimentos com transferência de células de animais transgênicos OTII e OTII/lpr (discutido abaixo).

Sabe-se que a reação de DTH é dependente de linfócitos do perfil Th1 (FONG; MOSMANN, 1989) e que após o desafio com a ovalbumina agregada, a reação de DTH apresenta três fases efetoras locais. A primeira é a fase de iniciação às 24 horas, a segunda é a fase do pico da resposta às 48 horas e a última é a fase de contração da resposta às 72

horas. Observa-se, na **Figura 16**, que quando o protocolo de indução de DTH é feito com as menores quantidades da OVA V e da OVA II, 25µg e 0,5% respectivamente, as três fases estão bem determinadas. No entanto, isto também pode ser observado nas outras duas condições. O fato de este modelo apresentar estas três fases é relevante para o desenvolvimento deste trabalho porque nos permite comparar fatores e tratamentos que possam alterar o curso normal da resposta. Principalmente, na fase de indução da resposta, dado que mudanças sobre a população de LTCD4, como a inibição da morte celular de clones expandidos podem refletir em uma maior resposta secundária. Isto pode acontecer, dentre outras formas, via CD95/CD95L como mecanismo efetor em resposta da hiperativação do complexo TCR/CD3 (SINGER; ABBAS, 1994). A dependência da via de sinalização do receptor CD95 no DTH foi mostrada pelo grupo de Zhang e col. ao detectar o bloqueio da fase de contração do DTH em animais cujo receptor CD95 não sinaliza para indução de morte. Eles confirmaram este resultado através da administração de anticorpo anti-FASL (anti-CD95L) em animais suficientes deste receptor de morte (ZHANG et al., 2003). Finalmente, com este protocolo em mãos, nós fomos avaliar o efeito da melatonina na população de linfócitos T CD4.

Existem mais dados na literatura sobre a ação estimuladora da melatonina do que possíveis funções supressoras da resposta imune (CARRILLO-VICO et al., 2006; HARDELAND et al., 2011). Por tal motivo, nós primeiramente aprimoramos o protocolo de DTH para induzir uma resposta subótima e dessa forma conseguir observar a ação imunoestimuladora da melatonina. Assim, passamos de uma condição que utiliza 100 µg de Ova grau V na imunização e 2% de OVA grau II no desafio para outro que utiliza uma quarta parte de ambas as ovalbuminas, 25 µg e 0,5% respectivamente. Em concordância com a literatura, nossos dados demonstraram uma ação imunoestimuladora da melatonina no modelo de DTH. O efeito da melatonina sobre o DTH foi aditivo aumentando a inflamação conforme aumentava a concentração de melatonina. Nós concluímos que a melatonina regula positivamente a resposta de DTH. Para tentar explicar por meio de possíveis mecanismos atuantes neste efeito estimulador, alguns trabalhos mostraram que a melatonina seria capaz de aumentar a maturação das APCs ao estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 e TNF-α (GARCIA-MAURINO et al., 1997) e aumentar também a apresentação antigênica por induzir moléculas de MHC-II e coestimuladoras (PIOLI et al., 1993). Interessantemente, constatamos que a melatonina estimula uma resposta maior quando o

indivíduo encontra-se imune suprimido, como é o caso da resposta do animal B6^{lpr/lpr} (**Figura 18**) ou com uma resposta subótima. Confirmando isto, já foi descrito a capacidade da melatonina de melhorar a resposta de DTH em animais que foram submetidos a glicocorticoides, como sinal sistêmico de estresse (GUPTA; HALDAR, 2013). Também, foi observado um aumento da produção de IFN- γ e IL-2 em animais tratados com melatonina (VISHWAS; HALDAR, 2014) e a respeito disso, nós fizemos a associação direta entre os resultados obtidos pelo tratamento com melatonina no modelo de DTH e na diferenciação para o perfil Th1. Assim, assumindo que o modelo de DTH é desenvolvido pela ação efetora de linfócitos Th1, nós acreditamos que a principal fonte de IFN- γ circulante provenha provavelmente de linfócitos Th1 induzidos pela melatonina.

