



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS - FISILOGIA GERAL-
LABORATÓRIO DE CRONOFARMACOLOGIA**

Pulmão como uma fonte extrapineal de melatonina

Edson Duarte Ribeiro Paz

**São Paulo
2021**

EDSON DUARTE RIBEIRO PAZ

Pulmão como uma Fonte Extrapineal de Melatonina

Lung as an Extra-Pineal Source of Melatonin

SÃO PAULO

2021

EDSON DUARTE RIBEIRO PAZ

Pulmão como uma fonte extrapineal de melatonina

Lung as an extra-pineal source of melatonin

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

Orientadora: Regina Pekelmann Markus

Profa. Titular – Dep Fisiologia

SÃO PAULO

2021

Ficha catalográfica

Ribeiro-Paz, Edson Duarte.

Pulmão como uma fonte extrapineal de melatonina / Edson Duarte
Ribeiro-Paz; orientadora Regina P. Markus. – São Paulo, 2021.

86 f.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de
São Paulo. Departamento de Fisiologia.

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

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

À minha família

“Nem o futuro, nem o passado existem, e é impróprio dizer que há três tempos: passado, presente e futuro. Talvez fosse mais correto dizer: o presente do passado, o presente do presente e o presente do futuro. E essas três espécies de tempos existem em nossa mente. O presente do passado é a memória; o presente do presente é a percepção direta; o presente do futuro é a esperança”

Santo Agostinho - Confissões

Agradecimentos

Fico feliz por iniciar esta dissertação agradecendo as pessoas que me ajudaram nessa caminhada e sem as quais este trabalho não teria sido possível.

Primeiramente agradeço à minha orientadora Regina Markus que me acolheu em seu laboratório para que eu pudesse realizar minha caminhada e também ao suporte financeiro da FAPESP (2013/13691-1), CAPES e CNPq que permitiu que esse projeto fosse realizado me proporcionando experiências científicas únicas.

Agradeço igualmente a todos que me ajudaram, sem ordem de importância.

A minha família, que me incentivaram antes e durante a pós-graduação. À minha mãe Salete e ao meu pai Sebastião pelo incentivo. Minhas irmãs Terezinha, Cleonice e Keli, com quem morei aqui em São Paulo durante o período da pós-graduação. Meu irmão Silvío e sua esposa Andréia que sempre me apoiaram.

As minhas colegas de laboratório Débora e Amanda que sempre foram bastante próximas e ajudaram nas atividades.

À Débora Moura que é técnica do laboratório e foi uma amiga muito importante nesse processo.

Aos colegas de laboratório Kassiano, Caroline, Isabela, Marlina e Sanseray.

Agradeço a Sandra e suas alunas pela ajuda nos PCRs e técnicas moleculares, e principalmente me incentivando a fazer essa dissertação.

Um agradecimento ao Ewerton, porque além da grande amizade estamos construindo juntos a história do grupo BIO+, da qual tanto me orgulho.

Sei que posso estar deixando alguém de fora, por isso agradeço enormemente todos os integrantes do departamento de fisiologia do IB que de alguma maneira contribuíram com a construção dessa história.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	10
INTRODUÇÃO	10
HISTÓRIA	11
MELATONINA PINEAL.....	14
MELATONINA EXTRAPINEAL	17
O EIXO IMUNE-PINEAL.....	18
Melatonina e o Sistema Gastrointestinal	21
Melatonina e Pulmão.....	22
OBJETIVOS	24
MATERIAIS E MÉTODOS	26
ANIMAIS	27
DOSAGENS DE PROTEÍNAS.....	27
DOSAGENS DE MELATONINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC). 27	
DOSAGENS DE MELATONINA POR ENSAIO DE IMUNOABSORBÂNCIA LIGADO A ENZIMA (ELISA).....	28
REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	28
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
RESULTADOS.....	30
VARIAÇÃO DIÁRIA DA CONCENTRAÇÃO DE MELATONINA NA GLÂNDULA PINEAL DE RATOS	31
VARIAÇÃO DIÁRIA DA CONCENTRAÇÃO DE MELATONINA NO PLASMA DE RATOS	31
VARIAÇÃO DIÁRIA DA CONCENTRAÇÃO DE MELATONINA NO PULMÃO RATOS	31
TRANSCRIÇÃO DAS ENZIMAS DA VIA BIOSSINTÉTICA DE MELATONINA EM PULMÃO DE RATOS.....	35
DISCUSSÃO.....	37
CONCLUSÃO	42
PERSPECTIVAS	44
RESUMO	46
ABSTRACT.....	48
REFERÊNCIAS	50
ANEXOS.....	59
ANEXO I (FERNANDES, <i>et al</i> 2021)	60
ANEXO II - Revista FAPESP (ALISSON, E., 2021).....	77

ANEXO III - Jornal da USP (ESCOBAR, H., 2021)	80
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA-NAT	arilalquilamina N-acetiltransferase
AC	adenililciclase
AFMK	N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina
AMK	N1-acetil-5-metoxiquinuramina
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico
ASMT	acetilserotonina- N-metiltransferase
ATP	adenosina trifosfato
CRE	elemento responsivo a AMPc
CREB	proteína de ligação ao elemento responsivo a AMPc
DNA	ácido desoxirribonucleico
DAMP	do inglês: danger associated molecular pattern
ELISA	ensaio de imunoadsorção enzimática
GADPH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPCRs	receptor acoplado à proteína G estimulatória
GR	receptor de glicocorticóide
ICAM	moléculas de adesão intracelular
IFN- γ	interferon gama
I κ B	proteína inibitória kappa B
IKK	proteína quinase de I κ B
IL	interleucina
iNOS	síntase de óxido nítrico induzível
IP3	inositol trifosfato
NA	noradrenalina
NAS	N-acetilserotonina
NF- κ B	fator nuclear kappa B
PAMP	padrão molecular associado a patógeno
P2Y1	receptor purinérgico do subtipo 1
PBS	tampão fosfato
PKA	proteína quinase dependente de AMPc
PKC	proteína quinase dependente de cálcio
PLC	fosfolipase C
RNA	ácido ribonucleico

RT-PCR	reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa
TGI	trato gastrointestinal
TNFR1	receptor de fator de necrose tumoral do subtipo 1
TPOH	triptofano hidroxilase

INTRODUÇÃO

A melatonina é um indol derivado da serotonina e altamente conservada entre os seres vivos (REITER, Rj; MELCHIORRI, 1995). A descoberta da melatonina aconteceu a partir de seu isolamento da glândula pineal bovina, e foi a capacidade de modular a estrutura dos melanócitos na pele de sapos a sua primeira função observada em laboratório (LERNER AB *et al.*, 1957). Há inúmeros trabalhos que mostram a produção da melatonina em regiões fora da glândula pineal (extrapineal portanto), ao mesmo tempo observa-se que a melatonina extrapineal possui funções além da cronobiológica, ou seja, diferente da característica produção rítmica na glândula pineal (SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003). Atualmente, sabemos que a melatonina produzida pela glândula pineal durante o escuro tem função cronobiológica, mas existem várias outras células que a produzem também, e a produção fora da glândula pineal possui diversas funções que dependem do tecido em que a síntese ocorre (REITER; TAN; GALANO, 2014).

Existe uma ampla atribuição de atividades realizadas pela melatonina, como controle da atividade de células imunocompetentes, modulação da atividade do trato gastrointestinal, proteção contra radicais livres intracelulares, controle de células progenitoras na medula óssea além de ser um fator de prognóstico da malignidade de células de câncer, ou seja, a melatonina exerce inúmeras funções no organismo (CARRILLO-VICO *et al.*, 2005; KINKER *et al.*, 2016; KONTUREK *et al.*, 2007; LIU; BORJIGIN, 2005; MARKUS *et al.*, 2018, 2007; SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003). A melatonina pode exercer suas funções de maneira dependente ou independente de receptores. O guia de receptores da União Internacional de Farmacologia (IUPHAR) atualmente aceita dois receptores de alta afinidade (pM – nM)(JOCKERS *et al.*, 2016).

HISTÓRIA

Em 1957, o grupo do dermatologista Aaron Lerner conseguiu isolar a melatonina ao verificar que extratos de pineal bovinas clareavam a pele do anfíbio *Rana pipiens* (LERNER AB *et al.*, 1957). O efeito de clareamento de pele causado pela melatonina está relacionado à capacidade que ela possui de agrupar vesículas de melanina dentro dos melanócitos de anfíbios. Mas ainda restava a dúvida de qual seria a função da melatonina em mamíferos.

Os estudos posteriores sobre a melatonina foram direcionados a sua capacidade de modular a reprodução nas fêmeas, gerando uma controvérsia. A pinealectomia gerava diminuição do tamanho do ovário em ratas, enquanto o efeito oposto acontecia com ovelhas (FISKE; HUPPERT, 1968; SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003). Na continuidade das pesquisas percebeu-se a importância da melatonina na regulação desses e de outros processos endógenos que são influenciados pela luz ambiental e da estação do ano mais apropriada para o acontecimento dos eventos (no caso em específico é o período fértil espécie específico) (WURTMAN; AXELROD; FISCHER, 1964; WURTMAN; AXELROD; PHILLIPS, 1963). O processo de produção e a liberação de melatonina no sangue pela glândula é dependente da presença ou ausência de luz.

Com o detalhamento da estrutura química da melatonina - um anel indol com um grupamento metil - ela foi alvo de estudos a respeito de sua capacidade doadora de elétrons, o que resulta em uma participação em reações de oxidação/redução (MARSHALL *et al.*, 1996; TAN *et al.*, 2000). Além disso, os metabólitos AFMK e AMK da melatonina também são doadores de elétrons, ampliando a ação antioxidante da melatonina para uma estequiometria 3:1 (SILVA *et al.*, 2006; XIMENES; CATALANI; CAMPA, 2001); atualmente há a hipótese de que a primeira atividade exercida pela melatonina dentro da escala evolutiva (portanto ainda em organismos unicelulares) é a eliminação de radicais livres, sobretudo em organismos fotossintetizantes (TAN *et al.*, 2000). Um caso particularmente interessante que suporta essa ideia é a produção de melatonina por mitocôndrias e cloroplastos, remetendo a um surgimento no início da cadeia evolutiva (KLEIN *et al.*, 1992; TAN *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2019). Ao que tudo indica, a melatonina foi adquirindo funções cada vez mais abrangentes dentro dos grupos de seres vivos, desde a proteção de radicais livres nos grupos mais basais até uma forte interação com o sono no caso dos mamíferos (TAN *et al.*, 2000; ZHAO *et al.*, 2019).

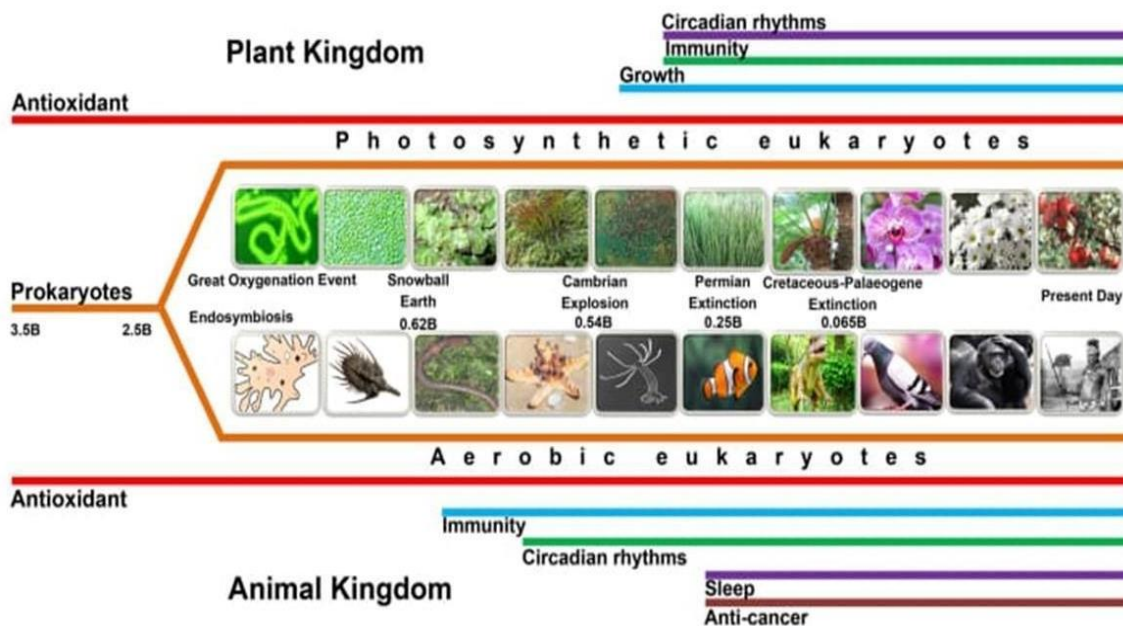


Figura 1. Provável evolução das funções da melatonina dentro dos grupos dos seres vivos (nem todos os grupos estão representados na figura). Surgindo já nos primeiros grupos de seres vivos, as cianobactérias, o mais provável é que sua primeira função foi de mitigar os efeitos deletérios do estresse oxidativo (representado na figura pela linha vermelha). As bactérias ancestrais foram internalizadas pelo processo de endossimbiose formando as mitocôndrias (vegetais e animais) e os cloroplastos (vegetais). Os novos indivíduos (eucariotos) continuam produzindo melatonina. Essa suposição é reforçada por evidências da produção de melatonina em mitocôndrias e cloroplastos. As linhas coloridas representam funções exercidas pela melatonina: a linha azul representa os grupos que utilizam da melatonina na regulação da atividade imunológica e a verde no controle do ciclo circadiano. Nos grupos de animais mais derivados a melatonina exerce as funções já citadas e também anticancerígenas e de regulação do sono (cordados em geral). As funções que a melatonina exerce nos grupos de seres vivos não necessariamente surgiram temporalmente na ordem linear representada na figura. O “b” após os números significa bilhões de anos. (ZHAO *et al.*, 2019)

A melatonina é uma molécula altamente conservada entre os grupos de seres vivos, ou seja, está presente em todos os grupos animais e também em grupos vegetais, porém as funções variam dentro dos grupos (REITER, Russel J.; TAN; GALANO, 2014; ZHAO *et al.*, 2019) (Figura 1). A via biossintética da melatonina em células vegetais está baseada em enzimas diferentes das utilizadas em animais, e sua síntese se dá nos cloroplastos (NAWAZ *et al.*, 2016).

MELATONINA PINEAL

A glândula pineal é um órgão circunventricular, situado na região posterior ao terceiro ventrículo, conhecida como epítalamo (KAUR & LING, 2017). Essa glândula, de origem ecotodérmica, a mesma do sistema nervoso é formada por pinealócitos (neurônios modificados) e células da glia (astrócitos e microglia) (SIMMONEAUX; RIBELAYGA, 2003). Os pinealócitos são as células responsáveis pela síntese de melatonina que é iniciada pela ativação de adrenoceptores do subtipo β 1. A inervação simpática é ativada quando cai a noite. A informação percebida é a diminuição da iluminação da retina. O trato retino-hipotalâmico transmite esta informação para os núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo, esta projeta para os núcleos paraventriculares que liberam disparos do trato descendente da medula espinal. Esta informação chegando ao núcleo cervical superior ativa o nervo simpático que libera noradrenalina na junção com os pinealócitos iniciando a síntese de melatonina (DUVERNOY; RISOLD, 2007; QUAN; BANKS, 2007). A entrada do claro, a qualquer hora do dia suprime a ativação dos núcleos supraquiasmáticos e a produção de melatonina pela pineal. Assim, a melatonina não pode ser considerada um hormônio circadiano, mas sim o hormônio que marca a presença e a duração do escuro.

Na membrana celular dos pinealócitos existe dois receptores para noradrenalina, os do tipo α -adrenérgicos (α_1) e do tipo β -adrenérgicos (β_1). Ao serem ativados os receptores adrenérgicos β_1 desencadeiam uma via de sinalização que inclui a ativação da enzima adenililciclase levando à síntese do segundo mensageiro adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC), subsequente ativação da proteína quinase A (PKA) que fosforila moléculas chaves para a síntese de melatonina (SIMMONEAUX; RIBELAYGA, 2003). A fosforilação do elemento de transcrição regulado por AMPC (CREB) induz a transcrição do gene que codifica enzima aril-alquil-N-acetiltransferase (AA-NAT), responsável pela conversão de serotonina em N-acetilserotonina (NAS) (MARKUS *et al.*, 2018), já a fosforilação da enzima AA-NAT é um passo necessário para sua ativação. É interessante notar que em animais de hábito noturno estes dois mecanismos são necessários para a produção de melatonina, enquanto que em animais de hábito diurno, como o homem a transcrição do gene é constitutiva e a estimulação β -1-adrenérgica leva diretamente à ativação da enzima (SIMMONEAUX; RIBELAYGA, 2003, MARKUS *et al.*, 2018). Um outro fato que merece destaque é que a fosforilação da enzima não leva à exposição de sítio ativo, ou qualquer outro mecanismo relacionado

com a sua transformação de serotonina em NAS. A fosforilação da AA-NAT impede que ela seja ubiquitinada e com isso evita sua degradação no proteossoma. Esta peculiaridade permite entender porque um flash de luz bloqueia instantaneamente a síntese de melatonina pela pineal, as moléculas de enzima transcritas são imediatamente degradadas (MARKUS *et al.*, 2018).

A ativação α -adrenérgica não é essencial para a síntese de melatonina, já havia sido demonstrado no século XX que esta ativação tem efeito potenciador (TECLEMARIAM-MESBAH *et al.*, 1999). Mais recentemente, foi demonstrado que em condições de estresse a combinação de corticosterona mais adrenalina liberadas da glândula adrenal levam a uma inibição da síntese de melatonina via ativação de receptores para glicocorticóides (GR) e receptores α -adrenérgicos (FERNANDES *et al.*, 2016).

Os terminais nervosos simpáticos liberam dois neurotransmissores armazenados em suas vesículas de liberação; a noradrenalina e o ATP. Os primeiros trabalhos que evidenciaram esta co-transmissão são do final da década de 1960 e a década de 1970. Nosso laboratório foi pioneiro em mostrar que esta neurotransmissão também ocorre na glândula pineal e que a ativação de subtipos de receptores purinérgicos também podem modular a síntese de melatonina (MORTANI BARBOSA; FERREIRA; MARKUS, 2000; SILVA FERREIRA *et al.*, 2003).

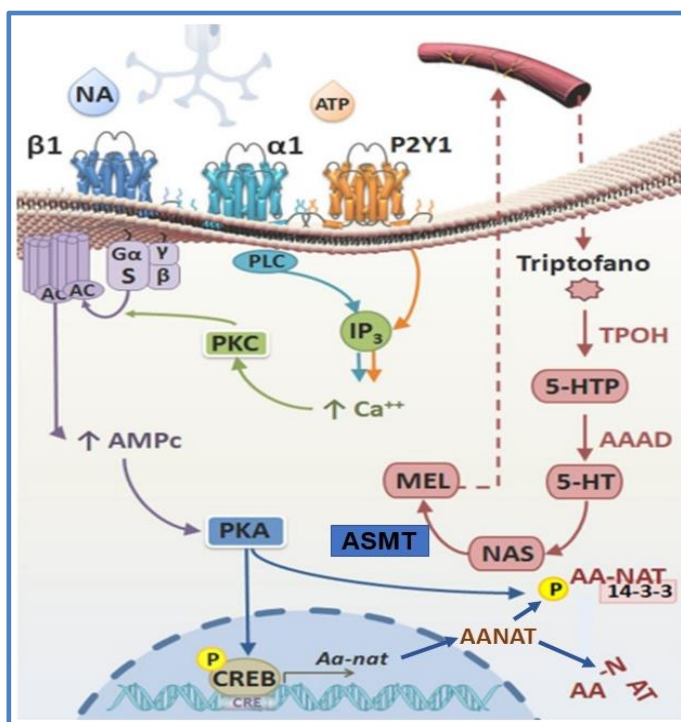


Figura 2. Durante a fase escura a informação que chega na glândula pineal é transmitida pelo sistema nervoso simpático por meio da liberação de noradrenalina (NA). A noradrenalina liga-se a receptores de membrana do tipo β_1 -adrenérgicos presentes na membrana dos pinealócitos. Esses receptores estão acoplados à proteína G e ativam adenilil ciclase (AC) que leva ao aumento de AMPc ativando uma proteína quinase A (PKA). A PKA exerce duas atividades no processo 1) fosforila a enzima AA-NAT que se liga à proteína 14-3-3 impedindo sua degradação pelo proteossoma;

2) fosforila CREB formando PCREB que interage com CRE no promotor do gene que codifica AA-NAT promovendo a transcrição do mesmo. 3) A síntese inicia-se com a conversão do triptofano em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela triptofano hidroxilase (TH). Este sofre a ação de uma desaminase não seletiva (AAAD) resultando na 5-hidroxitriptamina (5-HT), que sequencialmente é desaminada (desaminase de amino-ácidos aromáticos, AAAD), resultando na serotonina (5-HT). A 5-HT será então convertida em N-acetilserotonina (NAS) pela enzima chave da via biossintética (AA-NAT) e posteriormente convertida em melatonina pela enzima acetilserotonina N-metiltransferase (ASMT). Assim que é sintetizada a melatonina é liberada na corrente sanguínea e no líquido cefalorraquidiano. Na figura também estão representados os adrenoceptores α_1 e os purinérgicos P2Y1. A ativação destes receptores modula a atividade da AA-NAT via a ativação da proteína quinase C (PKC) (modificado de DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, 2010).

A produção de melatonina ocorre a partir do aminoácido triptofano que é transformado em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase (TPOH). O 5-HTP é descarboxilado formando serotonina também conhecida como 5-hidroxitriptamina (5-HT). Posteriormente a serotonina é acetilada em N-acetilserotonina (NAS) pela enzima AA-NAT. A NAS é finalmente transformada em melatonina pela enzima ASMT (GANGULY; COON; KLEIN, 2002; SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003) (figura 2). Essa via de biossíntese de melatonina na pineal é regulada pela fosforilação da AA-NAT enquanto que a ASMT é a enzima limitante da via durante a síntese (LIU; BORJIGIN, 2005) (LIU; BORJIGIN, 2005).

A função cronobiológica em vertebrados é resultado da síntese de melatonina pela glândula pineal, independente do animal ser de hábito diurno ou noturno, sendo a luz o fator ambiental que controla este hormônio que é sintetizado durante a fase escura

(MINNEMAN; WURTMAN, 1976). É importante ressaltar que as enzimas AA-NAT e ASMT têm a expressão regulada por condições do ambiente como a luz e também por condições de higidez do organismo. Os processos fisiológicos que regulam a produção da melatonina em estado de higidez ou de doença serão abordados mais adiante nesse trabalho.

MELATONINA EXTRAPINEAL

A melatonina não é apenas sintetizada pelos pinealócitos e fisiologicamente exerce funções que vão além da transdução do escuro. Mais recentemente, com a demonstração que as mitocôndrias sintetizam melatonina este leque tende a ser ampliado. No contexto dos mamíferos é importante entender quando a melatonina é produzida de forma independente e contínua por regiões extrapineais (BUBENIK, G. A., 2008) ou quando isto ocorre de forma coordenada com a produção pineal (MARKUS *et al.*, 2018, 2007).

Células da retina produzem melatonina de maneira rítmica e regulam a atividade dopaminérgica (DUBOCOVICH, 1983). O controle dos receptores de dopamina deixa essas células menos sensíveis a luz no período noturno. A produção rítmica de melatonina é dependente da iluminação ambiental e ocorre na glândula pineal e na retina (ACUÑA-CASTROVIEJO *et al.*, 2014a). O estudo da produção de melatonina no sistema gastrointestinal e no sistema imune terá mais destaque a partir daqui, pois a produção rítmica de melatonina pelas células da retina foge do objetivo deste trabalho.

No trato gastrointestinal existe uma produção que pode ser denominada de constitutiva, ou seja, não existe uma mudança de concentração de melatonina ao longo do dia como ocorre na retina e pineal. Os trabalhos pioneiros de George A Bubenik, mostrando que a melatonina produzida no trato gastrointestinal tem ação local, independente do ciclo claro-escuro ambiental (BUBENIK, ; DHANVANTARI, 1989) abriram um caminho que foi deixado de lado por muitas décadas. A melatonina pode ser sintetizada de forma constitutiva por tecidos extrapineais e nestas condições atuar em processos de defesa básica, inicial, independente da hora do dia e da noite.

Paralelamente, alguns grupos demonstravam que células do sistema imunológico também sintetizavam melatonina (CARRILLO-VICO *et al.*, 2013; CUZZOCREA *et al.*, 1997) e já se aventava aplicação da melatonina como fármaco (MAESTRONI, 1996). A

produção de melatonina por células de defesa não é constitutiva. Esta é induzida por processos injuriantes (CARRILLO-VICO *et al.*, 2005; MARKUS *et al.*, 2018, 2007; PIRES-LAPA *et al.*, 2013). Importante ressaltar também que a melatonina produzida tanto no trato gastrointestinal quanto por células do sistema imunológico não parece contribuir para a concentração plasmática de melatonina, tampouco apresenta função cronobiológica (BUBENIK 2008, MARKUS 2018).

O EIXO IMUNE-PINEAL

A relevância da melatonina como um integrante do sistema imunológico foi descrita pela primeira vez na década de 1920, portanto há quase cem anos por Berman (cf. CARRILLO-VICO *et al.*, 2005). Foi observado que filhotes de gatos alimentados com pineais bovinas tinham menores chances de contrair doenças infecciosas. Posteriormente estudos mostraram que a remoção da glândula pineal reduzia o tamanho de órgãos relacionados à resposta imunológica, tais como baço, timo e glândula adrenal (CSABA, BARATH, 1975).

Em nosso laboratório observou-se que durante um processo inflamatório crônico (70 dias), gerado por injeção de BCG (*Bacillus calmetteguerin*) na pata de camundongos, existe um ritmo diário do tamanho da lesão granulomatosa (LOPES *et al.*, 1997). O tamanho da pata é maior na fase de claro do que na de escuro, enquanto que este ritmo é perdido com a pinealectomia dos animais e restaurado por administração noturna de melatonina. A mudança rítmica no tamanho do granulomatoma acontece porque a melatonina regula o rolamento e a adesão de leucócitos em regiões injuriadas por inibir a expressão de moléculas de adesão (LOTUFO *et al.*, 2001; TAMURA *et al.*, 2010). Este efeito é mediado por receptores de melatonina associados à proteína G, que controlam a alteração da expressão de microRNAs relacionados com a resposta inflamatória crônica (LOTUFO *et al.*, 2001; MARÇOLA *et al.*, 2016).

Ao chegar no local da inflamação os leucócitos provenientes da circulação podem ser ativados por moléculas reconhecidas como padrões moleculares relacionados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares relacionados a perigo (DAMPs) e adquirindo capacidade fagocítica. A ligação dessas moléculas em receptores do tipo toll ativa uma via de NFκB presentes nos macrófagos. Essas mesmas moléculas geradas no processo inflamatório local e que desencadeiam a ativação dos leucócitos, caem na

corrente sanguínea e podem ser reconhecidas pelos pinealócitos (CARVALHO-SOUSA *et al.*, 2010). Nos pinealócitos também está presente a via do NFκB, mas os dímeros que são ativados diferem daqueles dos macrófagos presentes no local da inflamação (MARKUS; CECON; PIRES-LAPA, 2013b). Dessa maneira o mesmo sinal interrompe a produção de melatonina circulante pela pineal e ativa uma produção de melatonina no local da inflamação (MARKUS *et al.*, 2007). Portanto ocorre uma inversão da produção de melatonina, que deixa de ser produzida na glândula pineal e passa a ser produzida localmente por macrófagos. A essa inversão da produção de melatonina damos o nome de eixo-imune-pineal (MARKUS *et al.*, 2007) (figura 3).

A produção local de melatonina por células imunes tem uma função citoprotetora no local da inflamação. em macrófagos leva a um aumento da atividade fagocítica, sendo que o bloqueio dos receptores MT1 e MT2 de melatonina inibe essa resposta (PIRES-LAPA *et al.*, 2013) . Já em linfócitos, essa produção é responsável pelo aumento da síntese de interleucina 2 (IL-2) e também do receptor dessa interleucina (IL-2R). A regulação da IL-2 e de seu receptor IL-2R pela melatonina se dá de maneira autócrina e parácrina sendo que o bloqueio não seletivo de receptores de melatonina, MT1 e MT2, inibe a síntese tanto da interleucina quanto do seu receptor (CARRILLO-VICO *et al.*, 2005). Além disso, quando mulheres dão a luz por parto cesariano, apresentam um aumento de TNF no plasma e queda da melatonina plasmática (noturna). Essas mulheres também apresentam níveis de IL2 diminuídos no plasma que só retorna a condição normal quando caem as concentrações do TNF (PONTES *et al.*, 2007), evidenciando a dependência da melatonina para produção da IL-2.

Tanto a síntese de melatonina por macrófagos quanto a inibição da produção da mesma nos pinealócitos acontece devido a ativação de receptores do tipo toll (TLR), que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), ou receptores de citocinas pró-inflamatórias como TNFR1 (receptor de fator de necrose tumoral subtipo 1) (CARVALHO-SOUSA *et al.*, 2010; DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO *et al.*, 2012). Nos dois casos a via de sinalização do fator de transcrição NFκB é ativada e o que distingue os dois processos é a forma de ativação desta via, que é dependente do ambiente celular. No caso dos pinealócitos ocorre a translocação nuclear de dímeros que não possuem domínios de transativação, quando se ligam ao promotor do gene que codifica a enzima AA-NAT promovem o bloqueio de sua transcrição. Por outro lado, em células imunocompetentes, ocorre a translocação de dímeros de NFκB que contém o fator de

transativação induzindo a transcrição da enzima AA-NAT (MARKUS *et al.*, 2018; PIRES-LAPA *et al.*, 2013).

Portanto, não apenas a melatonina como molécula está envolvida no processo de defesa, como a glândula pineal é parte integrante deste processo, mudando sua caracterização funcional que ante era vista apenas como um transdutor neuroendócrino das condições de iluminação ambiental, passando a ser vista também como um transdutor da higidez do organismo (MARKUS *et al.*, 2018, 2007). A figura 4 apresenta um resumo do eixo-imune-pineal bem como outras biomoléculas que não foram citadas no texto mas que também participam dos eventos.

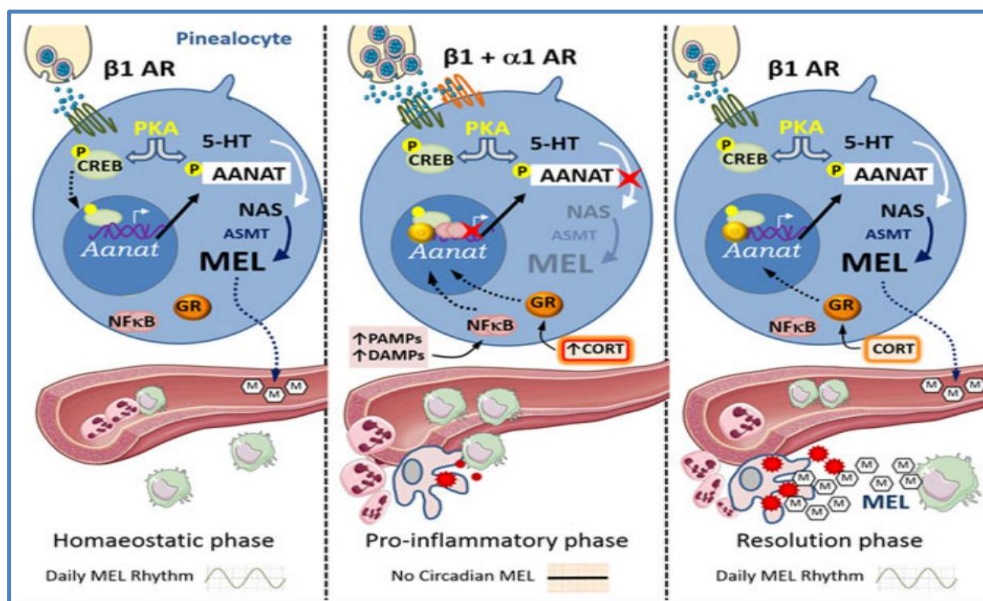


Figura 3. O eixo imune-pineal causa uma inversão de produção de melatonina quando ocorre um desafio imunológico nos tecidos do organismo. Os pinealócitos deixam de produzir e liberar melatonina na corrente sanguínea e os macrófagos passam a produzir melatonina localmente. Painel da esquerda: condição de homeostase - produção de melatonina pelos pinealócitos em condição de homeostase. Os pinealócitos são ativados pela NA que se liga aos receptores do tipo $\beta 1$ -adrenérgicos. Essa ligação ativa a PKA por meio do aumento do AMPc levando fosforilação de CREB e AA-NAT tendo como resultado transcrição de AA-NAT e produção de melatonina. Painel central: fase pró-inflamatória – monócitos residentes detectam injúria local liberando citocinas levando ao aumento da migração de leucócitos do sangue para o tecido. Nos pinealócitos PAMPs e DAMPs ligam-se a receptores de membrana e ativam NF κ B. Os dímeros p50/p50 translocam-se para o núcleo e reduzem a transcrição do gene Aanat. A atividade simpática aumentada ativa receptores do $\alpha 1$ e $\beta 1$ adrenérgicos nos pinealócitos que em conjunto com glicocorticóides (corticosterona/cortisol) bloqueia a síntese de melatonina da pineal. A inibição da melatonina noturna permite a migração de leucócitos no local da injúria. Os neutrófilos ativados produzem citocinas pró-inflamatórias levando a diferenciação de monócitos em macrófagos iniciando a limpeza do tecido. Painel direito: fase de resolução – a melatonina é sintetizada localmente por macrófagos e atua de forma autócrina/parácrina potencializando o processo de fagocitose. A síntese de melatonina por macrófagos é mediada pela ativação dos dímeros cRel/RelA de NF κ B e essa ligação promove a transcrição do gene Aanat. Na glândula pineal a medida que ocorre a diminuição do tônus simpático a ativação de GR favorece a transcrição de Aanat e a produção de melatonina é restabelecida (MARKUS *et al.*, 2018).

Melatonina e o Sistema Gastrointestinal

O trato gastrointestinal foi inicialmente o local de produção extrapineal de melatonina mais amplamente estudado no meio científico. Tendo em vista algumas semelhanças com o pulmão merece um capítulo à parte nesta dissertação.

Tanto o pulmão como o trato gastrointestinal possuem são caracterizados por estar em contato direto com o meio ambiente e sofrer desafios imunológicos constantes. No trato gastrointestinal existe uma exposição constante a bactérias que habitam a luz do trato. No pulmão o ar que chega aos alvéolos por meio das vias respiratórias possui partículas e mesmo agentes patogênicos que apresentam desafios constantes ao sistema imunológico. Foi assumido a hipótese de que esses locais poderiam acumular melatonina por sua característica lipofílica e a hipótese de que havia uma produção independente nesses locais foi inicialmente descartada. Mas na retina, existe uma produção rítmica independente da glândula pineal, marco relevante para o surgimento de hipóteses de sua produção em vários tecidos animais (DUBOCOVICH, 1983). O estudo começou com a observação da presença de melatonina nas cavidades do apêndice humano que levou ao estudo dessa produção no trato gastrointestinal de vários animais (BUBENIK, G. A., 2008).

A melatonina no trato gastrointestinal não está relacionada com o padrão e volume de alimentação animais (BUBENIK, G. A., 2008). Sua distribuição regional é própria de cada espécie. Em suínos as maiores concentrações estão no cólon transversal, enquanto nos bovinos está no rúmen. Em roedores não há uma porção que se destaca. Ao avaliar cortes transversais, independente da porção longitudinal em questão, a maior concentração de melatonina está próxima à luz do órgão (BUBENIK, G. A., 2008; BUBENIK, G. A., 1980; BUBENIK, G. A. *et al.*, 1999; BUBENIK, G..

A produção gastrointestinal de melatonina ficou mais evidente com os trabalhos em ratos pinealectomizados que não apresentaram quedas nas concentrações gastrointestinais de melatonina, evidenciando que a produção de melatonina acontece independente da glândula pineal (BUBENIK ; BROWN, 1997). A função da melatonina de origem gastrointestinal ainda não está totalmente esclarecida. Existem pelo menos duas hipóteses bem aceitas, a primeira é de que essa produção auxilia na regulação do trânsito gastrointestinal, aumentando a motilidade durante o dia, e a segunda diz respeito à regulação de células imunológicas presentes no trato pois este sofre com presença

constante de microrganismos oportunistas (BUBENIK 2008; ZHAO *et al.*, 2019). É importante ressaltar aqui a relevância da melatonina produzida por células do sistema imune aumentando a atividade de fagocitose o que pode ser uma justificativa para a melatonina aumentada nas proximidades da luz intestinal onde se concentram mais bactérias (BUBENIK 2008; ZHAO *et al.*, 2019).

Melatonina e Pulmão

O pulmão, assim como o trato gastrointestinal, possui particularidades anatômicas que apresentam desafios ao sistema imune devido à realização das atividades de trocas gasosas. Esses dois locais estão expostos ao meio ambiente, o pulmão devido ao contato direto com o ar inspirado e tecido gastrointestinal devido ao contato com os alimentos. As membranas mucosas pulmonares e intestinais são constituídas também por quantidades expressivas de células imunes formando uma barreira protetora nesses locais (MOWAT; SCOTT; BAIN, 2017).

O alvéolo pulmonar é a região do sistema respiratório onde as trocas gasosas acontecem, é separado dos capilares sanguíneos por uma camada de tecido muito estreita e é também o local onde injúrias do ambiente externo tem maior potencial agressivo (MARTIN; FREVERT, 2005; NEWHOUSE; SANCHIS; BIENENSTOCK, 1976a, b). Nesse ambiente é encontrado o macrófago alveolar, que representa cerca de 90 a 95% das células presentes no líquido surfactante e é a principal célula de defesa do alvéolo (HUSSELL; BELL, 2014;).

Em nosso laboratório foi observado que a poluição atmosférica induz a produção de melatonina no pulmão e inibe as concentrações de melatonina plasmática. Esses achados são provenientes de uma série de experimentos com ratos expostos a uma alta concentração de partículas de diesel. Ao expor colocar esses animais em um ambiente poluído o tecido pulmonar foi exposto a um ambiente potencialmente danoso. Essa exposição uma queda das concentrações de melatonina plasmática e um aumento de TNF circulante. As glândulas pineais desses animais apresentaram uma queda na expressão das enzimas de biossíntese de melatonina enquanto que o tecido pulmonar apresentou um aumento de transcrição das mesmas enzimas indicando que o eixo-imune-pineal foi ativado (CARVALHO-SOUSA *et al.*, 2020).

Ao ativar macrófagos alveolares em meio de cultura com essas partículas de diesel foi observado a expressão de AANAT e ASMT bem como um aumento da fagocitose das partículas de diesel (CARVALHO-SOUSA *et al.*, 2020). É evidente que durante o processo inflamatório causado pela poluição o pulmão é protegido por macrófagos alveolares que produzem melatonina localmente. Mas semelhante ao que acontece no tecido gastrointestinal o pulmão sofre constantemente com a sua exposição ao meio ambiente, como já foi destacado no capítulo anterior (BUBENIK, 2008; NEWHOUSE; SANCHIS; BIENENSTOCK, 1976a, b).

É importante notar que tanto a produção de melatonina pela glândula pineal quanto por tecidos extrapineais são dependentes da expressão e da ativação das mesmas enzimas: AA-NAT e ASMT (MARKUS *et al.*, 2018; WURTMAN; AXELROD; FISCHER, 1964). Isso indica que o estudo da melatonina extrapineal, em qualquer que seja o tecido do animal, tem sempre em vista a observação dessas duas enzimas no local.

Estes achados evidenciam a ativação do eixo imune-pineal no pulmão em condições de injúria e conseqüentemente a produção de melatonina localmente. Porém, ainda não há evidências de uma produção local de melatonina no pulmão de animais em condições de higidez. Sabendo que os macrófagos alveolares tem potencial para a expressão da via de síntese de melatonina e sabendo que o local em que estão presentes é constantemente desafiado pelo meio ambiente, é razoável supor que a produção de melatonina não ocorra apenas em processo inflamatórios agudos no pulmão, mas que ocorra também em animais no estado hígido.

Tendo em vista todos os achados até aqui, este trabalho se propôs a estudar e verificar a existência de uma produção de melatonina extrapineal no pulmão de animais em estado de higidez.

OBJETIVOS

Investigar se o tecido pulmonar de animais hígidos é capaz de sintetizar melatonina.

Alcançado este objetivo poderíamos inferir que a melatonina produzida localmente no pulmão participaria de uma primeira linha de defesa contra agentes injuriantes inspirados.

MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos normais adultos (250 – 300g) da linhagem Wistar com 70 a 90 dias de vida. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro 12h/12h, luzes acesas às 06h00. Nas transições entre claro/escuro (ZT12) e escuro/claro (ZT0) foram feitos dois grupos distintos: um grupo teve a eutanásia 15 minutos antes, e outro 15 minutos depois, da alteração abrupta da iluminação ambiental. Todos os animais utilizados foram obtidos do biotério do departamento de fisiologia IB-USP. A eutanásia dos animais foi realizada por decapitação começando pelo ponto na qual as luzes são acesas (ZT0) e posteriormente a cada 3 horas. Após a eutanásia esses animais tiveram o pulmão removido e imediatamente congelado em nitrogênio líquido (-170°C) para obtenção de amostras para ELISA, e PCR. Posteriormente os pulmões foram retirados do nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C. Comitê de ética para o uso de animais em experimento nº 198/2014.

DOSAGEM DE PROTEÍNA

Proteína foi dosada pelo ensaio de *Bradford*. O ensaio de *Bradford* é um ensaio colorimétrico para determinação total de proteína baseado na mudança de absorvância do corante que reage ficando azul. O reagente usado foi *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad, Califórnia EUA, REF: #500-0006). As concentrações de proteína das amostras usadas para determinar melatonina estavam em torno de 20-36 µg/µL, distribuídos de forma aleatória.