Dois resultados interessantes foram mostrados neste trabalho e são eles: o aumento da diferenciação de Th1 e a inibição de Th17 pela melatonina. Com o intuito de compreender quais são as circunstâncias que a melatonina poderia afetar para uma ou outra diferenciação celular, vimos os seguintes fatos que confirmam nossos achados. Por um lado está nosso resultado que mostra a melatonina aumentando a resposta de DTH, sendo esta uma doença tipicamente mediada por Th1, e por outro o resultado descrito pelo grupo de Correale, no qual a melatonina inibiu a resposta de EAE (encefalomielite autoimune experimental), doença mediada por Th17 (ALVAREZ-SANCHEZ et al., 2015; FAREZ et al., 2015). De fato, estes fenômenos nos mostra que a melatonina tem o potencial de regular o tipo de resposta a ser estabelecida determinando se promove para o perfil Th1 ou reprime para o perfil Th17. Simultaneamente, um estudo sobre a plasticidade de diferenciação de LTCD4 entre os perfis Th1-Th17 demonstrou que a ligação do ácido retinóico nos receptores nucleares dele é essencial para o estabelecimento e comprometimento do perfil Th1 e que na ausência dos mesmos há um desvio para a geração de linfócitos Th17 (BROWN et al., 2015). Considerando que dentro da família dos receptores órfão do ácido retinóico encontram-se os receptores nucleares ROR da melatonina, um ponto inicial para se estudar é sobre o envolvimento dos receptores ROR na ação da melatonina sobre a diferenciação para o tipo Th1. Dessa maneira nós criamos a seguinte hipótese: a melatonina, mediante ligação com os receptores ROR/RZR, induz o comprometimento para o perfil Th1 e ao mesmo tempo evita o desenvolvimento de linfócitos Th17, mais patogênicos e inflamatórios, controlando desta maneira a severidade da resposta imunológica.

Nós observamos ainda que houve uma inibição da fase de remissão ou resolução da resposta no grupo tratado com melatonina. É importante notar que a melatonina foi administrada na resposta primária, na sensibilização, e é nesta fase que, caso a melatonina tenha afetado a morte de LTCD4, possa ter resgatado um maior número de linfócitos para atuar na resposta secundária ou desafio e ocasionar uma resposta incrementada às 72 horas. Foi por tal motivo que o passo a seguir foi avaliar a proliferação e o número de linfócitos T CD4 específicos após a sensibilização. Vimos, então, que a adição de melatonina promoveu a proliferação de LTCD4 específicos para a ovalbumina, como também o número absoluto deles presentes nos linfonodos drenantes da resposta.

Com o intuito de investigar a atuação da via de sinalização CD95/CD95L no efeito estimulador promovido pela melatonina no modelo *in vivo* de DTH, nós realizamos a indução da resposta em animais LPR que possuem uma deficiência da proteína CD95. Estes animais apresentam um bloqueio da morte por AICD nos compartimentos de linfócitos B e linfócitos T CD4 e CD8, e estas células sobreviventes provocam no animal uma doença autoimune similar ao lúpus eritematoso sistêmico (RUSSELL et al., 1993). Por este motivo, esperava-se obter uma resposta exacerbada nos animais LPR sem tratamento com a melatonina a respeito do WT. Porém, os animais mutantes mostraram uma resposta ao DTH menor que os animais selvagens. No entanto, o tratamento com melatonina levou ao aumento da resposta em ambas as linhagens murinas (B6 WT e B6^{lpr/lpr}). Assim, em relação ao desempenho defeituoso apresentado pela linhagem B6^{lpr/lpr} na resposta ao DTH (**Figura 18**) existe um trabalho que corrobora nosso resultado mostrando certo grau de imunossupressão em relação ao animal selvagem (OKUYAMA et al., 1986). Uma possível explicação para este fenômeno pode ser que animais B6^{lpr/lpr} foram descritos como deficientes da produção de IL-2 (WOFSY et al., 1981). Embora tenha sido mostrado um aumento do número de linfócitos T CD4 antígeno específicos nos órgãos linfóides periféricos (baço e linfonodos) após uma resposta imune em animais LPR (SINGER; ABBAS, 1994), nós não conseguimos o mesmo resultado. Reconhecemos que uma das principais limitações de se comparar o desempenho da resposta de DTH entre estas linhagens, está baseado no fato de elas apresentarem diferenças fenotípicas nos componentes do sistema imune. Isto porque se sabe que camundongo LPR tem linfócitos T duplos negativos em quantidades consideráveis no sangue periférico (WATANABE et al., 1995) e para evitar tal variável nós decidimos realizar os

experimentos de transferência adotiva de linfócitos T CD4 suficientes e deficientes de CD95 para o receptor B6 CD4KO.