DOSAGENS DE MELATONINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

O conteúdo de melatonina presente nas pineais foi determinado por HPLC (Waters System, Milford, MA, EUA). O sistema cromatográfico foi composto por uma bomba Waters® 1525m operada isocraticamente em temperatura ambiente, uma coluna de fase reversa Resolve C18 (partícula esférica de 5 mm, 3,9x150 mm) (Waters System, Milford, MA, EUA) e um detector eletroquímico Waters® 2465 operado em modo DC (corrente contínua), controlado pelo programa computacional Empower (Waters System, Milford, MA, EUA). A fase móvel para dosagem de melatonina (acetato de sódio 0,1 M, ácido cítrico 0,1 M, EDTA 0,15 mM e metanol 25%, pH 3,7) fluiu com fluxo de 0,95 mL/min. e 0,50 mL/min., respectivamente. O potencial do detector foi ajustado para

+0,90 V versus eletrodo de referência Ag/AgCl. Para a realização da análise, 30 mL de homogeneizado de pineal ou de padrões para cada analito foi injetado diretamente no sistema cromatográfico.

DOSAGENS DE MELATONINA POR ENSAIO DE IMUNOABSORBÂNCIA LIGADO A ENZIMA (ELISA)

Para a dosagem de melatonina foi utilizado o protocolo já estabelecido no laboratório para o tecido pulmonar (PEREIRA, 2016). As amostras foram pulverizadas em nitrogênio líquidos, homogeneizadas em tampão Tris-HCl pH 7,4 acrescidos de 1mM de EGTA e 1mM de EDTA. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 20000g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado para dosagem de melatonina e quantificação de proteínas. A quantificação da melatonina nas amostras foi realizada no kit de ELISA para melatonina em saliva sem extração (IBL, Hamburgo, Alemanha, REF: RE54041). Os procedimentos para realização da técnica foram realizados seguindo as instruções do fabricante.

REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

As amostras foram pulverizadas em nitrogênio líquido. A extração de mRNA foi realizada com trizol, seguida de clorofórmio e álcool 75%. O mRNA foi centrifugado a 12000g, 15 minutos a 4°C e a quantificação foi realizada pelo aparelho *nanodrop*. Foi utilizado 2µg de mRNA tratado com DNase I (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Califórnia, EUA, REF: 1734501), a conversão para cDNA foi realizada com a enzima transcriptase reversa (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA, REF: 4368814). Foi seguido as recomendações dos fabricantes para cada um dos produtos.

As sequências utilizadas para a amplificação do *Aanat* foram:

F: CTCAGGAGTCGCTGACACTA

R: TCCCCAGGTGGTGAAGGTAT.

As sequências para amplificação do *Asmt* foram:

F: AGCGCCTGCTGTTCATGAG

R: GGAAGCGTGAGAGGTCAAAGG.

As sequências utilizadas para a amplificação do *Gapdh* foram:

F: GCCCAGAACATCATCCCTG

R: GGAACACGGAAGGCCATG.

A enzima utilizada no PCR foi a Taq polimerase (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA, REF: K1081), a amplificação se deu por 40 ciclos, e as temperaturas utilizadas foram 94°C (30 s.) para a desnaturação, 60°C (30s) para anelamento e 72°C (30s) para extensão da fita. O gel utilizado foi 2% de acrílico de 0,005% de brometo de etídio. A corrida foi em 80mV durante 1 hora. A fluorescência do gel se deu por iluminação por luz ultravioleta em uma câmara escura.

PCR EM TEMPO REAL

A técnica de RT-PCR em tempo real foi realizada para determinar a transcrição genica de *Aanat*, *Asmt* e *Cyp11b1*. As amostras foram preparadas utilizando-se 1 µL do cDNA construído, com adição de 400 nM de primer e IQ SYBR Green Supermix (Applied Biosystems; Foster City, EUA) para volume final de 20 µL. A normalização dos dados obtidos foi realizada utilizando-se primer específico para *Gapdh*. A fluorescência obtida neste ensaio é proveniente do fluoróforo SYBR GREEN. A reação foi realizada em aparelho ThermoCycler (Thermo fisher Scientific) na sequência de um ciclo de 10 minutos a 94 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 94°C, seguido de 1 minuto a 60°C e 81 ciclos de 10 segundos, iniciando aos 55°C aumentando 0,5°C a cada ciclo, finalizando assim, aos 94 °C. A concentração do RNAm foi calculada utilizando o valor do threshold cycle (Ct) da amplificação dos genes alvos, obtido através do software do iQ iCycle. A quantificação relativa foi feita pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta\Delta Ct$ representa a diferença entre os ciclos, normalizada pela referência interna (*Gapdh*).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das análises desse trabalho foram apresentados como média \pm o erro padrão da média (EPM), e todos os testes estatísticos adotaram o valor crítico de significância $p < 0,05$. Para comparação de média entre dois grupos foi realizado um teste *t* de Student. Para comparar a média entre mais de dois grupos foi realizado uma análise de variância ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Para realização dos testes estatísticos foi utilizado o software GraphPad Prism 8.

RESULTADOS

VARIAÇÃO DIÁRIA DA CONCENTRAÇÃO DE MELATONINA NA GLÂNDULA PINEAL DE RATOS

A concentração de melatonina na glândula pineal variou com ciclo claro e escuro sendo encontrado a mais alta concentração nas pineais dos ratos que tiveram a eutanásia no ZT18 ($0,97 \pm 0,22$ ng/pineal; n= 5). A melatonina dosada nas glândulas pineais dos ratos utilizados neste trabalho apresentou característica esperada de maiores concentrações durante a fase escura do dia. Os dados de melatonina dosada na glândula pineal estão apresentados no gráfico da figura 4.

VARIAÇÃO DIÁRIA DA CONCENTRAÇÃO DE MELATONINA NO PLASMA DE RATOS

A concentração de melatonina no plasma dos ratos estudados apresentou variação na concentração e as concentrações mais altas foram encontradas na fase escura do dia no ZT 15 ($401,06 \pm 2,48$ pg/mL; n=3). A melatonina dosada no plasma dos ratos utilizados neste trabalho apresentou característica esperada de maiores concentrações durante a fase escura do dia. Os dados de melatonina dosada no plasma estão apresentados no gráfico da figura 5.

VARIAÇÃO DIÁRIA DA CONCENTRAÇÃO DE MELATONINA NO PULMÃO RATOS

A concentração de melatonina no pulmão variou ao longo das 24 horas (figura 6), mas o pico máximo foi observado em ZT06 ($0,20 \pm 0,01$ ng/mg de proteína; n=4), isto é, nos animais que tiveram a eutanásia no meio da fase de claro (meio dia). Essa medida é estatisticamente diferente da melatonina observada no pulmão dos demais animais do ZT03 e ZT09 (respectivamente $0,05 \pm 0,02$ e $0,020 \pm 0,002$ pg/mg de proteína;) que são horários próximos. Também se observa valores de concentrações mais baixas que ZT06 nos horários da fase escura como em ZT15, ZT18 e ZT21 (respectivamente $0,015 \pm 0,002$; $0,07 \pm 0,03$; $0,015 \pm 0,003$ pg/mg de proteína). Esse é um resultado interessante visto que o pico de melatonina ocorre na fase de escuro.

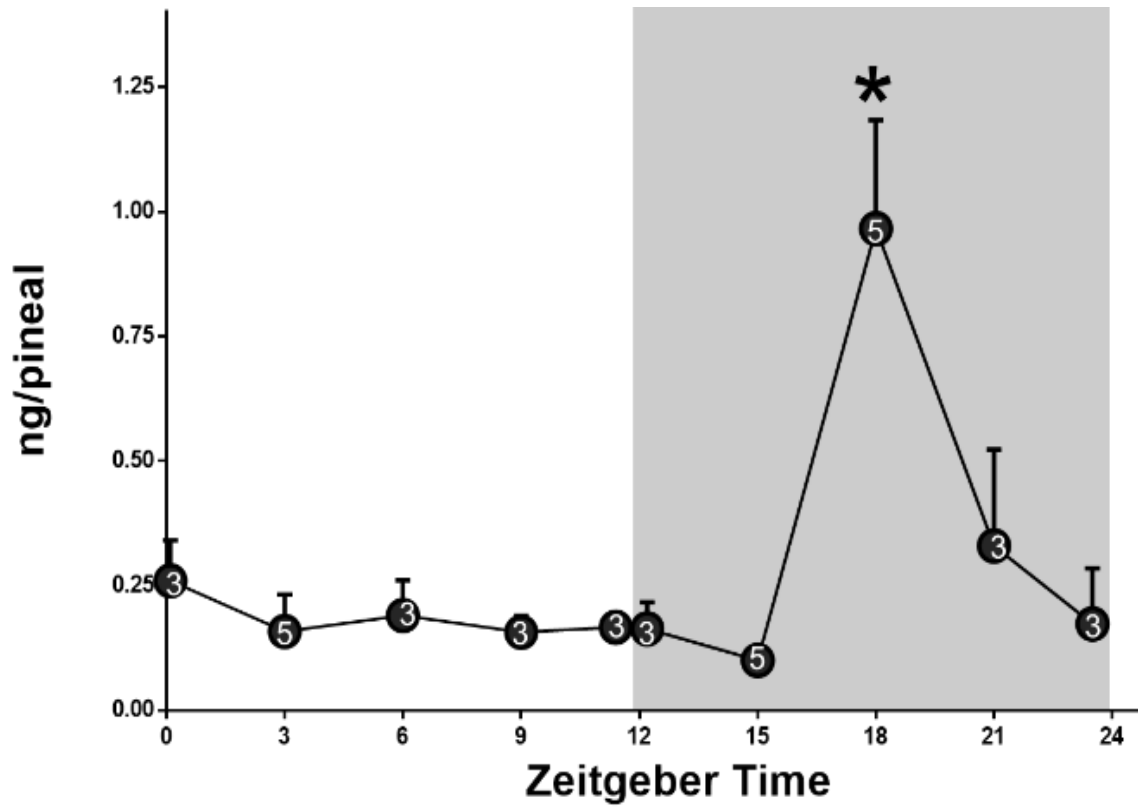


Figura 4. Variação diária de melatonina na glândula pineal. O quadro cinza representa a fase escura do dia. Os dados estão expressos como média \pm EPM, $n=3-5$ animais. O número de animais em cada ponto é mostrado dentro dos círculos. A comparação entre os horários foi feita por ANOVA seguida do teste de Tukey. * $p<0,05$.

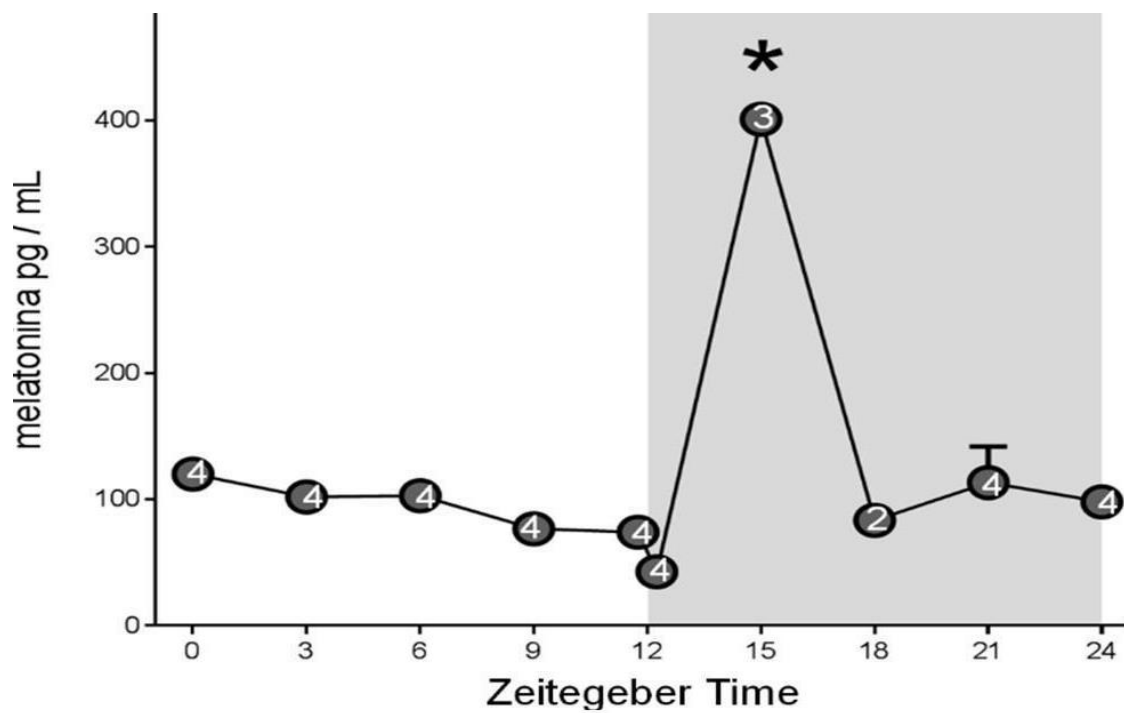


Figura 5. Variação diária de melatonina no plasma de ratos. As concentrações de melatonina no pulmão são dadas em picogramas (pg) e normalizadas por mililitros de plasma (mL). O quadro cinza representa a fase escura do dia. Os dados estão expressos como média \pm EPM, n=2-4 animais. O número de animais em cada ponto é mostrado dentro dos círculos. A comparação entre os horários foi feita por ANOVA seguida do teste de Tukey, e foi considerado estatisticamente significativo * $p < 0,05$.

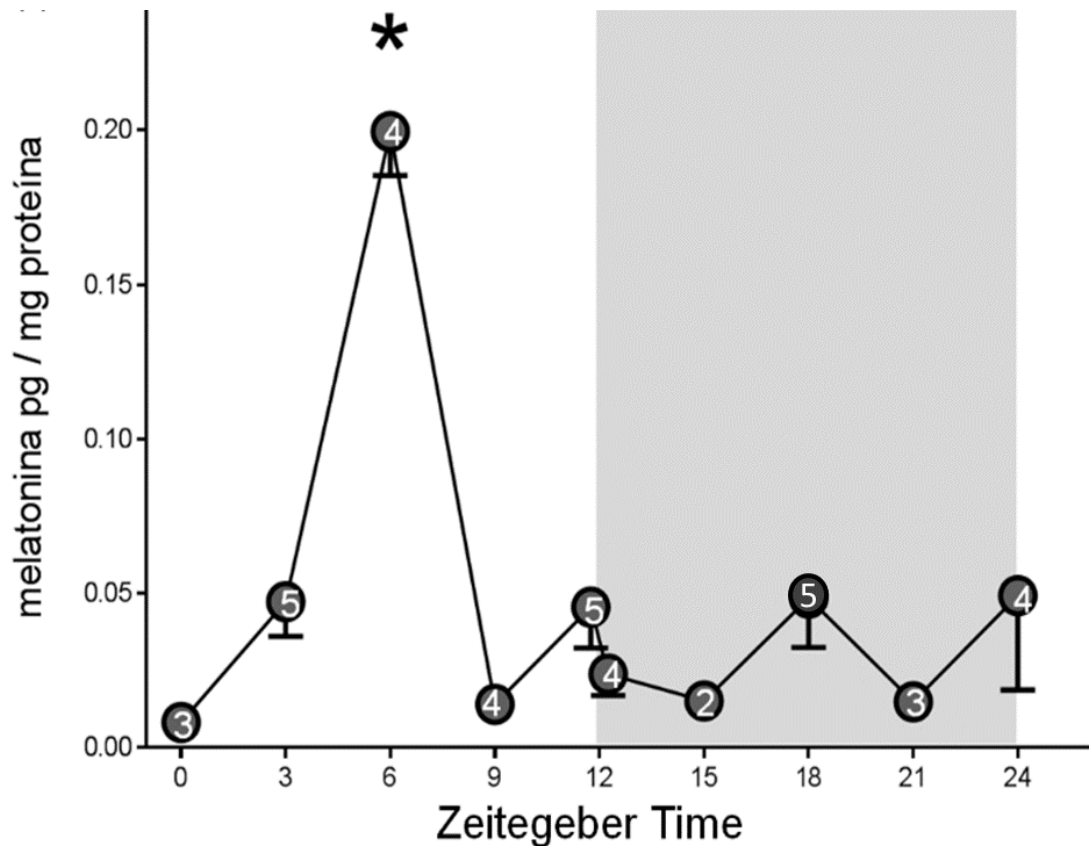


Figura 6. Variação diária de melatonina no pulmão de ratos. O quadro cinza representa a fase escura do dia. Os dados estão expressos como média \pm EPM, $n=2-5$ animais. O número de animais em cada ponto é mostrado dentro dos círculos. A comparação entre os horários foi feita por ANOVA seguida do teste de Tukey. * $p<0,05$.

TRANSCRIÇÃO DAS ENZIMAS DA VIA BIOSSINTÉTICA DE MELATONINA EM PULMÃO DE RATOS

Foi quantificada a transcrição gênica da via de síntese e degradação da melatonina. A técnica utilizada foi PCR em tempo real. As análises foram realizadas com os dados obtidos comparando a transcrição de cada ZT analisado ao ZT18. Os três genes estudados tiveram o ZT18 como ponto de referência. Os dados foram quantificados e não apresentaram diferença estatística entre os grupos para os genes *Aanat* e *Asmt* contudo houve um aumento da transcrição de *Cyp1b1* no ZT18 quando comparado aos demais pontos do mesmo gene (figura 7).

A transcrição dos genes *Aanat*, *Asmt* e *Cyp1b1*, quando observados em conjunto apresentam claramente um valor basal, ou seja, independente do horário, existe transcrição dos genes de maneira constante (figura 7). Não se observou diferenças estatísticas entre os horários estudados para os genes *Aanat* e *Asmt*. Apesar de não haver diferenças estatísticas, o gráfico mostra uma correlação entre os genes estudados. Para uma visualização melhor dessa correlação na transcrição dos genes *Aanat*, *Asmt* e *Cyp1b1*, a figura 7 apresenta os três genes em conjunto.

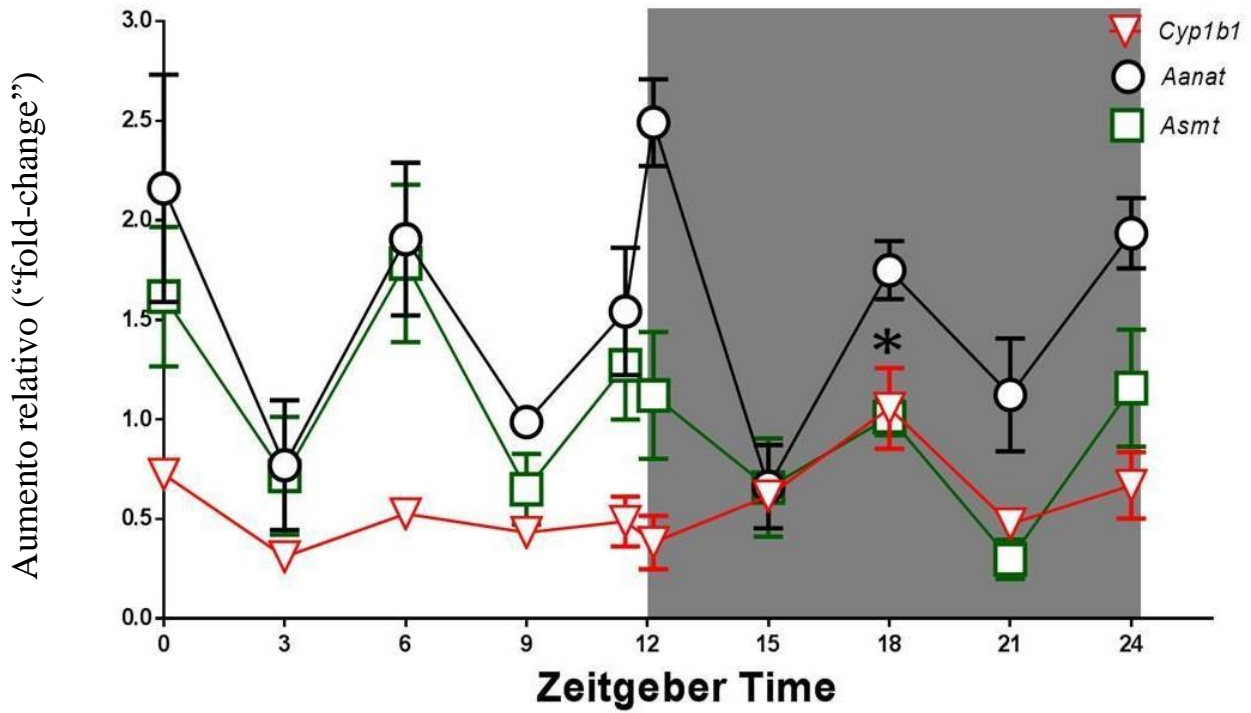


Figura 7 – PCR em tempo real dos genes *Aanat*, *Asmt*, *Cyp1b1*. A transcrição dos genes foi apresentada em conjunto neste gráfico. A linha preta apresenta os valores da *Aanat*, a linha verde valores da *Asmt* e vermelha da *Cyp1b1*. A variação gênica (aumento relativo; “fold-change”) está expressa como aumento relativo normalizado por *Gapdh*. Dados expressos como média \pm EPM - ANOVA seguida de teste de Tukey. $F = 0.0014$. $n=4$.