Ao perceber que o trabalho com animais B6^{lpr/lpr} implica a ação de múltiplos fatores, nós decidimos realizar experimentos de transferência adotiva de esplenócitos de animais transgênicos OTII e OTII^{lpr/lpr} para animais CD4 KO. Com isto, conseguimos controlar o fenótipo das células T CD4 que foram transferidas. Contrário ao descrito na literatura (ZHANG et al., 2003), nós não observamos um possível bloqueio da morte das células OTII^{lpr/lpr} no modelo de DTH, evidenciado, talvez, por uma resposta maior respeito a OTII. Células OTII e OTII^{lpr/lpr} mostraram-se idênticas funcionalmente durante o decorrer da resposta de DTH. Corroborando este achado, tem um trabalho no qual utiliza idêntica abordagem experimental ao trabalhar com linfócitos T CD4 de animais transgênicos suficientes e deficientes do receptor CD95, Tg^{+/+} e Tg^{lpr/lpr}, que demonstra a independência de CD95 na diminuição do número absoluto de clones específicos expandidos após a imunização (SYTWU et al., 1996). Este resultado sugere a ausência de participação da via CD95/CD95L na morte de LTCD4 antígeno-específicos expandidos após a sensibilização do DTH. Por outro lado, e como observado na **Figura 19** ambas as populações transferidas foram estimuladas da mesma forma com a melatonina, não havendo diferença entre os grupos tratados, o que mostra também a ausência de participação da via de sinalização de CD95 no fenômeno estimulador da melatonina no DTH.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados aqui contidos demonstram um papel imunoestimulador da melatonina. In vivo, pelo menos parte desse efeito é devido ao aumento no número de LTCD4 antígeno-específicos, provavelmente causado por um aumento na proliferação destas células. Experimentos in vitro sugerem que a melatonina interfere com a expressão de CD95L e, conseqüentemente, aumenta a capacidade de sobrevivência frente à restimulação do complexo TCR/CD3. Por outro lado, nossos resultados in vivo sugerem que o efeito “adjuvante” da melatonina seja independente da sua capacidade de modular a expressão de CD95L. Por fim, vimos que a melatonina é capaz de regular a diferenciação dos diferentes perfis de linfócitos T CD4, promovendo a diferenciação para o perfil Th1 e Th2 e inibindo para o perfil Th17.

REFERÊNCIAS*

- AKIRA, S. et al. Pathogen recognition and innate immunity. Cell, v. 124, n. 4, p. 783-801, 2006.
- ALGECIRAS-SCHIMNICH, A. et al. Cell cycle-dependent regulation of FLIP levels and susceptibility to Fas-mediated apoptosis. J. Immunol., v. 162, n. 9, p. 5205-5211, 1999.
- ALVAREZ-SANCHEZ, N. et al. Melatonin controls experimental autoimmune encephalomyelitis by altering the T effector/regulatory balance. Brain Behav. Immun., 2015.
- BARRETT, J. C. et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. Nat. Genet., v. 40, n. 8, p. 955-962, 2008.
- BENITEZ-KING, G. et al. Binding of 3H-melatonin to calmodulin. Life Sci., v. 53, n. 3, p. 201-207, 1993.
- BERSON, D. M. Phototransduction in ganglion-cell photoreceptors. Pflugers Arch., v. 454, n. 5, p. 849-855, 2007.
- BROWN, C. C. et al. Retinoic acid is essential for Th1 cell lineage stability and prevents transition to a Th17 cell program. Immunity, v. 42, n. 3, p. 499-511, 2015.
- BRUNNER, T. et al. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. Nature, v. 373, n. 6513, p. 441-444, 1995.
- CARLBERG, C. Gene regulation by melatonin. Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 917, p. 387-396, 2000.
- CARRILLO-VICO, A. et al. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. FASEB J., v. 18, n. 3, p. 537-539, 2004.
- CARRILLO-VICO, A. et al. Melatonin counteracts the inhibitory effect of PGE2 on IL-2 production in human lymphocytes via its mt1 membrane receptor. FASEB J., v. 17, n. 6, p. 755-757, 2003.
- CARRILLO-VICO, A. et al. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. Endocrine, v. 27, n. 2, p. 189-200, 2005a.
- CARRILLO-VICO, A. et al. Melatonin: buffering the immune system. Int. J. Mol. Sci., v. 14, n. 4, p. 8638-8683, 2013.
- CARRILLO-VICO, A. et al. Human lymphocyte-synthesized melatonin is involved in the regulation of the interleukin-2/interleukin-2 receptor system. J. Clin. Endocrinol. Metab., v. 90, n. 2, p. 992-1000, 2005b.
- CARRILLO-VICO, A. et al. The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. Curr. Opin. Investig. Drugs, v. 7, n. 5, p. 423-431, 2006.

---

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- CASTRILLON, P. O. et al. Effect of melatonin treatment on 24-h variations in responses to mitogens and lymphocyte subset populations in rat submaxillary lymph nodes. J. Neuroendocrinol., v. 12, n. 8, p. 758-765, 2000.
- CHAHINE, B. G.; BAHNA, S. L. The role of the gut mucosal immunity in the development of tolerance versus development of allergy to food. Curr. Opin. Allergy Clin Immunol., v. 10, n. 4, p. 394-399, 2010.
- CONSTANTINESCU, C. S. et al. Luzindole, a melatonin receptor antagonist, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. Pathobiology, v. 65, n. 4, p. 190-194, 1997.
- CONTI, A.; MAESTRONI, G. J. Role of the pineal gland and melatonin in the development of autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. J. Pineal Res., v. 20, n. 3, p. 164-172, 1996.
- CRISTOFANON, S. et al. Intracellular prooxidant activity of melatonin induces a survival pathway involving NF-kappaB activation. Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 1171, p. 472-478, 2009.
- CURRIER, N. L. et al. Exogenous melatonin: quantitative enhancement in vivo of cells mediating non-specific immunity. J. Neuroimmunol., v. 104, n. 2, p. 101-108, 2000.
- D'ALESSIO, M. et al. Oxidative Bax dimerization promotes its translocation to mitochondria independently of apoptosis. FASEB J., v. 19, n. 11, p. 1504-1506, 2005.
- DEL GOBBO, V. et al. Pinealectomy inhibits interleukin-2 production and natural killer activity in mice. Int. J. Immunopharmacol., v. 11, n. 5, p. 567-573, 1989.
- DHEIN, J. et al. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). Nature, v. 373, n. 6513, p. 438-441, 1995.
- DRAZEN, D. L. et al. Melatonin enhancement of splenocyte proliferation is attenuated by luzindole, a melatonin receptor antagonist. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., v. 280, n. 5, p. R1476-1482, 2001.
- DRAZEN, D. L.; NELSON, R. J. Melatonin receptor subtype MT2 (Mel 1b) and not mt1 (Mel 1a) is associated with melatonin-induced enhancement of cell-mediated and humoral immunity. Neuroendocrinology, v. 74, n. 3, p. 178-184, 2001.
- DUBOCOVICH, M. L.; MARKOWSKA, M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. Endocrine, v. 27, n. 2, p. 101-110, 2005.
- ESPINO, J. et al. Melatonin reduces apoptosis induced by calcium signaling in human leukocytes: Evidence for the involvement of mitochondria and Bax activation. J. Membr. Biol., v. 233, n. 1-3, p. 105-118, 2010.
- FAREZ, M. F. et al. Melatonin Contributes to the Seasonality of Multiple Sclerosis Relapses. Cell, v. 162, n. 6, p. 1338-1352, 2015.
- FONG, T. A.; MOSMANN, T. R. The role of IFN-gamma in delayed-type hypersensitivity mediated by Th1 clones. J. Immunol., v. 143, n. 9, p. 2887-2893, 1989.