DISCUSSÃO

Em estudos que tinham por objetivo avaliar a relevância da melatonina pulmonar no controle de respostas inflamatórias foi verificado que esta indolamina é produzida em ratos saudáveis (CARVALHO-SOUSA *et al.*, 2020). Ao mesmo tempo foi observada a presença das enzimas de síntese, AANAT e ASMT, o que sugeria que a produção era local. Reforçando esta observação “in vivo”, foi mostrado que macrófagos alveolares em cultura era capaz de sintetizar melatonina.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de confirmar que o pulmão de sujeitos hígidos produz melatonina e verificar se esta produção teria alguma relação com a melatonina circulante.

A literatura aceita que a melatonina plasmática é derivada da produção pineal (WURTMAN; AXELROD; PHILLIPS, 1963). Esta origem implica em altas concentrações na fase de escuro, quando comparadas com a fase de claro do ciclo claro/escuro ambiental. Nossos dados reforçam esta hipótese apresentada há 60 anos atrás porque o ritmo diário da melatonina pulmonar não acompanha a plasmática.

Por muitos anos acreditou-se que, sendo a melatonina uma molécula anfipática, que facilmente se difundiria do sangue para os tecidos (WURTMAN; AXELROD; PHILLIPS, 1963), o ritmo de melatonina no pulmão seria um reflexo da melatonina sintetizada pela pineal. Nossos dados contrapõe-se a esta hipótese e mostra claramente que não apenas em condições de resposta imune-inata (CARVALHO-SOUSA *et al.*, 2020; MARKUS *et al.*, 2018), mas também em animais saudáveis o pulmão sintetiza sua própria melatonina. O pico de melatonina pulmonar observado em ZT06 foi algo inesperado, e não está claro o contexto fisiológico envolvido. Ainda assim, a melatonina encontrada no pulmão suporta a hipótese de que existe uma produção pulmonar, e também que essa produção no tecido pulmonar é independente da glândula pineal.

No trato gastrointestinal existe uma concentração de melatonina local que independe das concentrações plasmáticas (BUBENIK, G. A., 2008; BUBENIK, G. A.; BROWN, 1997) . Ou seja, não é algo tão surpreendente que outro local além do trato gastrointestinal venha a apresentar essa condição de produção constitutiva de melatonina. Vale ressaltar aqui, outra situação onde a correspondência sangue/tecido não ocorre é justamente em células de defesa ativadas, como já foi amplamente mostrado em nosso laboratório (MARKUS *et al.*, 2018, 2007).

O pulmão de mamífero tem como sua principal função as trocas gasosas, entrada de oxigênio para organismo e liberação de dióxido de carbono ao meio ambiente. A passagem dos gases por difusão é favorecida pela anatomia do alvéolo pulmonar que apresenta uma superfície de contato ampla e estreita, o que aumenta também a exposição aos agentes nocivos inalados como bactérias, vírus, agentes alérgicos e poluentes (NEWHOUSE; SANCHIS; BIENENSTOCK, 1976a, b) . Nosso laboratório já demonstrou que partículas nocivas presentes no meio ambiente ao entrar em contato com os macrófagos, são reconhecidas como sinais de perigo pelos receptores tipo “toll” presentes nas membranas dos macrófagos alveolares (CARVALHO-SOUSA *et al.*, 2020). Essa ação ativa a via NFκB, que além de induzir genes pró-inflamatórios, induz a expressão da enzima AANAT, essa condição é observada *in vivo* e também *in vitro* (DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO *et al.*, 2010; MARKUS; CECON; PIRES-LAPA, 2013) . As evidências discutidas até aqui colocam os macrófagos alveolares como prováveis células responsáveis por manter essa concentração de melatonina pulmonar alta, sobretudo o pico do ZT06 (figura 7). Como já foi demonstrado em nosso laboratório, os ratos expostos a partículas poluentes apresentaram queda da melatonina plasmática e aumento da concentração de melatonina no pulmão foi causado por uma produção de macrófagos alveolares (CARVALHO-SOUSA *et al.*, 2020). Em condições basais os macrófagos alveolares representam 90-95% da população celular no espaço alveolar, e similarmente as células de Langerhans se auto renovam ou se diferenciam de monócitos não circulantes. Os macrófagos alveolares removem a maioria das partículas nocivas que chegam ao alvéolo e controlam negativamente o quadro inflamatório. Já os macrófagos intersticiais que estão localizados dentro do tecido pulmonar, não estão em contato direto com o fluido alveolar e sua função ainda não está totalmente esclarecida mas acredita-se que auxiliam no controle do quadro inflamatório (COOK; NAKANO, 2015; HUSSELL; BELL, 2014; MINUTTI *et al.*, 2017a, b; WRIGHT, 2005). Esses achados mostram a complexidade do sistema imunológico nos diferentes tecidos, e também o papel que a melatonina apresenta na regulação desse sistema de maneira particular para cada tecido, em especial no pulmão, tema deste trabalho (ACUÑA-CASTROVIEJO *et al.*, 2014; STANFORD, 2018).

Um caso interessante é o que acontece na medula óssea. Na medula óssea existe rítmica de TNF, portanto um TNF fisiológico, o qual parece regular a produção de melatonina no local, pois o pico de melatonina noturno observado em camundongos normais é bloqueado por antagonistas de receptores de TNF e não ocorre em animais

nocautes para estes receptores (GOLAN *et al.*, 2018). A produção local de melatonina regula a egresso células imunológicas da medula óssea para o sangue e o retorno das mesmas em períodos específicos do dia e da noite por meio dos receptores MT1 e MT2 de melatonina. Além disso a melatonina parece regular o processo de produção de células imunológicas na medula a partir das células tronco medulares (GOLAN *et al.*, 2018). Como o pulmão também é um órgão capaz de produzir células do sangue, e a relação entre megacariócitos e pulmão é bastante conhecida desde a década de trinta (LEFRANÇAIS *et al.*, 2017). A melatonina pulmonar encontrada neste estudo, pode ter uma relação direta com o controle tanto de migração de células imunológicas no tecido, quanto na ativação dessas células para a defesa dos alvéolos pulmonares. Esse pico de melatonina no ZT06 da fase clara (figura 7), tal como a regulação entre a transcrição e expressão de ASMT, aponta para um quadro bastante peculiar que se apresenta no sistema respiratório. Essa condição levanta a possibilidade de uma produção local de melatonina que é estritamente controlada, pois as concentrações variam durante o claro e o escuro, diferente do que ocorre no trato gastrointestinal onde as concentrações de melatonina não possui essa variação (BUBENIK, George A *et al.*, 1999; BUBENIK, George A; BROWN, 1997; KONTUREK *et al.*, 2007).

A expressão da enzima ASMT no pulmão é alta durante a fase clara do dia, apresenta uma queda a partir da mudança de fase e não foi detectada em ZT18 que é o meio da fase escura (figura 9). A transcrição do gene *Asmt* corroboram com o que já foi visto no tecido pulmonar, existem trabalhos demonstrando que esse gene é transcrito no tecido (RATH *et al.*, 2016; STEFULJ *et al.*, 2001). Contudo, a transcrição da *Asmt* no tecido pulmonar na condição de hígidez é baixa, razão pela qual foi necessária uma análise muito acurada desse gene no nosso estudo. Embora não apresente uma diferença estatística entre os grupos, esse gene parece ter uma oscilação na passagem da fase clara para a fase escura. Esse tipo de oscilação na transcrição gênica durante a troca do claro-escuro é um fenômeno que já foi observado pelo nosso grupo de pesquisa (DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO *et al.*, 2017). A transcrição da *Aanat* segue um padrão de transcrição muito semelhante ao da *Asmt*, mas não apresenta a mesma inversão na mudança de fase claro para escuro. É possível observar ainda, uma correspondência na transcrição dos dois genes (figura 10). Nossos dados apontam para uma sincronia entre os genes *Aanat* e *Asmt* reforçando a hipótese de que a melatonina observada no tecido pulmonar pode ser realmente de uma produção local e provavelmente exerce uma função regulatória no sistema imunológico local (CARVALHO-SOUSA *et al.*, 2020; MARKUS *et al.*, 2018).

Os pulmões dos animais estudados não apresentaram aumento na concentração de melatonina na fase escura. Seria esperado que no escuro houvesse aumento na concentração de melatonina pulmonar devido ao aumento da melatonina plasmática. Uma explicação para essa ausência pode ser devido ao aumento na transcrição do gene que codifica a enzima CYP1B1 (figura 10). Essa produção local de melatonina no pulmão tem uma característica muito peculiar, pois possui um pico de concentração no meio da fase clara o que coincide com uma expressão aumentada de *Asmt* no local que também é maior durante a fase clara do dia. Qual a relevância fisiológica deste achado neste trabalho?

Este trabalho é pioneiro na demonstração que o pulmão de ratos saudáveis produz melatonina independente da glândula pineal. O fato de encontrarmos um ritmo tanto no conteúdo desta indolamina quanto na transcrição dos genes envolvidos na via biossintética e de degradação ainda não permite enfatizar um ritmo diário. Este fato deve ser confirmado em outros laboratórios. Nossos dados também permitem especular que a produção de melatonina pelo pulmão seja relevante para defesa de injuriantes que entram pelo espaço aéreo. Em outras palavras, uma primeira linha de defesa independente da ativação do sistema imunológico.

Neste contexto, publicamos um trabalho em 2021 (FERNANDES *et al.*, 2021) levantando a hipótese que a melatonina pulmonar poderia ser um fator de proteção em relação à infecção por COVID-19.

CONCLUSÃO

- 1- O presente trabalho mostrou que animais hípidos apresentam melatonina no tecido pulmonar independente das fases claro e escuro.
- 2- A concentração de melatonina pulmonar não pode ser explicada pela melatonina encontrada no plasma durante a fase escura.
- 3- Existe uma sincronia na transcrição gênica da via de síntese e da enzima de degradação de melatonina CYP1B1 no tecido pulmonar, indicando um sistema de produção extrapineal de melatonina no pulmão de animais hípidos.

PERSPECTIVAS

A melatonina encontrada no pulmão de animais hígidos levanta muitos questionamentos a respeito da função que essa molécula exerce no tecido pulmonar, sobretudo nas células do sistema imune presentes nos alvéolos, uma vez que o pulmão é desafiado constantemente pelo ambiente.

1 – No processo evolutivo de saída dos vertebrados do meio aquático para o meio terrestre. Nestas espécies a troca gasosa é de responsabilidade da epiderme. Levantamos a hipótese que a melatonina produzida por pulmões de anfíbios e peixes pulmonados poderia exercer função de monitoramento do ar ambiental.

2 – A infecção por SARS-CoV2 resulta em indivíduos que apresentam sintomas e adquirem a doença COVID-19, bem como em sujeitos que são assintomáticos ou pré-sintomáticos. Seria a melatonina sintetizada pelos pulmões um fator de proteção contra a infecção viral? A primeira resposta foi publicada em janeiro de 2021 e pode ser conferida no ANEXO I (FERNANDES et al., 2021). Também está incluso nos anexos os artigos de divulgação sobre este trabalho que foram publicados na revista on-line da Agência FAPESP escrito pelo jornalista Elton Alisson (ANEXO -II) e no Jornal da USP escrito pelo jornalista Herton Escobar (ANEXO III), e esses dois artigos de divulgação foram publicados neste ano de 2021.

RESUMO

RIBEIRO-PAZ, E.D. Pulmão como uma Fonte Extra-Pineal de Melatonina. 86f. Dissertação de Mestrado em Fisiologia – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021. Melatonina, uma indolamina resultante da acetilação e metilação da serotonina, é conhecida como o hormônio sintetizado pela glândula pineal de vertebrados. Este hormônio é produzido à noite e informa a todo o organismo que está escuro. Melatonina é sintetizada em muitas outras regiões do organismo de forma rítmica, como na retina ou sob demanda quando o eixo imuno-pineal é ativado. Já era sabido que o pulmão produzia melatonina sob demanda quando animais eram expostos à poluição ou estimulados com lipopolissacarídeo derivado de bactérias Gram-negativas. No entanto, dados não publicados sugeriam que o pulmão de animais normais poderia produzir melatonina de forma constitutiva, independente da função pineal. Neste estudo exploramos esta questão e verificamos que o pulmão de ratos hígidos transcreve genes que codificam as enzimas de síntese (AA-NAT, ASMT) e degradação (CYP1B1) da melatonina. Além disso, o ritmo de melatonina apresentou um pico durante na fase de claro. Nos mesmos animais o pico de melatonina circulante ocorreu na fase de escuro. Reforçando que a melatonina é produzida no próprio pulmão o índice gênico, denominado MEL-Index, que relaciona a transcrição dos genes de *Asmt* e *Cyp1b1* apresentou uma correlação altamente significativa com o conteúdo de melatonina na fase de claro. Em resumo, o pulmão de ratos hígidos produz melatonina. Este fato abre a perspectiva da melatonina pulmonar participar dos processos de monitoramento do ar inspirado ([Fernandes et al., 2001](#); em anexo).

ABSTRACT

RIBEIRO-PAZ,E.D. **Lung as an Extra-Pineal Source of Melatonin.** 86 pages. Dissertation – Master Degree in Physiology - Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, 2021. Melatonin, an indolamine resulting from acetylation and methylation of serotonin, synthesized by the pineal gland, is known as the darkness hormone. Several organs and cells also synthesize melatonin, both in rhythmic and tonic manners. Melatonin is also synthesized on demand, when the immune-pineal axis is activated. Air pollution and inhalation of pathogen associated molecular patterns (PAMPs) induces melatonin synthesis in rat lungs. In addition, unpublished data suggested that the lung of normal animals could produce melatonin constitutively, regardless of pineal function. In this study we explored this issue and found that the lung of healthy rats transcribes genes that encode the synthesis enzymes, AA-NAT and ASMT, and the melatonin metabolizing enzyme CYP1B1. Unexpectedly, lung melatonin peak was at daytime. Indeed, lung and plasma melatonin in each animal were in opposite phases of the day, strongly suggesting that lung melatonin synthesis is independent of the hour of the day. Reinforcing this conclusion, the MEL-Index determined by the log ratio between scores that defines *Asmt* and *Cyp1b1* transcriptions directly correlates with lung melatonin content. In summary, the lung of healthy rats produces melatonin. The data obtained by this dissertation subsided a recent paper that indicates that lung synthesized melatonin is a player in protecting this tissue against virus invasion ([Fernandes et al., 2001](#))

REFERÊNCIAS

ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; ESCAMES, G.; VENEGAS, C.; DÍAZ-CASADO, M. E.; LIMA-CABELLO, E.; LÓPEZ, L. C.; ROSALES-CORRAL, S.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Extrapineal melatonin: Sources, regulation, and potential functions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, vol. 71, no. 16, 2014a.

ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; ESCAMES, G.; VENEGAS, C.; DÍAZ-CASADO, M. E.; LIMA-CABELLO, E.; LÓPEZ, L. C.; ROSALES-CORRAL, S.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Extrapineal melatonin: Sources, regulation, and potential functions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, vol. 71, no. 16, p. 2997–3025, 2014b.

BUBENIK, G. A. Thirty four years since the discovery of gastrointestinal melatonin. **Journal of Physiology and Pharmacology**, vol. 59, no. SUPPL.2, p. 33–51, 2008. .

BUBENIK, George A. localization of melatonin in the digestive tract of the rat. **hormone research**, vol. 12, p. 313–323, 1980. .

BUBENIK, George A; BROWN, G. M. Pinealectomy reduces melatonin levels in the serum but not in the gastrointestinal tract of rats. **NeuroSignals**, vol. 6, no. 1, p. 40–44, 1997.

BUBENIK, George A; DHANVANTARI, S. Influence of Serotonin and Melatonin on Some Parameters of Gastrointestinal Activity. **Journal of Pineal Research**, vol. 7, no. 4, p. 333–344, 1989

BUBENIK, George A; RR, H.; BROWN, G. M.; MELATONIN, B. L.; BUBENIK, G. A.; HACKER, R.; BROWN, G. M. Melatonin concentrations in the luminal fluid , mucosa , and muscularis of the bovine and porcine gastrointestinal tract. **Journal of Pineal Research**, vol. 26(1), p. 56–63, 1999. .

CARRILLO-VICO, A.; LARDONE, P. J.; ÁLVAREZ-ŚNCHEZ, N.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, A.; GUERRERO, J. M. Melatonin: Buffering the immune system. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 14, no. 4, p. 8638–8683, 2013.

CARRILLO-VICO, A.; LARDONE, P. J.; FERNÁNDEZ-SANTOS, J. M.; MARTÍN-LACAVE, I.; CALVO, J. R.; KARASEK, M.; GUERRERO, J. M. Human lymphocyte-synthesized melatonin is involved in the regulation of the interleukin-2/interleukin-2

receptor system. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, vol. 90, no. 2, p. 992–1000, 2005.

CARVALHO-SOUSA, C. E.; DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.; TAMURA, K. E.; FERNANDES, P. A. C. M.; PINATO, L.; MUXEL, S. M.; CECON, E.; MARKUS, R. P. Molecular basis for defining the pineal gland and pinealocytes as targets for tumor necrosis factor. **Frontiers in Endocrinology**, vol. 2, no. MAY, p. 1–11, 2010.

CARVALHO-SOUSA, C. E.; PEREIRA, E. P.; KINKER, G. S.; VERAS, M.; FERREIRA, Z. S.; BARBOSA-NUNES, F. P.; MARTINS, J. O.; SALDIVA, P. H. N.; REITER, R. J.; FERNANDES, P. A.; DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.; MARKUS, R. P. Immune-pineal axis protects rat lungs exposed to polluted air. **Journal of Pineal Research**, vol. 68, no. 3, p. 1–13, 2020.

COOK, D. N.; NAKANO, H. Pulmonary Dendritic Cells. **Comparative Biology of the Normal Lung: Second Edition**, , p. 651–664, 2015.

CUZZOCREA, S.; ZINGARELLI, B.; GILAD, E.; HAKE, P.; SALZMAN, A. L.; SZABÓ, C. Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: Relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity. **Journal of Pineal Research**, vol. 23, no. 2, p. 106–116, 1997.

DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S. TESE. Caracterização do eixo imune - pineal : glândula pineal como alvo para lipopolissacarídeo (LPS). 2010. .

DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.; CARVALHO-SOUSA, C. E.; TAMURA, E. K.; PINATO, L.; CECON, E.; FERNANDES, P. A. C. M.; DE AVELLAR, M. C. W.; FERREIRA, Z. S.; MARKUS, R. P. TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFκB pathway. **Journal of Pineal Research**, vol. 49, no. 2, p. 183–192, 2010.

DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.; PINATO, L.; TAMURA, E. K.; CARVALHO-SOUSA, C. E.; MARKUS, R. P. Glia-pinealocyte network: The paracrine modulation of melatonin synthesis by tumor necrosis factor (TNF). **PLoS ONE**, vol. 7, no. 7, 2012.

DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.; TAMURA, E. K.; CARVALHO-SOUSA, C. E.; ROCHA, V. A.; PINATO, L.; FERNANDES, P. A. C.; MARKUS, R. P. Daily

corticosterone rhythm modulates pineal function through NF κ B-related gene transcriptional program. **Scientific Reports**, vol. 7, no. 1, 2017.

DUBOCOVICH, M. L. Melatonin is a potent modulator of dopamine in the retina. **Nature**, vol. 306, no. 9, p. 782–784, 1983. .

DUVERNOY, H. M.; RISOLD, P. Y. The circumventricular organs: An atlas of comparative anatomy and vascularization. **Brain Research Reviews**, vol. 56, no. 1, p. 119–147, Nov. 2007.

FERNANDES, P. A.; KINKER, G. S.; NAVARRO, B. V.; JARDIM, V. C.; RIBEIRO-PAZ, E. D.; CÓRDOBA-MORENO, M. O.; SANTOS-SILVA, D.; MUXEL, S. M.; FUJITA, A.; MORAES, C. B.; NAKAYA, H. I.; BUCKERIDGE, M. S.; MARKUS, R. P. Melatonin-Index as a biomarker for predicting the distribution of presymptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 carriers. **Melatonin Research**, vol. 4, no. 1, p. 189–205, 2021.

FERNANDES, P. A.; TAMURA, E. K.; D'ARGENIO-GARCIA, L.; MUXEL, S. M.; DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.; MAR??OLA, M.; CARVALHO-SOUSA, C. E.; CECON, E.; FERREIRA, Z. S.; MARKUS, R. P. Dual Effect of Catecholamines and Corticosterone Crosstalk on Pineal Gland Melatonin Synthesis. **Neuroendocrinology**, vol. 104, no. 2, p. 126–134, 2016.

FISKE, V. M.; HUPPERT, L. C. Melatonin Action on Pineal Varies with Photoperiod. **Science**, vol. 162, no. October, p. 279, 1968. .