- GARCIA-MAURINO, S. et al. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. J. Immunol., v. 159, n. 2, p. 574-581, 1997.
- GARCIA-MAURINO, S. et al. Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. J. Pineal Res., v. 29, n. 3, p. 129-137, 2000.
- GARCIA-MAURINO, S. et al. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. Life Sci., v. 65, n. 20, p. 2143-2150, 1999.
- GIORDANO, M.; PALERMO, M. S. Melatonin-induced enhancement of antibody-dependent cellular cytotoxicity. J. Pineal Res., v. 10, n. 3, p. 117-121, 1991.
- GOMEZ-CORVERA, A. et al. Evidence of immune system melatonin production by two pineal melatonin deficient mice, C57BL/6 and Swiss strains. J. Pineal Res., v. 47, n. 1, p. 15-22, 2009.
- GREEN, D. R. Fas Bim boom! Immunity, v. 28, n. 2, p. 141-143, 2008.
- GREEN, D. R.; AMARANTE-MENDES, G. P. The point of no return: mitochondria, caspases, and the commitment to cell death. Results Probl. Cell Differ., v. 24, p. 45-61, 1998.
- GUPTA, S.; HALDAR, C. Physiological crosstalk between melatonin and glucocorticoid receptor modulates T-cell mediated immune responses in a wild tropical rodent, *Funambulus pennanti*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., v. 134, p. 23-36, 2013.
- HANSSON, I. et al. Constant darkness enhances autoimmunity to type II collagen and exaggerates development of collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. J. Neuroimmunol., v. 27, n. 1, p. 79-84, 1990.
- HANSSON, I. et al. The pineal hormone melatonin exaggerates development of collagen-induced arthritis in mice. J. Neuroimmunol., v. 39, n. 1-2, p. 23-30, 1992.
- HARDELAND, R. et al. Melatonin--a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. Prog. Neurobiol., v. 93, n. 3, p. 350-384, 2011.
- HARDELAND, R. et al. Melatonin, the circadian multioscillator system and health: the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. J. Pineal Res., v. 52, n. 2, p. 139-166, 2012.
- HARDELAND, R.; POEGGELER, B. Non-vertebrate melatonin. J. Pineal Res., v. 34, n. 4, p. 233-241, 2003.
- HILDEMAN, D. A. et al. Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. Curr. Opin. Immunol., v. 14, n. 3, p. 354-359, 2002.
- HOLTZ-HEPPELMANN, C. J. et al. Transcriptional regulation of the human FasL promoter-enhancer region. J. Biol. Chem., v. 273, n. 8, p. 4416-4423, 1998.
- KIRCHHOFF, S. et al. TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. J. Immunol., v. 165, n. 11, p. 6293-6300, 2000.

- KIVITY, S. et al. Infections and autoimmunity--friends or foes? Trends Immunol., v. 30, n. 8, p. 409-414, 2009.
- KOARADA, S. et al. Increased nonobese diabetic Th1:Th2 (IFN-gamma:IL-4) ratio is CD4+ T cell intrinsic and independent of APC genetic background. J. Immunol., v. 169, n. 11, p. 6580-6587, 2002.
- KUKLINA, E. M. Melatonin as potential inducer of Th17 cell differentiation. Med. Hypotheses, v. 83, n. 3, p. 404-406, 2014.
- LARDONE, P. J. et al. A novel interplay between membrane and nuclear melatonin receptors in human lymphocytes: significance in IL-2 production. Cell Mol. Life Sci., v. 66, n. 3, p. 516-525, 2009.
- LARDONE, P. J. et al. Melatonin synthesized by Jurkat human leukemic T cell line is implicated in IL-2 production. J. Cell Physiol., v. 206, n. 1, p. 273-279, 2006.
- LARDONE, P. J. et al. Blocking of melatonin synthesis and MT(1) receptor impairs the activation of Jurkat T cells. Cell Mol. Life Sci., v. 67, n. 18, p. 3163-3172, 2010.
- LATINIS, K. M. et al. Regulation of CD95 (Fas) ligand expression by TCR-mediated signaling events. J. Immunol., v. 158, n. 10, p. 4602-4611, 1997.
- LENARDO, M. et al. Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. Annu. Ver. Immunol., v. 17, p. 221-253, 1999.
- LIN, G. J. et al. Melatonin prolongs islet graft survival in diabetic NOD mice. J. Pineal Res., v. 47, n. 3, p. 284-292, 2009.
- LISSONI, P. The pineal gland as a central regulator of cytokine network. Neuro Endocrinol. Lett., v. 20, n. 6, p. 343-349, 1999.
- LISSONI, P. et al. Immunological effects of a single evening subcutaneous injection of low-dose interleukin-2 in association with the pineal hormone melatonin in advanced cancer patients. J. Biol. Regul. Homeost. Agents, v. 6, n. 4, p. 132-136, 1992.
- LISSONI, P. et al. IL-2 immunotherapy-induced increase in IL-12 blood concentrations may depend on an increase in circulating dendritic cell number. Int. J. Biol. Markers, v. 14, n. 3, p. 195-197, 1999.
- LIU, S. D. et al. Galectin-1 tunes TCR binding and signal transduction to regulate CD8 burst size. J. Immunol., v. 182, n. 9, p. 5283-5295, 2009.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- LUCHETTI, F. et al. Melatonin signaling and cell protection function. FASEB J., v. 24, n. 10, p. 3603-3624, 2010.
- MACIAS, M. et al. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. Eur. J. Biochem., v. 270, n. 5, p. 832-840, 2003.

- MARKUS, R. P. et al. Immune-Pineal Axis: Nuclear Factor kappaB (NF-kB) Mediates the Shift in the Melatonin Source from Pinealocytes to Immune Competent Cells. Int. J. Mol. Sci., v. 14, n. 6, p. 10979-10997, 2013.
- MAZZON, E. et al. Melatonin modulates signal transduction pathways and apoptosis in experimental colitis. J. Pineal Res., v. 41, n. 4, p. 363-373, 2006.
- MORREY, K. M. et al. Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. J. Immunol., v. 153, n. 6, p. 2671-2680, 1994.
- MUXEL, S. M. et al. NF-kappaB drives the synthesis of melatonin in RAW 264.7 macrophages by inducing the transcription of the arylalkylamine-N-acetyltransferase (AA-NAT) gene. PLoS One, v. 7, n. 12, p. e52010, 2012.
- NEURATH, M. F.; FINOTTO, S. The many roads to inflammatory bowel diseases. Immunity, v. 25, n. 2, p. 189-191, 2006.
- NOSAL'OVA, V. et al. Protective effect of melatonin in acetic acid induced colitis in rats. J. Pineal Res., v. 42, n. 4, p. 364-370, 2007.
- NOSJEAN, O. et al. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. J. Biol. Chem., v. 275, n. 40, p. 31311-31317, 2000.
- OKUYAMA, H. et al. Analysis of defective delayed-type hypersensitivity in autoimmune mice bearing lpr gene. Clin. Exp. Immunol., v. 63, n. 1, p. 87-94, 1986.
- PANDI-PERUMAL, S. R. et al. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. Prog. Neurobiol., v. 85, n. 3, p. 335-353, 2008.
- PAWLAK, J. et al. Effect of melatonin on phagocytic activity and intracellular free calcium concentration in testicular macrophages from normal and streptozotocin-induced diabetic rats. Mol. Cell. Biochem., v. 275, n. 1-2, p. 207-213, 2005.
- PEDROSA, A. M. et al. Melatonin protects CD4+ T cells from activation-induced cell death by blocking NFAT-mediated CD95 ligand upregulation. J. Immunol., v. 184, n. 7, p. 3487-3494, 2010.
- PIOLI, C. et al. Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and non specific signals for T-cell proliferation. Int. J. Immunopharmacol., v. 15, n. 4, p. 463-468, 1993.
- PIRES-LAPA, M. A. et al. Melatonin synthesis in human colostrum mononuclear cells enhances dectin-1-mediated phagocytosis by mononuclear cells. J. Pineal Res., 2013.
- PONTES, G. N. et al. Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) - melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. J. Pineal Res., v. 41, n. 2, p. 136-141, 2006.
- PRENDERGAST, B. J. et al. Impaired leukocyte trafficking and skin inflammatory responses in hamsters lacking a functional circadian system. Brain Behav. Immun., v. 32, p. 94-104, 2013.
- RADOGNA, F. et al. Melatonin antagonizes the intrinsic pathway of apoptosis via mitochondrial targeting of Bcl-2. J. Pineal Res., v. 44, n. 3, p. 316-325, 2008.