GANGULY, S.; COON, S. L.; KLEIN, D. C. Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: The critical role of serotonin acetylation. **Cell and Tissue Research**, vol. 309, no. 1, p. 127–137, 2002.

GOLAN, K.; KUMARI, A.; KOLLET, O.; KHATIB-MASSALHA, E.; SUBRAMANIAM, M. D.; FERREIRA, Z. S.; AVEMARIA, F.; RZESZOTEK, S.; GARCÍA-GARCÍA, A.; XIE, S.; FLORES-FIGUEROA, E.; GUR-COHEN, S.; ITKIN, T.; LUDIN-TAL, A.; MASSALHA, H.; BERNSHTEIN, B.; CIECHANOWICZ, A. K.; BRANDIS, A.; MEHLMAN, T.; ... LAPIDOT, T. Daily Onset of Light and Darkness Differentially Controls Hematopoietic Stem Cell Differentiation and Maintenance. **Cell Stem Cell**, vol. 23, no. 4, p. 572-585.e7, 2018.

HUSSELL, T.; BELL, T. J. Alveolar macrophages: Plasticity in a tissue-specific context. **Nature Reviews Immunology**, vol. 14, no. 2, p. 81–93, 2014.

HUSSELL, T.; COLLEGE, I. Immunity in the lung. , p. 4, [s. d.] .

JOCKERS, R.; DELAGRANGE, P.; DUBOCOVICH, M. L.; MARKUS, R. P.; RENAULT, N.; TOSINI, G.; CECON, E.; ZLOTOS, D. P. Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20. **British Journal of Pharmacology**, 2016.

KINKER, G. S.; OBA-SHINJO, S. M.; CARVALHO-SOUSA, C. E.; MUXEL, S. M.; MARIE, S. K. N.; MARKUS, R. P.; FERNANDES, P. A. Melatonergic system-based two-gene index is prognostic in human gliomas. **Journal of Pineal Research**, vol. 60,

KLEIN, D. C.; ROSEBOOM, P. H.; DONOHUE, S. J.; MARRS, B. L. Evolution of melatonin as a night signal: Contribution from a primitive photosynthetic organism. **Molecular and Cellular Neuroscience**, vol. 3, no. 3, p. 181–183, 1992.

KONTUREK, S. J.; KONTUREK, P. C.; BRZOZOWSKI, T.; BUBENIK, G. A. Role of melatonin in upper gastrointestinal tract. **Journal of Physiology and Pharmacology**, vol. 58, no. SUPPL. 6, p. 23–52, 2007. .

LEFRANÇAIS, E.; ORTIZ-MUÑOZ, G.; CAUDRILLIER, A.; MALLAVIA, B.; LIU, F.; SAYAH, D. M.; THORNTON, E. E.; HEADLEY, M. B.; DAVID, T.; COUGHLIN, S. R.; KRUMMEL, M. F.; LEAVITT, A. D.; PASSEGUÉ, E.; LOONEY, M. R. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. **Nature**, vol. 544, no. 7648, p. 105–109, 2017.

LERNER AB; CASE, J.; TAKAHASHI, T.; TH, L.; W, M. ISOLATION OF MELATONIN, THE PINEAL GLAND FACTOR THAT LIGHTENS MELANOCYTES. vol. 934, no. 2, p. 2587, 1957. .

LIU, T.; BORJIGIN, J. N-acetyltransferase is not the rate-limiting enzyme of melatonin synthesis at night. **Journal of Pineal Research**, vol. 39, no. 1, p. 91–96, 2005.

LOPES, C.; DELYRA, J. L.; MARKUS, R. P.; MARIANO, M. Circadian rhythm in experimental granulomatous inflammation is modulated by melatonin. **Journal of pineal research**, vol. 23, no. 2, p. 72–8, 1997. .

LOTUFO, C. M. C.; LOPES, C.; DUBOCOVICH, M. L.; FARSKY, S. H. P.; MARKUS,

R. P. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. **European Journal of Pharmacology**, vol. 430, no. 2–3, p. 351–357, 2001.

MAESTRONI, G. J. M. Melatonin as a therapeutic agent in experimental endotoxic shock. **Journal of Pineal Research**, vol. 20, no. 2, p. 84–89, 1996.

MARÇOLA, M.; LOPES-RAMOS, C. M.; PEREIRA, E. P.; CECON, E.; FERNANDES, P. A.; TAMURA, E. K.; CAMARGO, A. A.; PARMIGIANI, R. B.; MARKUS, R. P. Light/Dark Environmental Cycle Imposes a Daily Profile in the Expression of microRNAs in Rat CD133+ Cells. **Journal of Cellular Physiology**, vol. 231, no. 9, p. 1953–1963, 2016.

MARKUS, R. P.; CECON, E.; PIRES-LAPA, M. A. Immune-pineal axis: Nuclear factor κ B (NF- κ B) mediates the shift in the melatonin source from pinealocytes to immune competent cells. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 14, no. 6, p. 10979–10997, 2013a.

MARKUS, R. P.; CECON, E.; PIRES-LAPA, M. A. Immune-pineal axis: Nuclear factor κ B (NF- κ B) mediates the shift in the melatonin source from pinealocytes to immune competent cells. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 14, no. 6, p. 10979–10997, 2013b.

MARKUS, R. P.; FERNANDES, P. A.; KINKER, G. S.; DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.; MARÇOLA, M. Immune-pineal axis – acute inflammatory responses coordinate melatonin synthesis by pinealocytes and phagocytes. **British Journal of Pharmacology**, vol. 175, no. 16, p. 3239–3250, 2018.

MARKUS, R. P.; FERREIRA, Z. S.; FERNANDES, P. A. C. M.; CECON, E. The immune-pineal axis: A shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. **NeuroImmunoModulation**, vol. 14, no. 3–4, p. 126–133, 2007.

MARSHALL, K.-A.; REITER, R. J.; POEGGELER, B.; ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B. Evaluation of the Antioxidant of Melatonin in Vitro. **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 21, no. 3, p. 307–315, 1996.

MARTIN, T. R.; FREVERT, C. W. Innate immunity in the lungs. **Proceedings of the American Thoracic Society**, vol. 2, no. 5, p. 403–411, 2005.

MINNEMAN, K. P.; WURTMAN, R. J. The pharmacology of the pineal gland. **Annual review of pharmacology and toxicology**, vol. 16, p. 33–51, 1976. DOI 10.1146/annurev.pa.16.040176.000341. Available at:

MINUTTI, C. M.; KNIPPER, J. A.; ALLEN, J. E.; ZAISS, D. M. W. Seminars in Cell & Developmental Biology Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. vol. 61, p. 3–11, 2017a. .

MINUTTI, C. M.; KNIPPER, J. A.; ALLEN, J. E.; ZAISS, D. M. W. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, vol. 61, p. 3–11, 2017b. DOI 10.1016/j.semcdb.2016.08.006. Available at:

MORTANI BARBOSA, E. J.; FERREIRA, Z. S.; MARKUS, R. P. Purinergic and noradrenergic cotransmission in the rat pineal gland. **European Journal of Pharmacology**, vol. 401, no. 1, p. 59–62, 2000.

MOWAT, A. M. I.; SCOTT, C. L.; BAIN, C. C. Barrier-tissue macrophages: Functional adaptation to environmental challenges. **Nature Medicine**, vol. 23, no. 11, p. 1258–1270, 2017.

NAWAZ, M. A.; HUANG, Y.; BIE, Z.; AHMED, W.; REITER, R. J.; NIU, M.; HAMEED, S. Melatonin: Current Status and Future Perspectives in Plant Science. **Frontiers in Plant Science**, vol. 6, no. January, p. 1–13, 2016.

NEWHOUSE, M.; SANCHIS, J.; BIENENSTOCK, J. Lung defense mechanisms. (first of two parts). **medical progress**. 1976a. .

NEWHOUSE, M.; SANCHIS, J.; BIENENSTOCK, J. Lung defense mechanisms (second of two parts). **medical progress**, 1976b. .

PEREIRA, E. P. TESE relevancia do eixo imune pineal em ratos expostos a poluição do ar. 2016. .

PIRES-LAPA, M. A.; TAMURA, E. K.; SALUSTIANO, E. M. A.; MARKUS, R. P. Melatonin synthesis in human colostrum mononuclear cells enhances dectin-1-mediated phagocytosis by mononuclear cells. **Journal of Pineal Research**, vol. 55, no. 3, p. 240–246, 2013.

PONTES, G. N.; CARDOSO, E. C.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S.; MARKUS, R.

P. Pineal melatonin and the innate immune response: The TNF- α increase after cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. **Journal of Pineal Research**, vol. 43, no. 4, p. 365–371, 2007.

QUAN, N.; BANKS, W. A. Brain-immune communication pathways. **Brain, Behavior, and Immunity**, vol. 21, no. 6, p. 727–735, Aug. 2007.

RATH, M. F.; COON, S. L.; AMARAL, F. G.; WELLER, J. L.; MØLLER, M.; KLEIN, D. C. Melatonin synthesis: Acetylserotonin o-methyltransferase (ASMT) is strongly expressed in a subpopulation of pinealocytes in the male rat pineal gland. **Endocrinology**, vol. 157, no. 5, p. 2028–2040, 2016.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; GALANO, A. Melatonin: Exceeding expectations. **Physiology**, vol. 29, no. 5, p. 325–333, 2014.

REITER, R.; MELCHIORRI, D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. **Journal of pineal ...**, , p. 1–11, 1995.

SILVA FERREIRA, Z.; GARCIA, C. R. S.; SPRAY, D. C.; MARKUS, R. P. P2Y1 receptor activation enhances the rate of rat pinealocyte-induced extracellular acidification via a calcium-dependent mechanism. **Pharmacology**, vol. 69, no. 1, p. 33–37, 2003.

SILVA, S. D. O.; CARVALHO, S. R. Q.; XIMENES, V. F.; OKADA, S. S.; CAMPA, A. Melatonin and its kynurenin-like oxidation products affect the microbicidal activity of neutrophils. **Microbes and Infection**, vol. 8, no. 2, p. 420–425, 2006.

SIMONNEAUX, V.; RIBELAYGA, C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. **Pharmacological reviews**, vol. 55, no. 2, p. 325–95, 2003.

STANFORD, S. C. Recent developments in research of melatonin and its potential therapeutic applications. **British Journal of Pharmacology**, vol. 175, no. 16, p. 3187–3189, 2018.

STEFULJ, J.; HÖRTNER, M.; GHOSH, M.; SCHAUENSTEIN, K.; RINNER, I.; WÖFLER, A.; SEMMLER, J.; LIEBMANN, P. M. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. **Journal of Pineal Research**, vol.

30, no. 4, p. 243–247, 2001.

TAMURA, E. K.; FERNANDES, P. A.; MARÇOLA, M.; CRUZ-MACHADO, S. da S.; MARKUS, R. P. Long-lasting priming of endothelial cells by plasma melatonin levels. **PLoS ONE**, vol. 5, no. 11, 2010.

TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; REITER, R. J.; QI, W. B.; KARBOWNIK, M.; CALVOA, J. R. Significance of melatonin in antioxidative defense system: Reactions and products. **NeuroSignals**, vol. 9, no. 3–4, p. 137–159, 2000.

TAN, D. X.; ZHENG, X.; KONG, J.; MANCHESTER, L. C.; HARDEL, R.; KIM, S. J.; XU, X.; REITER, R. J. Fundamental issues related to the origin of melatonin and melatonin isomers during evolution: relation to their biological functions. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 15, no. 9, p. 15858–15890, 2014.

TECLEMARIAM-MESBAH, R.; TER HORST, G.; POSTEMA, F.; WORTEL, J.; BUIJS, R. Anatomical Demonstration of the Suprachiasmatic Nucleus–Pineal Pathway. **J. Comp. Neurol**, vol. 406, no. February 1998, p. 171–182, 1999.

WRIGHT, J. R. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. **Nature Reviews Immunology**, vol. 5, no. 1, p. 58–68, 2005.

WURTMAN, R. J.; AXELROD, J.; FISCHER, J. E. Melatonin Synthesis in the Pineal Gland: Effect of Light Mediated by the Sympathetic Nervous System. **Science**, vol. 143, no. 3612, p. 1328–1329, 1964.

WURTMAN, R. J.; AXELROD, J.; PHILLIPS, L. S. Melatonin Synthesis in the Pineal Gland: Control by Light. **Science**, vol. 142, no. 3595, p. 1071–1073, 1963.

XIMENES, V. F.; CATALANI, L. H.; CAMPA, A. Oxidation of melatonin and tryptophan by an HRP cycle involving compound III. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 287, no. 1, p. 130–134, 2001.

ZHAO, D.; YU, Y.; SHEN, Y.; LIU, Q.; ZHAO, Z.; SHARMA, R.; REITER, R. J. Melatonin synthesis and function: Evolutionary history in animals and plants. **Frontiers in Endocrinology**, vol. 10, no. APR, p. 1–16, 2019.

ANEXOS

ANEXO I (FERNANDES, *et al* 2021)*Melatonin Research (Melatonin Res.)*<http://www.melatonin-research.net>

Research Article

Melatonin-Index as a biomarker for predicting the distribution of presymptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 carriers**Pedro A. Fernandes^{1*}; Gabriela S. Kinker²; Bruno V. Navarro³; Vinicius C. Jardim⁴, Edson D. Ribeiro-Paz¹, Marlina O. Córdoba-Moreno¹, Débora Santos-Silva¹, Sandra M. Muxel¹, Andre Fujita⁴, Helder I. Nakaya⁵, Marcos S. Buckeridge³, Regina P. Markus^{*1}**¹ Laboratory of Chronopharmacology, Department of Physiology, Institute of Bioscience, University of São Paulo, Brazil² International Research Center, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil.³ Laboratory of Plant Physiological Ecology (LAFIECO), Department of Botany, Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.⁴ Department of Computer Science, Institute of Mathematics and Statistics, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.⁵ Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

*Correspondence: pacmf@usp.br; rpmarkus@usp.br, Tel: +55-11-30816996

Running Title: Lung melatonin modulates SARS-CoV-2 infection

Received: August 6, 2020; Accepted: January 2, 2021

ABSTRACT

The pandemic dissemination of the SARS-CoV-2 led, on the one hand, to a worldwide effort to develop mechanistic-based therapeutics and vaccines, and on the other hand, the searching for determining the spreaders and the mechanisms of transmission. Melatonin, a multitask molecule, orchestrates defense responses by allowing the proper mounting, duration, and magnitude of innate immune responses. Melatonin is synthesized on demand by immune-competent cells and constitutively by resident macrophages such as alveolar macrophages. Here we investigated whether the expression of genes relevant to virus invasion and infection varies according to a genic index (MEL-Index) that estimates the capacity of the lung to synthesize melatonin. A COVID-19-Signature composed of 455 genes of 288 human lungs (GTEX, UCSD) was correlated with MEL-Index by Pearson correlation test, gene-set enrichment analysis, and networking tool that integrates the connectivity between the most expressed genes, allowing us to compare the same set of genes under different states. The three independent procedures point to a negative relationship between MEL-Index and SARS-CoV-2 infection. The entry in epithelial AT2 cells should be hampered by a positive correlation *TMRPSS2* and a negative correlation with the coding gene for furin, suggesting dysfunctional processing in virus spike. Moreover, MEL-Index also negatively correlates with the genes that codify the proteins of multi-molecular receptor complex CD147, the gateway in macrophages, and other immune cells. In summary, the perspective that lung and respiratory tract melatonin could be a natural protective factor opens new epidemiological and pharmacological perspectives, as high MEL-Index scores could be predictive of asymptomatic carriers, and nasal administrated melatonin could prevent evolution of presymptomatic carriers.

Key Words: SARS-CoV-2 transmission; lung melatonin; MEL-Index score; virus infection.

1. INTRODUCTION

The pandemic dissemination of the SARS-CoV-2 led to a worldwide effort to develop mechanistic-based therapeutics and vaccines (1). Virus gateways, proliferation/dissemination pathways, and host targets responsible for dysfunctional defense responses were explored as possible targets for treating COVID-19 patients. The repurposing of drugs targeting the virus is still a promise, and the most widely approved strategies are based on supportive treatments such as anticoagulants (2), antagonists of the IL-6 receptor (tocilizumab), (3) and dexamethasone in critical patients (4). Vaccines are available, but SARS-CoV-2 mutations (5) increased the possibility of transient immunity and vaccine escape. Despite all the efforts for combating the disease, the second pandemic wave at the end of 2020 urgently demands new approaches for understanding virus transmissibility, infection, and replication.

Epidemiologic studies confirm that asymptomatic and presymptomatic carriers are hidden spreaders (6). The percentage of asymptomatic and presymptomatic spreaders in small and isolated populations present a variation not well understood. Analysis of virus RNA load by PCR in two outbreaks in a Japanese and an Argentinian cruise ship confirmed the presence of asymptomatic, presymptomatic, and symptomatic COVID-19 patients. (6). The percentage of asymptomatic and presymptomatic individuals varied from 30 – 80%, depending on the cruise (7,8), strongly reinforcing the hypothesis that not yet identified mechanisms may coordinate virus airborne invasion and infection on an individual basis.

Airborne SARS-CoV-2 transmission was dichotomized in short-distance (larger droplets) and long-distance (aerosol), and productive invasion of the airways relies on detection of virus genetic material, while infection activates innate and acquired immune responses, resulting in the production of antibodies (9). Despite the great number of systematization of clinical case reports, the repurposing of drugs, and the determination of the cellular and systemic mechanisms responsible for the installation and degree of severity of the disease, the pandemic is not controlled, many countries imposed new isolation during the last days of 2020. It is evident that new biomarkers need to be established in order to detect hidden or camouflaged spreaders.

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is involved both in the mounting and the recovery of innate immune responses. Just at the beginning of the process, pineal melatonin synthesis is blocked, and neutrophils migrate from the bone marrow to the circulation and from the circulation to the injured area (10, 11). Mitochondria phenotypes and functionality are regulated by cell-synthesized or circulating melatonin (12), which orchestrates the balance between efficient energy production and building material for repair, growth, and division. Virus infection shifts this balance to aerobic glycolysis, ensuring building material for replication. This mechanistic evidence plus converging epidemiological profiles of groups with reduced melatonin production and high COVID-19 risk (13) subsidized the proposal to use melatonin as an adjuvant in the treatment of COVID-19 (14). Clinical trials for evaluating the protective effect of melatonin as the darkness hormone (15), and supporting drug for treating severe cases of COVID-19 (16).

The previous studies with melatonin did not consider lung synthesized melatonin as a relevant source for allowing the first stages of invasion and infection, opening the possibility that lung melatonin could be relevant for defining the distribution of presymptomatic and asymptomatic carriers. Considering that melatonin synthesized by rodent alveolar macrophages exposed to pathogen- and damage-associated molecular patterns (PAMPs, DAMPs) impairs their activation (17). A two-gene index score (MEL-Index) that predicts the severity of human glioma (18, 19) was used as a biomarker for estimating the expression of genes related to airborne SARS-CoV-2 invasion and infection in normal human lungs RNA-seq data deposited in the Genotype-Tissue Expression (GTEx). Our data provide the first

biological basis for considering lung melatonin synthesis a positive prognostic marker for predicting the distribution of asymptomatic and presymptomatic carriers.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Genes analyzed.

A total of 455 genes shown to be associated with COVID-19 comorbidities (20), virus/human proteins interaction (21), virus gateway (22, 23) were named “COVID-19-Signature”. A COVID-19 physiological signature was defined by 212 genes involved in the entry of SARS-CoV-2 in human cells (54), intracellular traffic (66), mitochondrial activity (42), and genes linked to transcription and post-translation processes (79).

2.2. RNA-seq data.

Gene-expressed in healthy human lungs were obtained from the Genotype-Tissue Expression (GTEx) RNA-seq data, downloaded from the UCSC RNA-seq Compendium (10.1038/nbt.3772), deposited at the UCSC Xena Browser (<https://doi.org/10.1101/326470>). Expression levels were quantified using RSEM, upper quartile normalized, and log₂ (fpm+0.001) transformed. In total, we analyzed 288 samples of healthy GTEx lung samples.

2.3. MEL-Index calculation.

MEL-Index is based on the relative expression of genes that codify the enzymes to convert N-acetylserotonin to melatonin (ASMT, acetyl-serotonin methyltransferase) and melatonin to 6-hydroxymelatonin (cytochrome P450 (CYP)1B1) in brain, liver, and other tissues (18, 19, 24). The *ASMT* and *CYP1B1* levels were used by z-normalizing the log₂ transformed values of the genes and calculating the difference between them (*ASMT* - *CYP1B1*) for each sample.

2.4. Animals & Lung melatonin content.

Adult male Wistar rats (2–3 months old, 200–250 g) maintained in 12/12 light-dark cycle (lights on at 06h00) received water and food *ad libitum*. The rats were killed at 9h00 and 12h00 by decapitation at daytime when no pineal melatonin contribution is expected. Lungs were immediately frozen in liquid nitrogen (-170°C) and then maintained at -80°C till evaluation. The procedures followed the ethical standards of the Brazilian National Council on Experimental Animal Control (CONCEA) and were approved by the local Ethics Committee (protocol 346/2019). Frozen lungs homogenized in Tris-HCl buffer (pH 7.4, 1mM EGTA, 1mM EDTA) were centrifuged (20,000g, 5 min, 4°C). Melatonin and proteins were quantified in the supernatant with saliva ELISA kit (IBL, Hamburg, Germany, REF: RE54041), and protein Bradford assay (Bio-Rad, California USA, REF: #500-0006).

2.5. Real-time polymerase chain reaction (qPCR): Relative quantification.

Total RNA was extracted from 50 mg of each lung homogenized in liquid nitrogen, according to the TRIzol® (Invitrogen) manufactory's instructions. Two µg of RNA samples were reverse-transcribed to form complementary DNAs by the SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, USA) and one ng of random primer (Invitrogen, USA), following the manufacturer's instructions. The qPCR was performed using 2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 200 nM of each primer pair, 5 µL of cDNA (10-fold

diluted), and RNase-free water to a final volume of 25 μ L. The reactions were performed in StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). The mixture was incubated at 94°C for 5 min followed by 40 cycles of 94°C for 30 s and 60°C for 30 s. The following primer pairs were used for rat mRNA analysis: *Asmt*: 5'-agcgctgtgttcag-3'; 5'-ggaagcgtgagaggtcaaag-3', *Cyp1b1*: 5'-gacatcttggagccagcca-3'; 5'-aaagccatgacgtatggaagt-3' and *Gapdh*: 5'-gccagaacatcctcctg-3'; 5'-ggaacacggaaggccatg-3'. The $2(-\Delta\Delta Ct)$ formula was applied to calculate the relative expression of *Asmt* and *Cyp1b1* normalized by *Gapdh*. The mean ΔCt of the control group was used as the calibrator.

2.6. Analytical methods and statistical procedures.

2.6.1. Correlation between the COVID-19-Signature score and the MEL-index score.

In each dataset analyzed, genes were ordered according to the mean expression across samples and divided into 50 bins. Next, we generated a control index score, for each sample, by subtracting the average z-normalized expression of 100 genes randomly sampled from the CYP1B1 bin from the average z-normalized expression of 100 genes randomly sampled from the ASMT bin. Finally, for each sample we created a COVID-19-Signature score, defined as the average z-normalized expression of the selected genes. We then calculated, for each dataset, the correlation between the COVID-19-Signature score and the MEL-index score, as well the control index score. The same statistical procedure was applied to subgroups of COVID-19-Signature related to virus interaction and cellular processes linked to virus invasion. Statistical analyses were performed with the GraphPad Prism 6 or the R software (<http://www.r-project.org>). To determine correlations, we calculated Pearson's correlation coefficient. *P* values < 0.05 were considered statistically significant.

2.6.2. Gene set enrichment analysis.

GSEA was performed using the desktop application v4.0.3 (25). Genes from lung samples were ranked according to Pearson's correlation coefficient between their expression and the MEL-Index calculated for each sample. Enrichment scores (ES) were normalized (NES) to account for gene set size, and *p*-values were calculated using 1,000 gene set permutations.

2.6.3. Network analysis.

The MEL-Index allows the sorting of the samples according to the values obtained for each sample. We divided the 288 samples into Low (-3.904 to -0.109), Medium (-0.108 to 0.827), and High (0.828 to 3.356) MEL-Index groups and performed networks analysis for each subgroup (96 samples per group). Weighted networks were generated based on Pearson's correlation with a cut-off of 0.001 *p*-values adjusted by multiple tests (False Discovery Rate - FDR). The nodes represented the genes selected, and the correlation levels represented the links. This analysis was carried out by BioNetStat package (26), and the complex network parameters degree centrality and degree distribution were evaluated.

3. RESULTS

3.1. Relationship between MEL-Index and lung melatonin content.

To validate that the lung genetic MEL-Index (Figure 1A, 13) could be a predictor of melatonin content, we determined the expression of the genes *Asmt* and *Cyp1b1* and the

concentration of melatonin in the lung of rats killed during daytime (Figure 1B). The increase in melatonin levels in the lung observed between 09h00 and 12h00 was dependent on the increase in *Asmt* transcription, and was parallel to the increase of the MEL-Index (Figure 1B).

Our next step was determining MEL-Index/ COVID-19-Signature score correlation in 288 samples of healthy human lungs. MEL-Index significantly correlated with the COVID-19-Signature score ($r = -0.15$, $p = 0.01$), but not with the control index score ($r = -0.03$, $p = 0.63$). The percentage of negatively correlated genes with the MEL-Index (35,8%) was the double of the positively correlated ones (47% had no correlation), strongly suggesting that melatonin synthesized in the lung could mediate virus-induced response (Figure 1C). Functional enrichment analysis, commonly referred as gene set enrichment analysis (GSEA) is an alternative manner to statistically test the expression profile of a set of genes in function of a specific condition/variable. This analysis confirmed that MEL-Index negatively correlates with the expression of genes assigned as COVID-19-Signature (NES = -2.15, $qFDR < 0.0001$) (Figure 1C, Appendices Table S1).

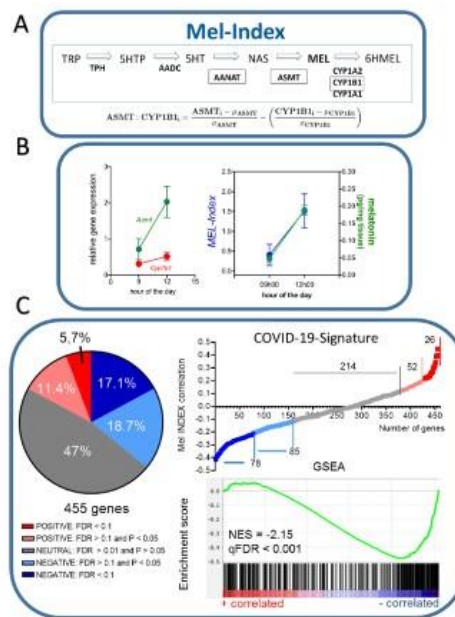


Fig. 1. MEL-Index score & human COVID-19-signature.

(A) MEL-Index formula. (B) MEL-Index as a predictor of rat lung melatonin concentration. *Asmt* (left green) and *Cyp1b1* (red) mRNA expression, *Asmt* minus *Cyp1b1* (MEL-Index) combined expression (blue) and melatonin content (right green) of rat lungs. Data are expressed as mean \pm sem ($N = 3$ per point). Data are expressed as mean \pm sem. (C) MEL-Index negatively correlates with COVID-19-Signature and functional enriched scores (288 human lung samples, MEL-Index score: -3.904 to 3.356).

TRP: tryptophan; TPH: tryptophan hidroxilase; 5-HTP: 5-hidroxytryptophan; AADC: aromatic L-amino acid decarboxilase; 5-HT: serotonin; AANAT: arylalkyl-N-acetyltransferase; NAS: N-acetylserotonin, ASMT: acetylserotonin methyltransferase;

MEL: melatonin; CYP1A1: cytochrome P4501A1; CYP1A2: cytochrome P450 1A2 and CYP1B1: cytochrome P450 1B. ASMT_i = individual ASMT expression; CYP1B_i = individual CYP1B1 expression.

3.2. MEL-Index and networks analysis.

The structures of networks generated with the COVID-19-Signature genes were evaluated in three MEL-Index subgroups (High, Medium, and Low MEL-Index). Degrees of centrality and distribution were analyzed in these groups using BioNetStat Bioconductor package (26).

The subgroups differed in the degree of centrality and distribution (Figure 2A, Table 1), with Low, Medium, and High MEL-Index groups presenting 25192, 43971, and 17681 links, respectively. Pairwise comparisons for degree distribution of the samples showed that the Medium subgroup differed from the others (Table 1). The low subgroup showed a higher density around degree 50, the Medium subgroup at degree 150, and the High subgroup at 25 links (Figure. 2A). Moreover, besides reducing the connectivity per node, there was an increase in the number and percentage of negative links in the High MEL-Index subgroup (Figure 2B).

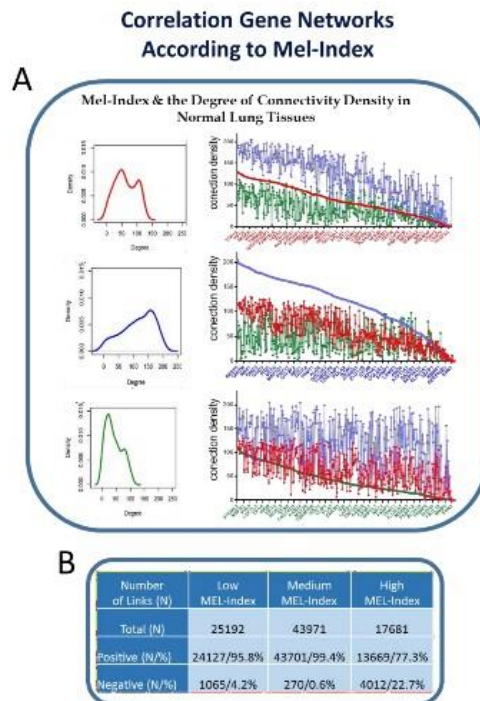


Fig. 2. Degree of expression and connectivity according to complex network analysis (BioNetStat, 26).

(A) Histograms and degree distributions of COVID-19-Signature genes ranked by Low (-3.904 to -0.109, red), Medium (-0.108 to 0.827, blue), and High (0.828 to 3.356, green) MEL-Index scores. (C) The number of positive and negative links observed in Low, Medium, and High MEL-index subgroups of normal lung tissues.

Table 1. Network analysis: Comparisons of the degrees of centrality and distribution in networks formed by the COVID-19-Signature genes.

	Comparison	Test	p-value	Q-value
Degree centrality	Low x Medium x High (Normal)	35.08	0.001	0.003
	Low x Medium (Normal)	30.70	0.005	0.008
	Low x High (Normal)	17.61	0.144	0.144
	Medium x High (Normal)	44.83	0.001	0.003
Degree distribution	Low x Medium x High (Normal)	0.088	0.01	0.03
	Low x Medium (Normal)	0.098	0.033	0.049
	Low x High (Normal)	0.029	0.226	0.226
	Medium x High (Normal)	0.147	0.002	0.006

Highlighting the interaction of the top 40 most connected genes (Appendices Table 2) in Low, Medium, and High MEL-index samples, we observed different profiles of interactions among the networks. The higher density of connections per node was observed in the Medium Mel-Index subgroup (Figure.3A, larger nodes), while in the High MEL-Index subgroup, the number of negative links (red lines) was more evident. Moreover, the genes presenting the highest number of significant connections differ among the groups, with only three genes appearing in all the subgroups (Figure 3B).

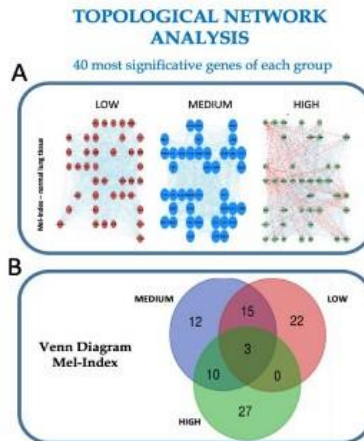


Fig. 3. Visual image of the top 40 most connected genes of Low, Medium, and High MEL-Index of NORMAL human lung.

(A) Graphs showing the connections of the subgroups presenting the strength of each node with the genes of the COVID-19 signature. The genes positions are conserved among networks to allow the comparison among them. (B) Venn Diagram showing the number of nodes shared among the top 40 most connected genes of Low (-3.904 to -0.109), Medium (-0.108 to 0.827) and High (0.828 to 3.356) MEL-Index subgroups. The size of the nodes reflects the density of connections; blue lines represent positive and red lines negative interactions.

3.3. MEL-Index and functional groups.

Our study's main goal was to determine if melatonin production in the lung, estimated by the MEL-Index score, could confer previous protection against the invasion of epithelial cells and alveolar macrophages. Therefore, the influence of MEL-Index on the expression of genes involved in SARS-Cov-2 virus entry in lung epithelial AT2 cells and alveolar macrophages (virus gateways, 54 genes), together with those relevant for intracellular trafficking (66 genes), transcription/(post)translation (79 genes) and mitochondrial function (42 genes), selected among the COVID-19-Signature genes (Appendices), were analyzed as a subgroup.

Most genes of the physiological signature were negatively correlated with the MEL-Index (46.7%, multi-correlation test, $P < 0.05$) (Figure 4A). When both the error of rejecting a correct hypothesis and that of accepting a false hypothesis ($FDR < 0.1$) were considered, 25% of the genes negatively correlated with MEL-Index. The percentage of negatively correlated genes was much lower (17%) than that of neutral genes (36.3%). GSEA confirmed the negative correlation between all the genes related to the physiological functions, strongly suggesting that high lung melatonin synthesis will result in higher protection against virus (Figure 4B).

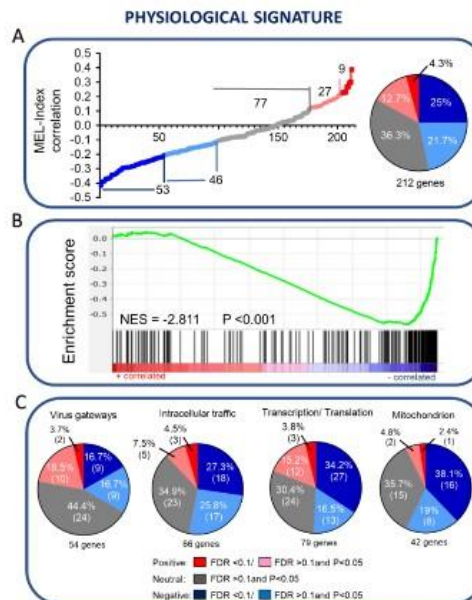


Figure 4. MEL-Index & Physiological signature.

(A) Number and percentage of positive, neutral and negative correlations with the MEL-Index. (B) GSEA analysis of 212 genes composing the Physiological signature gene set. (C) Number and percentage of positive, neutral and negative correlations with the MEL-Index in the Virus gateways, Intracellular traffic, Transcription/(post)Translation and Mitochondrion subgroups. Gene numbers within parentheses.

The next step was to discriminating the genes inside each group. Overall, 33.4%, 53.1%, 50.7%, and 57.1% of the genes associated with virus gateway, intracellular traffic, transcription/(post)translation regulation, and mitochondrial physiological functions,

respectively, were negatively correlated with the MEL-index according to the probability of rejecting the nullity hypothesis in a multi-correlation test ($P < 0.05$). When both the error of rejecting a correct hypothesis and that of accepting a false hypothesis are considered ($FDR < 0.1$), the percentage of negatively correlated genes with the MEL-Index are still around 30% in the intracellular traffic, transcription/(post)translation regulation, and mitochondrial physiological functional groups and of 16.7% in the virus gateway group. Accordingly, the percentage of neutral correlations varied from 30 to 45 % in the groups, and the percentage of negative correlations with the MEL-Index were very low (12.2%, 12%, 19%, and 7.2%) in the virus gateway (12.2%), intracellular traffic (12%), transcription/(post)translation (19%), and mitochondrion (7.2%) functional subgroups (Figure 4C). Of note, considering the SARS-CoV-2 receptors pathways, we observed that eight out of 11 genes associated with the CD147/CD44-membrane complex were negatively correlated with the MEL-Index (Appendices, Table S3). On the other hand, TMRSS2, associated with the ACE2 virus gateway, was positively correlated with the MEL-Index (Appendices, Table S3). As discussed below, these discrepant results might collaborate for the same protective effect, reducing the virus entry in human lung cells.

4. DISCUSSION

This year, governed by the SARS-CoV-2 pandemic, there were advances in understanding the virus entry in the lung via the AT2 epithelial cells, the immunological reactions according to the disease progression, and the development of vaccines. However, there is an important gap regarding the transmission between humans. What are the biological processes that define symptomatic and asymptomatic carriers? Is there any difference between asymptomatic carriers and those exposed to the same viral load that did not test positive for PCRs? The present study aimed to highlight differences in healthy human lung gene expression that could support preventive treatments to hamper invasibility and propose a biomarker for detecting asymptomatic carriers.

Alveolar macrophages that compose up to 90% of total macrophages in healthy human lungs lead to immune suppression and mucous production after phagocytosing airborne microorganisms and particulate material (28). The phagocytosed material is expelled together with mucous, protecting the individual against infection and the mounting of immune defense response. Melatonin synthesized in the respiratory tract by resident or monocyte-derived macrophages, besides impairing the mounting of innate immune responses against particulate material of polluted air and microorganisms, potentiates phagocytosis (17, 29-31). Considering that the MEL-Index score in healthy rats was directly related to melatonin content, we decided to explore whether the MEL-Index score from healthy human lung could be implicated in the biology of asymptomatic carriers.

We established a COVID-19-Signature composed of 455 genes of 288 samples of normal human lungs from the UCSC Genotype-Tissue Expression RNA-seq according to their relevance for aggressiveness and severity of the disease described in COVID-19 (20-23). The relative expression of these genes and their interaction according to each individual MEL-Index score were analyzed by three different bioinformatics approaches. First, we determined the correlation between MEL-Index and all the 455 genes for detecting the significantly positively and negatively expressed. Then we used the GSEA technique, also known as functional enrichment analysis, to discriminate processes related to variation in lung melatonin content. Third, we evaluated the degree of expression and connectivity segregated according to low, medium, and high MEL-Index scores. Considering these three different bioinformatics approaches, we constructed gene sets for evaluating the correlation of MEL-Index to genes linked to virus invasion and infection.

Analyzing all the 455 genes we observed that up to 47% of the genes were not directly correlated with the MEL-Index score and that the percentage of negatively correlated genes was higher (36 %) than that of positively correlated ones (17%) (Figure 1, Appendices Table S1). The gene set enrichment analysis of the COVID-19-Signature confirmed that most of the genes negatively correlated with the MEL-Index, strongly reinforcing that normal lung melatonin production could be relevant in dealing with the virus invasion.

Considering that melatonin orchestrates different cellular and intercellular processes and its role changes according to cell phenotypes, we used a bioinformatics tool that integrates the connectivity between the most expressed genes, allowing us to compare the same set of genes under different situations. Thus, instead of evaluating the most or less expressed genes or enriched gene sets previously curated, this method discloses cohesive subgroups of variables in one of the states and evaluates whether these groups change their correlation patterns among states (26). The method is found useful to identify influential spreaders in a network, as instead of considering only the most highly connected or the most central genes, it considers those that are located in the core of the network, serving to different levels of organization (32). This theoretical approach firstly confirmed that MEL-Index scores define different network states in normal lung, and secondly shows that in the High MEL-Index group, the density of the 40 most expressed genes was reduced, and the connectivity among them inhibited. Thus, the pattern of connectivity among genes that integrates different networks is inverted when low and high-MEL-Index are compared (Figure 3A), suggesting that the presence of the virus is less noticed in lungs that synthesize melatonin. At this point, we decided to explore networks that could be the biological basis for virus invasion.

The gene networks chosen to be related to the MEL-index score involved virus gateway (receptors), intracellular traffic, transcription/post-translational control, and mitochondrial function. Genes involved in the disease, such as immune responses and lung dysfunctions, were not included in our panel. The data obtained strongly suggest that lung melatonin content could be a protective factor against virus invasion. Indeed, more than 80% of the top 30 MEL-Index negatively correlated genes were associated with virus gateway (3 genes), transcriptional/(post)translational control (11 genes), intracellular traffic (7 genes), or mitochondrial functions (4 genes). Among the positively correlated genes, two of them are transcription repressors (*ZNF503* and *TLE1*), and one controls mitophagy (*USP54*), a critical process for mitochondrial quality control (33). As a matter of fact, melatonin is known to attenuate anoxia/reoxygenation injury by inhibiting excessive mitophagy (34). *TLE1*, positively correlated in virus gateway and transcription/translation sets, encodes a repressor transcription factor for the expression of pro-inflammatory NF κ B subunits, being an inhibitor of the mounting of innate immune responses (35).

Mitochondria is a pivotal player in orchestrated defense responses, besides efficiently converting glucose into ATP. The role of mitochondria varies according to cell phenotype and changes in the cytoplasmic and extracellular microenvironment, including regulating the response to viruses (36). In COVID-19 mitochondrial ROS/hypoxia-inducible factor-1A (HIF-1A)-dependent pathway activation results in dysfunctional immune response and epithelial cell death (37). Otherwise, melatonin is known to reduce HIF-1A expression and stabilize mitochondrial function (38). Here we observed that *HIF1A* was one of the most negatively correlated genes with MEL-Index score (r -0.37; p 1.2E-10; FDR 5.2E-8). Besides *HIF-1A*, genes that codify proteins linked to catabolism (*BCKDK*), acidification of intracellular compartments (*ATP6V1C1*, *ATP6V1A*, *ATP6V1D*), electron chain transfer (*NDUFAF2*, *ETF A*), transport across mitochondrial membranes (*GRPEL1*, *TIMM8B*, *TIMM9*, *TIMM10*), transcription (*MRPS5*), organelle biogenesis (*STOML2*), and cytoprotection (*HYOU1*, *GPX1*) were also negatively correlated with MEL-Index (Appendices Table S1). In several cases, overexpression of these genes may result in mitochondrial or cellular damage, and therefore, it

supports the hypothesis that the High-MEL-Index score could confer higher resistance to infection.