- RADOGNA, F. et al. Melatonin: a pleiotropic molecule regulating inflammation. Biochem. Pharmacol., v. 80, n. 12, p. 1844-1852, 2010.
- RAGHAVENDRA, V. et al. Melatonin provides signal 3 to unprimed CD4(+) T cells but failed to stimulate LPS primed B cells. Clin. Exp. Immunol., v. 124, n. 3, p. 414-422, 2001.
- RUSSELL, J. H. et al. Mature T cells of autoimmune lpr/lpr mice have a defect in antigen-stimulated suicide. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, v. 90, n. 10, p. 4409-4413, 1993.
- SAINZ, R. M. et al. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. Cell. Mol. Life Sci., v. 60, n. 7, p. 1407-1426, 2003.
- SCHMITT, N.; UENO, H. Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines. Curr. Opin. Immunol., v. 34, p. 130-136, 2015.
- SCHMITZ, I. et al. An IL-2-dependent switch between CD95 signaling pathways sensitizes primary human T cells toward CD95-mediated activation-induced cell death. J. Immunol., v. 171, n. 6, p. 2930-2936, 2003.
- SCHMITZ, I. et al. Resistance of short term activated T cells to CD95-mediated apoptosis correlates with de novo protein synthesis of c-FLIPshort. J. Immunol., v. 172, n. 4, p. 2194-2200, 2004.
- SCHOMERUS, C. et al. Selective adrenergic/cyclic AMP-dependent switch-off of proteasomal proteolysis alone switches on neural signal transduction: an example from the pineal gland. J. Neurochem., v. 75, n. 5, p. 2123-2132, 2000.
- SHAJI, A. V. et al. Regulation of secretion of IL-4 and IgG1 isotype by melatonin-stimulated ovalbumin-specific T cells. Clin. Exp. Immunol., v. 111, n. 1, p. 181-185, 1998.
- SINGER, G. G.; ABBAS, A. K. The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. Immunity, v. 1, n. 5, p. 365-371, 1994.
- SRINIVASAN, V. et al. Melatonin, immune function and aging. Immun. Ageing, v. 2, p. 17, 2005.
- SRINIVASAN, V. et al. Immunomodulation by melatonin: its significance for seasonally occurring diseases. Neuroimmunomodulation, v. 15, n. 2, p. 93-101, 2008.
- STROBER, W. et al. The immunology of mucosal models of inflammation. Annu. Ver. Immunol., v. 20, p. 495-549, 2002.
- SUDA, T. et al. Apoptosis of mouse naive T cells induced by recombinant soluble Fas ligand and activation-induced resistance to Fas ligand. J. Immunol., v. 157, n. 9, p. 3918-3924, 1996.
- SYTWU, H. K. et al. The roles of Fas/APO-1 (CD95) and TNF in antigen-induced programmed cell death in T cell receptor transgenic mice. Immunity, v. 5, n. 1, p. 17-30, 1996.
- TIAN, Y. M. et al. Melatonin rejuvenates degenerated thymus and redresses peripheral immune functions in aged mice. Immunol. Lett., v. 88, n. 2, p. 101-104, 2003.
- TITUS, R. G.; CHILLER, J. M. A simple and effective method to assess murine delayed type hypersensitivity to proteins. J. Immunol. Methods, v. 45, n. 1, p. 65-78, 1981.

VARADHACHARY, A. S. et al. Differential ability of T cell subsets to undergo activation-induced cell death. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, v. 94, n. 11, p. 5778-5783, 1997.

VISHWAS, D. K.; HALDAR, C. MT1 receptor expression and AA-NAT activity in lymphatic tissue following melatonin administration in male golden hamster. Int. Immunopharmacol., v. 22, n. 1, p. 258-265, 2014.

WATANABE-FUKUNAGA, R. et al. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. Nature, v. 356, n. 6367, p. 314-317, 1992.

WATANABE, D. et al. Constitutive activation of the Fas ligand gene in mouse lymphoproliferative disorders. EMBO J., v. 14, n. 1, p. 12-18, 1995.

WEINLICH, R. et al. TLR4/MYD88-dependent, LPS-induced synthesis of PGE2 by macrophages or dendritic cells prevents anti-CD3-mediated CD95L upregulation in T cells. Cell Death Differ., v. 15, n. 12, p. 1901-1909, 2008.

WOFSY, D. et al. Deficient interleukin 2 activity in MRL/Mp and C57BL/6J mice bearing the *lpr* gene. J. Exp. Med., v. 154, n. 5, p. 1671-1680, 1981.

WONGPRAYOON, P.; GOVITRAPONG, P. Melatonin attenuates methamphetamine-induced neuroinflammation through the melatonin receptor in the SH-SY5Y cell line. Neurotoxicology, v. 50, p. 122-130, 2015.

YANG, X. O. et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. Immunity, v. 28, n. 1, p. 29-39, 2008.

ZAWILSKA, J. B. et al. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. Pharmacol. Rep., v. 61, n. 3, p. 383-410, 2009.

ZHANG, J. et al. Activation-induced cell death in T cells and autoimmunity. Cell Mol. Immunol., v. 1, n. 3, p. 186-192, 2004.

ZHANG, X. R. et al. Reciprocal expression of TRAIL and CD95L in Th1 and Th2 cells: role of apoptosis in T helper subset differentiation. Cell Death Differ., v. 10, n. 2, p. 203-210, 2003.