A similar general profile was observed for genes linked to transcription/ post-translation modulation and cellular traffic. Genes linked to RNA processing and degradation (*EXOSC3*, *EXOSC5*), ribosomal assembly (*HEATR3*), endoplasmic reticulum folding, and assembling of proteins (*HSPA5*) and secretory pathways (*UPF1*) were also negatively correlated. Besides, genes codifying proteins linked to ribosomal integrity (*LARPI*, *PABPCI*) were also shown to regulate dengue virus replication (39-41).

After virus entry, the traffic inside the cell is adapted for optimizing virus replication and release. The 35 genes associated with intracellular traffic that negatively correlated with the MEL-Index (Figure 4), codify proteins that regulate trafficking in organelles and transport vesicles (*RAB18*, *GRPEL1*), protein transport from the endoplasmic reticulum to Golgi (*RAB2A*), vesicular transport (*RAB7A*, *VTAI*, *TMED5*), lipid transport from the ER (*SIGMAR1*), transport of early endosomes (*FKB15*), nuclear transport (*NUP62* and *NUFT2*). Besides this general approach, it was noteworthy that *FURIN* ($r = -0.15$; $p < 0.01$) codified protein is involved in the cleavage of the SARS-CoV-2 spike (42). This gene gain relevance over the others; it selectively cleaves the SARS-CoV-2 spike, but not the SARS-Cov or MERS-Cov that use a similar gateway (43).

In summary, a High-MEL-Index lung score negatively regulates the expression of genes that facilitates virus mobility inside the cell. SARS-CoV-2 gateways in epithelial AT2 cells and alveolar macrophages occurs via different receptor complexes. The gene expression that codifies each cell's receptors (ACE2 for epithelial AT2 cells, and CD147 for alveolar macrophages) in the lung of healthy subjects present low or no variation with MEL-Index scores (Figure 5, Appendices Table S3). The complex of protein that forms the gateway in epithelial AT2 cells, but not in macrophages, was shown to be responsible for the infection (27). Thus, we will explore the relationship between MEL-Index and the other proteins that form the gateway complexes.

The ACE2 transmembrane protein binds to the virus spike in two stages. The intact spike binds to site one, and then after the cleavage of this protein by a transmembrane serine protease coded by *TMPRSS2*, the spike links to a second binding site attaching the virus to the plasma membrane (44). When the cleavage of the spike protein by the serine protease occurs before the linking to the first binding site, virus invasion is impaired (45). Moreover, another protease, now similar to trypsin, cleaves the SARS-Cov2 spike in a third site, mandatory for virus internalization (46). The presence of a furin-like cleavage site in SARS-CoV-2 facilitates the S protein priming and might increase SARS-Cov-2 infection's efficiency compared to other beta coronaviruses. So, furin inhibitors can be targeted as potential drug therapies for SARS-Cov-2 (47). The relevance of both proteases for SARS-Cov-2 infection is reinforced by a Pharmacological approach, as the antiviral activity of combined *TMPRSS2* and furin inhibitors was more potent than the sum of equivalent isolated doses (43). As the MEL-Index score negatively correlates with the expression of *FURIN* and positively with that of *TMPRSS2*, the entry of the virus in AT2 epithelial cells will be hampered in High MEL-Index subjects, probably turning them into asymptomatic carriers. The data also reinforce the idea that treating the patients with melatonin via nasal installation or drops could reduce the rate of infection.

Nerve-associated, lung-resident interstitial macrophages (NAMS), identified in 2020, and alveolar macrophages are resident cells, yolk-sac derived, constitute the first line of defense (48). NAMS is localized in the nose and trachea, associated with sympathetic neurons. Another gateway mediates virus entry in resident macrophages, and internalization did not promote proliferation (examples: 1918 H1N1 influenza virus (49), respiratory syncytial virus (50), the PR8 influenza virus (51), and the Newcastle disease virus (52). Although no single-cell study could suggest a melatonin-related reduction in SARS-Cov-2 proliferation in alveolar

macrophages, our data clearly show that the proteins that compose the CD147 multi-molecular complex, the gateway for SARS-CoV-2 in macrophages are negatively correlated to MEL-Index scores (Figure 5, Appendices table S3).

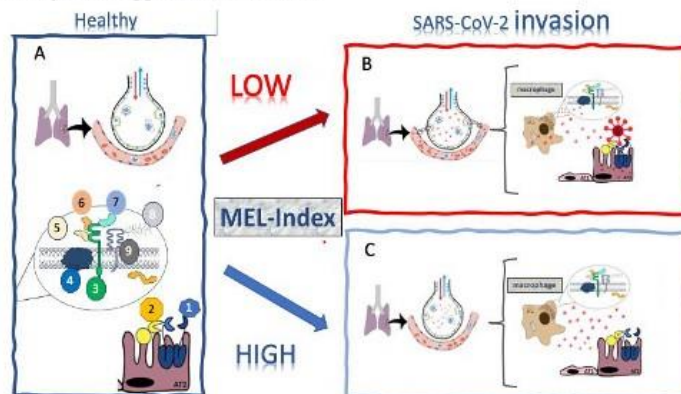


Fig. 5. Lung MEL-Index orchestrating SARS-CoV-2 invasion and infection.

Left side - Healthy lung (A) showing an alveolus and the alveolar macrophage membrane (left) and epithelial AT2 cells SARS-CoV-2 receptors. Right side - of the figure the reaction of healthy low (B)- and high (C)-MEL-Index people to SARS-CoV-2 invasion. In the epithelial AT2 cells, the virus binds to one site in (1), and then it is cleaved by (2), favoring the binding to the second site and internalization. High-MEL-Index scores increase the expression of (2). If the spike is cleaved before the first binding, the entry is hampered (see text). High-MEL Index also negatively correlates with the proteins that form the multi-molecular complex CD-147 receptor. (1)ACE2 - angiotensin-converting enzyme 2; (2) TMRSS2; transmembrane protease, serine 2 (3) CD147 - extracellular matrix metalloproteinase inducer or basigin; (4) MCT-monomonocarboxylate transporters & GLUT1 - glucose transporter 1; (5) CYP A - cyclophilin A; (6) CYP B cyclophilin B ; (7) S100A9; (8) hyaluronic acid; (9) CD44 - also known as phagocytic protein 1. - The figure was adapted from (23), created with BioRender.

CD147 (basigin, *BSG* gene), a transmembrane protein member of the immunoglobulin superfamily, is the center of a multi-molecular receptor complex recognized as the virus gateway in renal, cardiac, gastro-intestinal, and alveolar macrophages (23). The direct interaction of the capsids of corona and HIV-1 to cyclophilin A mediates the binding with CD147 and cell entry (53). Cyclophilins A is a potent leukocyte chemoattractant, and its interaction with CD147 is studied in many contexts, including inflammation, immunological responses, and cancer (54). Contrasting with ACE-1, taken as the gateway of SARS CoV-2 in the lung, CD147 multi-protein complex receptors were implicated in COVID-19 pathogenesis, mainly in patients with comorbidities (23). A paper published in December 2020 reinforced this hypothesis (55). The expression of cyclophilin A in biopsied samples from patients with COVID-19 was enhanced in podocytes and parietal cells compared to non-COVID-19 autopsied tissue or acute kidney injury biopsies. It is noteworthy that, until now, there is no confirmation that concanavalin A immunosuppressed patients constitute a group of risk for COVID-19 (55). Concanavalin A induces immunosuppression via binding with cyclophilin A (56, 57) and blocking the downstream SARS-CoV-2 replication pathway, indeed the same pathway that leads to immunosuppression (58). In summary, there is a growing sum of

information pointing to the multi-molecular CD-147 receptor complex as an essential target for the entry of SARS-CoV-2 in other cells, including the alveolar macrophages (Figure 5).

Taking together the effect of AT2 and resident macrophages gateways, High Mel-Index will block infection, as the entry in AT2 epithelial cells is hampered, and will favor transmission, as resident macrophages gateways are also not expressed. Thus, the present work discloses a biomarker for virus transmission by asymptomatic carriers providing a biological tool for controlling the pandemic. Besides, strongly suggest that "healthy" positive subjects to SARS-CoV-2 mRNA should be preventively treated with nasal administrated melatonin, avoiding the evolution of presymptomatic carriers.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors gratefully thank the financial support from the São Paulo Research Foundation (FAPESP) provided to PACMF (2015/23348-8), RPM (2013/13691-1), MSB (2008/57908-6 and 2014/50884-5) and SMM (2018/24693-9); the National Institute of Science and Technology of Bioethanol (INCT- Bioethanol) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq: 574002/2008-1 and 465319/2014-9, provided to RPM). The founders had no role in the study design, data collection/analysis or preparation of the manuscript. Figure 5 was kindly designed by Débora PM Lotan and Sofia Lotan.

AUTHORSHIP

PAF and RPM concept and designed the work; PAF, GSK, RPM, BVN, VCJ, EDRP, MOCM, DSS, SMM collaborated in data acquisition; PAF, RPM, GSK, BVN, VCJ, AF, HIN and MSB collaborated in data analysis and interpretation; PAF and RPM wrote the manuscript, MSB revised and all the authors approved

CONFLICT OF INTEREST

Authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP (2020) The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat. Rev. Immunol.* **28**: 1–12. doi: 10.1038/s41577-020-0311-8.
2. Wijaya I, Andhika R, Huang I (2020) The Use of Therapeutic-Dose Anticoagulation and Its Effect on Mortality in Patients With COVID-19: A Systematic Review. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* **26**: 1076029620960797. doi: 10.1177/1076029620960797.
3. Stone JH, *et al.* (2020) Efficacy of Tocilizumab in Patients Hospitalized with Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **383** (24): 2333-2344. doi: 10.1056/NEJMoa2028836.
4. Horby P, *et al.* (2020) Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19 - Preliminary Report. *N. Engl. J. Med.* **17**: NEJMoa2021436. doi: 10.1056/NEJMoa2021436.
5. Rice AM, *et al.* (2020) Evidence for strong mutation bias towards, and selection against, U content in SARS-CoV-2: implications for vaccine design. *Mol. Biol. Evol.* **188**. doi: 10.1093/molbev/msaa188.
6. Nikolai LA, Meyer CG, Kremsner PG, Velavan TP (2020) Asymptomatic SARS Coronavirus 2 infection: Invisible yet invincible. *Int. J. Infect. Dis.* **100**: 112-116. doi: 10.1016/j.ijid.2020.08.076.

7. Rocklöv J, Sjödin H, Wilder-Smith A (2020) COVID-19 outbreak on the Diamond Princess cruise ship: estimating the epidemic potential and effectiveness of public health countermeasures. *J. Travel. Med.* **27**: taaa030. doi: 10.1093/jtm/taaa030.
8. Keeley AJ, Evans CM, de Silva TI (2020) Asymptomatic SARS-CoV-2 infection: the tip or the iceberg? *Thorax*. **75**: 621-622. doi: 10.1136/thoraxjnl-2020-215337.
9. Noorimotlagh Z, Jaafarzadeh N, Martínez SS, Mirzaee SA (2020) A systematic review of possible airborne transmission of the COVID-19 virus (SARS-CoV-2) in the indoor air environment. *Environ. Res.* **193**: 110612. doi: 10.1016/j.envres.2020.110612.
10. Markus RP, Fernandes PA., Kinker GS, da Silveira Cruz-Machado S, Marçola M (2018) Immune-pineal axis – acute inflammatory responses coordinate melatonin synthesis by pinealocytes and phagocytes. *Br. J. Pharmacol.* **175**: 3239–3250. doi: 10.1111/bph.14083.
11. Golan K, *et al* (2018) Daily onset of light and darkness differentially controls hematopoietic stem cell differentiation and maintenance. *Cell Stem Cell* **23**: 572-585. doi:10.1016/j.stem.2018.08.002
12. Hardeland R, Tan DX (2020) Protection by melatonin in respiratory diseases: valuable information for the treatment of COVID-19. *Melatonin Res.* **3**: 264-275. doi:10.32794/mr11250061.
13. Cardinali D, *et al.* (2020) Elderly as a High-risk Group during COVID-19 Pandemic: Effect of Circadian Misalignment, Sleep Dysregulation and Melatonin Administration. *Sleep Vigilance* **4**: 81–87. doi:10.1007/s41782-020-00111-7.
14. Reiter RJ, *et al.* (2020) Plasticity of glucose metabolism in activated immune cells: advantages for melatonin inhibition of COVID-19 disease. *Melatonin Res.* **3**: 362-379. doi: 10.32794/mr11250068.
15. Garcia, IG, *et al.* (2020) A randomized multicenter clinical trial to evaluate the efficacy of melatonin in the prophylaxis of SARS-CoV-2 infection in high-risk contacts (MeCOVID Trial): A structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial. *Trials* **21**: 466. doi: 10.1186/s13063-020-04436-6.
16. Acuña-Castroviejo D, *et al.* (2020) Clinical trial to test the efficacy of melatonin in COVID-19. *J. Pineal Res.* **69**: e12683. doi: 10.1111/jpi.12683.
17. Carvalho-Sousa CE, *et al.* (2020) Immune-pineal axis protects rat lungs exposed to polluted air. *J. Pineal Res.* **68**: e12636. doi: 10.1111/jpi.12636.
18. Kinker GS, *et al.* (2016) Melatonergic system-based two-gene index is prognostic in human gliomas. *J. Pineal Res.* **60**: 84 – 94. doi: 10.1111/jpi.12293.
19. Lv JW, *et al.* (2019) Pan-cancer genomic analyses reveal prognostic and immunogenic features of the tumor melatonergic microenvironment across 14 solid cancer types. *J. Pineal Res.* **66**: e12557. doi: 0.1111/jpi.12557.
20. Pinto BGG, *et al.* (2020) ACE2 Expression Is Increased in the Lungs of Patients With Comorbidities Associated With Severe COVID-19. *J. Infect. Dis.* **222**: 556-563. doi: 10.1093/infdis/jiaa332.
21. Gordon DE, *et al.* (2020) A SARS-CoV-2-human protein-protein interaction map reveals drug targets and potential drug-repurposing. *Nature* doi: 10.1101/2020.03.22.002386.
22. Muus C, *et al.* (2020) Integrated analyses of single-cell atlases reveal age, gender, and smoking status associations with cell type-specific expression of mediators of SARS-CoV-2 viral entry and highlights inflammatory programs in putative target cells. *bioRxiv*. doi: 10.1101/2020.04.19.049254.
23. Radzikowska U, *et al.* (2020) Distribution of ACE2, CD147, CD26, and other SARS-CoV-2 associated molecules in tissues and immune cells in health and in asthma, COPD, obesity, hypertension, and COVID-19 risk factors. *Allergy* **75**: 2829-2845. doi: 10.1111/all.14429.

24. Ma X, Idle JR, Krausz KW, Gonzalez FJ (2005) Metabolism of melatonin by human cytochromes P450. *Drug Metab. Dispos.* **33**: 489-494. doi: 10.1124/dmd.104.002410.
25. Subramanian A, et al. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 15545–15550. doi: 10.1073/pnas.0506580102.
26. Jardim VC, et al. (2019) BioNetStat: A Tool for Biological Networks Differential Analysis. *Front. Genet.* **10**: 594. doi: 10.3389/fgene.2019.00594.
27. Aguiar, JA et al. (2020) Gene expression and *in situ* protein profiling of candidate SARS-CoV-2 receptors in human airway epithelial cells and lung tissue. *Eur. Respir. J.* **56**: 2001123. doi:10.1183/13993003.01123-2020.
28. Italiani, P, Boraschi, D (2017) Development and functional differentiation of tissue-resident versus monocyte-derived macrophages in inflammatory reactions. *Results Probl. Cell. Differ.* **62** 23–43.
29. Pontes GN, Cardoso EC, Carneiro-Sampaio MM, Markus RP (2006) Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) - melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. *J. Pineal Res.* **41**: 136-141. doi: 10.1111/j.1600-079X.2006.00345.x.
30. Pires-Lapa MA, Tamura EK, Salustiano EM, Markus RP (2013) Melatonin synthesis in human colostrum mononuclear cells enhances dectin-1-mediated phagocytosis by mononuclear cells. *J. Pineal Res.* **55**: 240-246. doi: 10.1111/jpi.12066.
31. Pires-Lapa MA, Carvalho-Sousa CE, Cecon E, Fernandes PA, Markus RP (2018) β -Adrenoceptors trigger melatonin synthesis in phagocytes. *Int. J. Mol. Sci.* **19**: 2182-2194. doi: 10.3390/ijms19082182.
32. Kitsak M, et al. (2010) Identification of influential spreaders in complex networks. *Nature Phys.* **6**: 888–893. doi: 10.1038/nphys1746.
33. Kinori E, Okamoto, K (2015) PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **33**: 95-101, doi: 10.1016/j.ceb.2015.01.002.
34. Wu J, Yang Y, Gao Y, Wang Z, Ma J (2020) Melatonin Attenuates Anoxia/Reoxygenation Injury by Inhibiting Excessive Mitophagy Through the MT2/SIRT3/FoxO3a Signaling Pathway in H9c2 Cells. *Drug Des. Devel. Ther.* **14**: 2047-2060. doi: 10.2147/DDDT.S248628.
35. Ramasamy S, et al. (2016) Tle1 tumor suppressor negatively regulates inflammation *in vivo* and modulates NF- κ B inflammatory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **113**: 1871-1876. doi: 10.1073/pnas.1511380113.
36. Breda, CNF, et al. (2019) Mitochondria as central hub of the immune system. *Redox Biol.* **26**: 101255, 2019. doi: 10.1016/j.redox.2019.101255.
37. Codo AC, et al. (2020) Elevated glucose levels favor Sars-Cov-2 infection and monocyte response through a Hif-1 α /glycolysis dependent axis. *Cell Metab.* **32** (3): 498-499. doi: 10.1016/j.cmet.2020.07.015.
38. Vriend J, Reiter, RJ (2016) Melatonin and the von Hippel–Lindau/HIF-1 oxygen sensing mechanism: A review. *Biochim. Biophys. Acta* **1865**: 176-183. doi: 10.1016/j.bbcan.2016.02.004.
39. Burrows C, et al. (2010) The RNA binding protein Larp1 regulates cell division, apoptosis and cell migration. *Nucleic. Acids Res.* **38**: 5542–5553, doi: 10.1093/nar/gkq294.
40. Tcherkezian J, et al. (2014) Proteomic analysis of cap-dependent translation identifies LARP1 as a key regulator of 5'TOP mRNA translation. *Genes Dev.* **28**: 357-71. doi: 10.1101/gad.231407.113.
41. Suzuki Y, et al. (2016) Characterization of RyDEN (C19orf66) as an interferon-stimulated cellular inhibitor against dengue virus replication. *PLoS Pathog.* **12**: E1005357-E1005357.

42. Benton DJ, *et al.* (2020) Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion. *Nature* **588**: 327-330. doi: 10.1038/s41586-020-2772-0.
43. Rabaan AA, *et al.* (2020) SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview. *Infez. Med.* **28**: 174-184.
44. Hoffmann M, *et al.* (2020) SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* **181**: 271-280.e8. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052.
45. Matsuyama S, Ujike M, Morikawa S, Tashiro M, Taguchi F (2005) Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 12543-12547. doi: 10.1073/pnas.0503203102.
46. Bestle D, *et al.* (2020) TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. *Life Sci. Alliance* **3**: e202000786. doi: 10.26508/lsa.202000786.
47. Rahman N, *et al.* (2020) Virtual screening of natural products against type II transmembrane serine protease (TMPRSS2), the priming agent of coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Molecules* **25**: 2271. doi: 10.3390/molecules25102271.
48. Ural BB, *et al.* (2020) Identification of a nerve-associated, lung-resident interstitial macrophage subset with distinct localization and immunoregulatory properties. *Sci. Immunol.* **5**: eaax8756. doi: 10.1126/sciimmunol.aax8756.
49. Tumpey TM, *et al.* (2005) Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus: functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice. *J. Virol.* **79**: 14933-14944. doi: 10.1128/JVI.79.23.14933-14944.2005.
50. Pribul PK, *et al.* (2008) Alveolar macrophages are a major determinant of early responses to viral lung infection but do not influence subsequent disease development. *J. Virol.* **82**: 4441-4448. doi: 10.1128/JVI.02541-07.
51. Schneider C, *et al.* (2014) Alveolar macrophages are essential for protection from respiratory failure and associated morbidity following influenza virus infection. *PLoS Pathog.* **10**: e1004053. doi: 10.1371/journal.ppat.1004053.
52. Kumagai Y, *et al.* (2007) Alveolar macrophages are the primary interferon-alpha producer in pulmonary infection with RNA viruses. *Immunity* **27**: 240-252. doi: 10.1016/j.immuni.2007.07.013.
53. Liu C, von Brunn A, Zhu D (2020) Cyclophilin A and CD147: novel therapeutic targets for the treatment of COVID-19. *Med. Drug Discov.* **7**: 100056. doi:10.1016/j.medidd.2020.100056.
54. Trachtenberg A, *et al.* (2011) The level of CD147 expression correlates with cyclophilin-induced signalling and chemotaxis. *BMC Res. Notes* **4**: 396. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-396>.
55. Su H, *et al.* (2020) Expression of CD147 and cyclophilin A in kidneys of patients with COVID-19. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2**: CJN.09440620. doi: 10.2215/CJN.09440620. Epub ahead of print.
56. Gaymes TJ, Cebrat M, Siemion IZ, Kay JE (1997) Cyclophilin A (CLA) mediates its immunosuppressive activity through cyclophilin-dependent calcineurin inactivation. *FEBS Lett.* **418**: 224-227. doi: 10.1016/s0014-5793(97)01345-8.
57. Liu C, *et al.* (2016) Cyclophilin A stabilizes the HIV-1 capsid through a novel non-canonical binding site. *Nat. Commun.* **7**: 10714. doi: 10.1038/ncomms10714.
58. Pfefferle S, *et al.* (2011) The SARS-coronavirus-host interactome: identification of cyclophilins as target for pan-coronavirus inhibitors. *PLoS Pathog.* **7**: e1002331. doi: 10.1371/journal.ppat.1002331.

Melatonin Research (Melatonin Res.)

<http://www.melatonin-research.net>



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

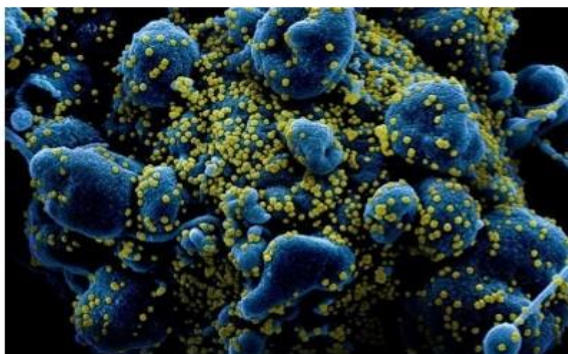
Please cite this paper as:

Fernandes, P.A., Kinker, G.S., Navarro, B.V., Jardim, V.C., Ribeiro-Paz, E.D., Córdoba-Moreno, M.O., Santos-Silva, D., Muxel, S.M., Fujita, A., Moraes, C., Nakaya, H.I., Buckeridge, M.S. and Markus, R.P. 2021. Melatonin-Index as a biomarker for predicting the distribution of presymptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 carriers. Melatonin Research. 4, 1 (Jan. 2021), 189-205. DOI:<https://doi.org/https://doi.org/10.32794/mr11250090>

ANEXO II - Revista FAPESP (ALISSON, E., 2021)

04/02/2021

Agência FAPESP | Melatonina produzida no pulmão impede infecção pelo novo coronavírus



Melatonina produzida no pulmão impede infecção pelo novo coronavírus

11 de janeiro de 2021

Elton Alisson | Agência FAPESP – A melatonina produzida no pulmão atua como uma barreira contra o SARS-CoV-2, impedindo a expressão de genes codificadores de proteínas de

células como os macrófagos residentes, presentes no nariz e nos alvéolos pulmonares, e as epiteliais, que revestem os alvéolos pulmonares e são portas de entrada do vírus. Dessa forma, o hormônio impossibilita a infecção dessas células pelo vírus e, conseqüentemente, a ativação do sistema imunológico, permitindo que o novo coronavírus permaneça por alguns dias no trato respiratório e fique livre para encontrar outros hospedeiros.

A descoberta, realizada por pesquisadores da Universidade de São Paulo (USP), ajuda a entender por que há pessoas que não são infectadas ou que estão com o vírus, detectado por teste do tipo RT-PCR, e não apresentam sintomas de COVID-19. Além disso, abre a perspectiva de uso da melatonina administrada por via nasal – em gotas ou aerossol – para impedir a evolução da doença em pacientes pré-sintomáticos. Para comprovar a eficácia terapêutica do hormônio contra o novo coronavírus, porém, será necessária a realização de uma série de estudos pré-clínicos e clínicos, sublinham os autores do estudo.

Os resultados do trabalho, [apoiado](#) pela FAPESP, foram descritos em [artigo](#) publicado na revista *Melatonin Research*.

“Constatamos que a melatonina produzida pelo pulmão atua como uma ‘muralha’ contra o SARS-CoV-2, impedindo que o patógeno entre no epitélio, que o sistema imunológico seja ativado e que sejam produzidos anticorpos”, diz à Agência FAPESP [Regina Pekelmann Markus](#), professora do Instituto de Biociências (IB) da USP e coordenadora do projeto.

“Essa ação da melatonina do pulmão também deve ocorrer com outros vírus respiratórios, como o da influenza”, estima.

<https://agencia.fapesp.br/print/melatonina-produzida-no-pulmao-impede-infeccao-pelo-novo-coronavirus/34959/>

1/3

04/02/2021

Agência FAPESP | Melatonina produzida no pulmão impede infecção pelo novo coronavírus

Os trabalhos da pesquisadora com melatonina foram iniciados nos anos 1990. Por meio de estudo com roedores, Markus demonstrou que o hormônio produzido à noite pela glândula pineal, no cérebro, com a função de informar o organismo que está escuro e prepará-lo para o repouso noturno, poderia ser produzido em outros órgãos, como no pulmão.

Em um [estudo](#) também com roedores, publicado no início de 2020 no *Journal of Pineal Research*, a pesquisadora e colaboradores mostraram que os macrófagos residentes, presentes no espaço aéreo pulmonar, absorvem (fagocitam) partículas de poluição. Esse estímulo agressivo induz a produção de melatonina e de mais moléculas pelos macrófagos residentes, capazes de internalizar o material particulado no ar respirado pelos animais, e estimula a formação de muco, tosse e expectoração, de modo que essas partículas sejam expelidas do trato respiratório.

Ao bloquear a síntese da melatonina pelos macrófagos residentes, os pesquisadores observaram que as partículas entraram na circulação e foram distribuídas por todo o organismo, incluindo o cérebro.

Com base nessa constatação de que a melatonina produzida no pulmão altera as portas de entrada de partículas de poluição, a pesquisadora e colaboradores decidiram avaliar, agora, se o hormônio desempenharia a mesma função em relação ao SARS-CoV-2.

“Se isso acontecesse, o vírus também não ficaria disponível para se ligar ao receptor ACE2 das células, entrar no epitélio e desencadear a infecção”, explica Markus.

Análise de expressão gênica

Para testar essa hipótese, os pesquisadores analisaram um total de 455 genes associados na literatura a comorbidades relacionadas à COVID-19, interação do SARS-CoV-2 com proteínas humanas e portas de entrada do vírus, identificados em trabalhos como os realizados por [Helder Nakaya](#), professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da USP e um dos autores do estudo. Desse total, foram selecionados 212 genes envolvidos na entrada do novo coronavírus em células humanas, tráfego intracelular, atividade mitocondrial e processo de transcrição e pós-tradução, para criar uma assinatura fisiológica da COVID-19.

A partir de dados de bancos de sequenciamento de RNA foi possível quantificar os níveis de expressão dos 212 genes que compuseram a chamada “assinatura COVID-19” em 288 amostras de pulmão saudáveis.

Ao correlacionar a expressão desses genes com um índice chamado MEL-Index – que estima a capacidade do pulmão de sintetizar melatonina, baseado na análise do órgão de roedores saudáveis

04/02/2021

Agência FAPESP | Melatonina produzida no pulmão impede infecção pelo novo coronavírus

–, os pesquisadores constataram que quanto menor o índice, maior era a expressão de genes que codificam as proteínas de macrófagos residentes e de células epiteliais.

O MEL-Index também se correlacionou negativamente com os genes que modificam as proteínas do receptor celular CD147, que é uma porta de entrada em macrófagos e outras células do sistema imunológico, indicando que a produção normal de melatonina do pulmão pode ser relevante para lidar com a invasão do vírus.

Os resultados foram corroborados por um teste de correlação de Pearson – que mede o grau da correlação entre duas variáveis de escala métrica –, além de uma análise de enriquecimento de conjunto de redes e de uma ferramenta de rede que integra a conectividade entre os genes mais expressos, permitindo comparar um mesmo conjunto de gene em diferentes estados, desenvolvida pelo pesquisador [Marcos Buckeridge](#), professor do IB-USP e um dos autores do estudo.

“Vimos que quando o MEL-Index era alto as portas de entrada do vírus no pulmão ficavam fechadas e, quando estavam baixo, essas portas ficavam abertas. Quando as portas estão fechadas, o vírus fica vagando um tempo pelo ar pulmonar e depois tenta escapar para encontrar outro hospedeiro”, afirma Markus.

Como a melatonina produzida pelo pulmão inibe a transcrição desses genes codificadores de proteínas dessas células que são portas para entrada do vírus, a aplicação de melatonina diretamente no pulmão, em gotas ou aerossol, permitiria bloqueá-lo. Mas isso ainda demandará uma série de estudos, ponderam os pesquisadores.

Outra ideia é utilizar o índice de melatonina pulmonar como um biomarcador de prognóstico para detectar portadores assintomáticos do SARS-CoV-2.

O artigo *Melatonin-Index as a biomarker for predicting the distribution of presymptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 carriers* (DOI: 10.32794/mr11250090), de Pedro A. Fernandes, Gabriela S. Kinker, Bruno V. Navarro, Vinicius C. Jardim, Edson D. Ribeiro-Paz, Marlina O. Córdoba-Moreno, Débora Santos-Silva, Sandra M. Muxel, Andre Fujita, Helder I. Nakaya, Marcos S. Buckeridge e Regina P. Markus, pode ser lido na revista *Melatonin Research* em www.melatonin-research.net/index.php/MR/article/view/109.

ANEXO III - Jornal da USP (ESCOBAR, H., 2021)

JORNAL DA USP (<https://jornal.usp.br/>)

HOME CIÊNCIAS ▾ CULTURA ▾ ATUALIDADES ▾ UNIVERSIDADE ▾ INSTITUCIONAL ▾ RÁDIO USP ▾

Q BUSCA

<https://pt-br.facebook.com/usponline>

<https://twitter.com/usponline>

<https://www.youtube.com/canalusp>

<https://pt.linkedin.com/school/universidade-de-s-o-paulo/>

<https://www.instagram.com/usp.official/>

Home (<https://jornal.usp.br>) > Ciências (<https://jornal.usp.br/editorias/ciencias/>) > Melatonina natural produzida no pulmão pode proteger contra o coronavírus (<https://jornal.usp.br/ciencias/me>)

Melatonina natural produzida no pulmão pode proteger contra o coronavírus

A melatonina produzida no pulmão atua como uma barreira contra o sars-cov-2 ao impossibilitar a infecção dessas células pelo vírus. Hormônio tomado por via oral não produz este resultado

📄 Ciências (<https://jornal.usp.br/editorias/ciencias/>) / Ciências da Saúde (<https://jornal.usp.br/editorias/ciencias/ciencias-da-saude/>) -
🕒 11/01/2021 - 🌐 <https://jornal.usp.br/?p=382432> (<https://jornal.usp.br/?p=382432>)

<https://www.facebook.com/sharer.php?u=https://jornal.usp.br/autor/hertonusp-br/>
<https://www.linkedin.com/sharing/share-offsite/?url=https://jornal.usp.br/autor/hertonusp-br/>
<https://www.instagram.com/usp.official/>
<https://www.youtube.com/watch?v=...>

Por que algumas pessoas são infectadas pelo sars-cov-2 e não desenvolvem sintomas ou apenas sintomas leves? Uma pesquisa (<http://www.melatonin-research.net/index.php/MR/article/view/109>) traz dados que podem ajudar a responder esta questão ao verificar a papel de uma substância produzida no próprio pulmão, a melatonina, na proteção contra a forma grave da doença.

Líder do trabalho, a professora do Instituto de Biociências (IB) da USP Regina Pekelmann Markus ressalta que se trata apenas da melatonina produzida no órgão – tomar o hormônio por via oral, por exemplo, não trará resultados, pois a substância não chega aos pulmões.

Acompanhe no vídeo a baixo uma entrevista com a professora Regina Markus.

Melatonina natural do pulm...

Busca

Mais Lidas

Campus Ribeirão Preto, Ciências, Ciências da Saúde

Dados preliminares mostram que 64% dos recuperados de covid têm sintomas persistentes

Ciências, Ciências da Saúde

Cientistas apontam hipóteses para novo surto de covid-19 em Manaus

Ações para comunidade

Como ensinar evolução humana para crianças? Projeto da USP usa cultura brasileira para falar do tema

Artigos

Negacionismo científico no ensino de Educação Física

Universidade

Fuvest divulga notas de corte da 1ª fase do vestibular da USP

Podcast

Minuto Saúde Mental #01: Você sabe qual a diferença na atuação do psiquiatra, do neurologista e do psicólogo? (<https://jornal.usp.br/podcast/minuto-saude-mental-01-voce-sabe-qual-a-diferenca-na-atuacao-do-psiquiatra-do-neurologista-e-do-psicologo/>) 04/02/2021

Fake News Não Pod #01: Como identificar uma fake news (<https://jornal.usp.br/podcast/fake-news-nao-pod-01-como-identificar-uma-fake-news/>) 03/02/2021

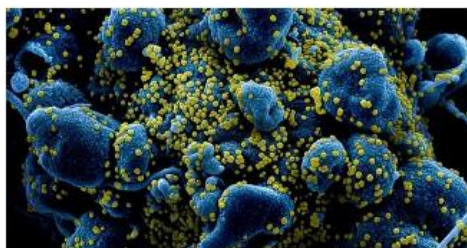
SauDiversidade #014: Eleições, Políticas Públicas e Populações LGBTQIA+ (<https://jornal.usp.br/podcast/saudiversidade>)

E leia mais sobre a pesquisa na reportagem a seguir, da Agência Fapesp.

Melatonina produzida no pulmão impede infecção pelo novo coronavírus

A melatonina produzida no pulmão atua como uma barreira contra o sars-cov-2, impedindo a expressão de genes codificadores de proteínas de células como os macrófagos residentes, presentes no nariz e nos alvéolos pulmonares, e as epiteliais, que revestem os alvéolos pulmonares e são portas de entrada do vírus. Dessa forma, o hormônio impossibilita a infecção dessas células pelo vírus e, conseqüentemente, a ativação do sistema imunológico, permitindo que o novo coronavírus permaneça por alguns dias no trato respiratório e fique livre para encontrar outros hospedeiros.

A descoberta, realizada por pesquisadores da USP, ajuda a entender por que há pessoas que não são infectadas ou que estão com o vírus, detectado por teste do tipo RT-PCR, e não apresentam sintomas de covid-19. Além disso, abre a perspectiva de uso da melatonina administrada por via nasal – em gotas ou aerossol – para impedir a evolução da doença em pacientes pré-sintomáticos. Para comprovar a eficácia terapêutica do hormônio contra o novo coronavírus, porém, será necessária a realização de uma série de estudos pré-clínicos e clínicos, sublinham os autores do estudo.



Hormônio atua como barreira contra o sars-cov-2, impossibilitando a expressão de genes codificadores de proteínas de células que são portas de entrada do vírus, indica estudo feito por pesquisadores da USP – Foto: NIAD/NIH

Os resultados do trabalho, apoiado pela Fapesp, foram descritos no artigo *Melatonin-Index as a biomarker for predicting the distribution of presymptomatic and asymptomatic sars-cov-2 carriers* (<https://www.melatonin-research.net/index.php/MR/article/view/109>), publicado na revista *Melatonin Research*.

"Constatamos que a melatonina produzida pelo pulmão atua como uma 'muralha' contra o sars-cov-2, impedindo que o patógeno entre no epitélio, que o sistema imunológico seja ativado e que sejam produzidos anticorpos", diz à Agência Fapesp Regina Pekelmann Markus, professora do Instituto de Biociências (IB) da USP e coordenadora do projeto.

"Essa ação da melatonina do pulmão também deve ocorrer com outros vírus respiratórios, como o da influenza", estima.

Os trabalhos da pesquisadora com melatonina foram iniciados nos anos 1990. Por meio de estudo com roedores, Regina demonstrou que o hormônio produzido à noite pela glândula pineal, no cérebro, com a função de informar o organismo que está escuro e prepará-lo para o repouso noturno, poderia ser produzido em outros órgãos, como no pulmão.

-014-eleicoes-politicas-publicas-e-populacoes-igbtqia/) 03/02/2021

Saúde Sem Complicações #44: Entenda o que é afonia e como se prevenir (<https://jornal.usp.br/podcast/saude-sem-complicacoes-44-entenda-o-que-e-afonia-e-como-se-prevenir/>) 03/02/2021

Momento Tecnologia #42: Drone que mapeia florestas auxilia no combate ao desmatamento (<https://jornal.usp.br/podcast/momento-tecnologia-42-drone-que-mapeia-florestas-auxilia-no-combate-ao-desmatamento/>) 02/02/2021

Em um estudo também com roedores, publicado no início de 2020 no *Journal of Pineal Research* (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpi.12636>), a pesquisadora e colaboradores mostraram que os macrófagos residentes, presentes no espaço aéreo pulmonar, absorvem (fagocitam) partículas de poluição. Esse estímulo agressivo induz a produção de melatonina e de mais moléculas pelos macrófagos residentes, capazes de internalizar o material particulado no ar respirado pelos animais, e estimula a formação de muco, tosse e expectoração, de modo que essas partículas sejam expelidas do trato respiratório.

Ao bloquear a síntese da melatonina pelos macrófagos residentes, os pesquisadores observaram que as partículas entraram na circulação e foram distribuídas por todo o organismo, incluindo o cérebro.

Com base nessa constatação de que a melatonina produzida no pulmão altera as portas de entrada de partículas de poluição, a pesquisadora e colaboradores decidiram avaliar, agora, se o hormônio desempenharia a mesma função em relação ao sars-cov-2.

"Se isso acontecesse, o vírus também não ficaria disponível para se ligar ao receptor ACE2 das células, entrar no epitélio e desencadear a infecção", explica Regina Markus.

Análise de expressão gênica

Para testar essa hipótese, os pesquisadores analisaram um total de 455 genes associados na literatura a comorbidades relacionadas à covid-19, interação do sars-cov-2 com proteínas humanas e portas de entrada do vírus, identificados em trabalhos como os realizados por Helder Nakaya, professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da USP e um dos autores do estudo. Desse total, foram selecionados 212 genes envolvidos na entrada do novo coronavírus em células humanas, tráfego intracelular, atividade mitocondrial e processo de transcrição e pós-tradução, para criar uma assinatura fisiológica da covid-19.

A partir de dados de bancos de sequenciamento de RNA foi possível quantificar os níveis de expressão dos 212 genes que compuseram a chamada "assinatura covid-19" em 288 amostras de pulmão saudáveis.

Ao correlacionar a expressão desses genes com um índice chamado MEL-Index – que estima a capacidade do pulmão de sintetizar melatonina, baseado na análise do órgão de roedores saudáveis –, os pesquisadores constataram que quanto menor o índice, maior era a expressão de genes que codificam as proteínas de macrófagos residentes e de células epiteliais.

O MEL-Index também se correlacionou negativamente com os genes que modificam as proteínas do receptor celular CD147, que é uma porta de entrada em macrófagos e outras células do sistema imunológico, indicando que a produção normal de melatonina do pulmão pode ser relevante para lidar com a invasão do vírus.

Os resultados foram corroborados por um teste de correlação de Pearson – que mede o grau da correlação entre duas variáveis de escala métrica –, além de uma análise de enriquecimento de conjunto de redes e de uma ferramenta de rede que integra a conectividade entre os genes mais

expressos, permitindo comparar um mesmo conjunto de gene em diferentes estados, desenvolvida pelo pesquisador Marcos Buckeridge, professor do IB-USP e um dos autores do estudo.

“Vimos que quando o MEL-Index era alto as portas de entrada do vírus no pulmão ficavam fechadas e, quando estava baixo, essas portas ficavam abertas. Quando as portas estão fechadas, o vírus fica vagando um tempo pelo ar pulmonar e depois tenta escapar para encontrar outro hospedeiro”, afirma Regina Markus.

Como a melatonina produzida pelo pulmão inibe a transcrição desses genes codificadores de proteínas dessas células que são portas para entrada do vírus, a aplicação de melatonina diretamente no pulmão, em gotas ou aerossol, permitiria bloqueá-lo. Mas isso ainda demandará uma série de estudos, ponderam os pesquisadores.

Outra ideia é utilizar o índice de melatonina pulmonar como um biomarcador de prognóstico para detectar portadores assintomáticos do sars-cov-2.

O artigo *Melatonin-Index as a biomarker for predicting the distribution of presymptomatic and asymptomatic sars-cov-2 carriers* (DOI: 10.32794/mr11250090), de Pedro A. Fernandes, Gabriela S. Kinker, Bruno V. Navarro, Vinicius C. Jardim, Edson D. Ribeiro-Paz, Marlina O. Córdoba-Moreno, Débora Santos-Silva, Sandra M. Muxel, Andre Fujita, Helder I. Nakaya, Marcos S. Buckeridge e Regina P. Markus, pode ser lido na revista *Melatonin Research* em www.melatonin-research.net/index.php/MR/article/view/109 (<http://https://www.melatonin-research.net/index.php/MR/article/view/109>).

Por Elton Alisson | Agência Fapesp