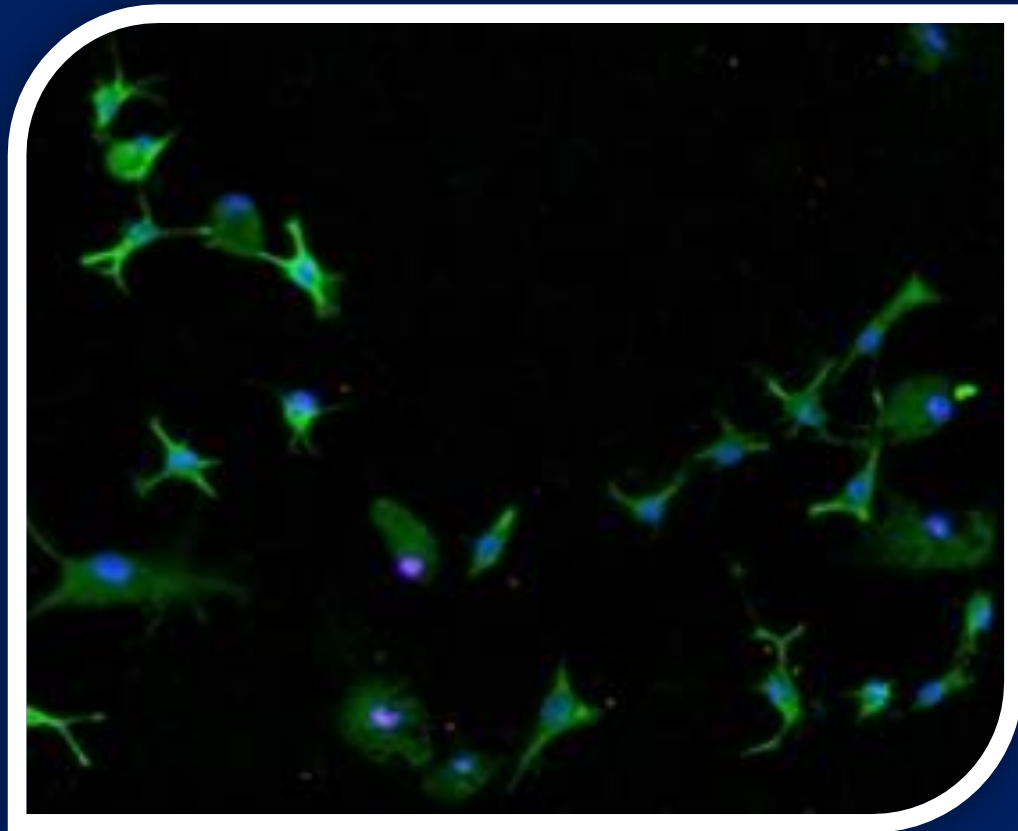


UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS (FISIOLOGIA GERAL)
LABORATÓRIO DE CRONOFARMACOLOGIA

Melatonina como fator regulador do perfil de ativação
de microglias no cerebelo de ratos



Melatonin as a regulatory factor of rat cerebellar
microglia activation

EWERTON DA SILVA DE SOUZA

SÃO PAULO
2021

EWERTON DA SILVA DE SOUZA

Melatonina como fator regulador do perfil de ativação de microglias
no cerebelo de ratos

Melatonin as a regulatory factor of rat cerebellar microglia activation.

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

Orientadora: Profa. Dra. Regina
Pekelmann Markus

São Paulo
2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a) no formulário:
'<https://biblioteca.ib.usp.br/ficha-catalografica/src/ficha.php>'

Souza, Ewerton da Silva
Melatonina como fator regulador do perfil de
ativação de microglias no cerebelo de ratos /
Ewerton da Silva Souza ; orientadora Regina
Pekelmann Markus -- São Paulo, 2021.
73 p.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo. Programa
de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Melatonina. 2. Microglias. 3. Ativação de
microglias. 4. Cerebelo. I. Markus, Regina
Pekelmann, orient. II. Título.

Bibliotecária responsável pela catalogação:
Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228

Nome: Ewerton da Silva de Sousa

Título: Melatonina como fator regulador do perfil de ativação de microglias no cerebelo de ratos

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociência da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciência

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*Aos meus familiares e amigos
que me apoiaram e estiveram
comigo durante a realização
deste trabalho.*

EPÍGRAFE

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.
Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Coloco em primeiro lugar minha gratidão a Deus por ter me proporcionado saúde, sabedoria e me guiado no decorrer desta etapa.

E agradeço imensamente...

À minha orientadora Regina Markus pela oportunidade, por seu tempo e dedicação na condução deste trabalho e pelos ensinamentos que obtive durante o processo. Muito obrigado!!!

À primeira pessoa a me apresentar a ciência na prática, Professora Ana Lúcia Beirão Cabral, que presto, através deste trabalho, minha homenagem! Infelizmente não está entre nós para presenciar este feito, mas com certeza deixou frutos com seus ensinamentos. Eterna saudade!

À minha mãe, Edilene, a mulher mais guerreira e que mais amo, que não mediu esforços em me ajudar e acreditar nas minhas ambições. Obrigado por todo apoio e amor!

Ao meu pai, Sergio, um exemplo de homem com um caráter incomparável. Agradeço imensamente seu apoio em todos os momentos e por ser minha inspiração na busca de novas possibilidades em todas as circunstâncias.

À minha amada avó, Aparecida, que sempre acreditou e torceu por mim.

Ao meu irmão, Felipe, pelo apoio recíproco que sempre tivemos! Valeu meu irmão!

Aos meus tios, Maurício e Leandra, por todo suporte e carinho que recebi de vocês durante essa trajetória! Sou eternamente grato!

À minha namorada, companheira e melhor amiga, Andresa, que entrou na minha vida no meio desse processo e esteve comigo em todos os momentos. Obrigado pelo amor, cumplicidade e carinho, sem você teria sido mais difícil!

Aos meus sogros e amigos, Roberval e Rosenea, pessoas incríveis com quem tenho prazer de conviver e tenho grande apreço.

Ao meu amigo e colega de laboratório, Edson, por toda ajuda no desenvolvimento deste projeto, pela amizade e por muitas colaborações na divulgação científica no grupo BIO+. Teremos muita história pra contar “Adelson”!

Aos meus queridos amigos, Rafael, Lucas, Rita e José, por todos os bons momentos juntos e por aturarem meu papo de biólogo falando de ciência. Obrigado por todo apoio e acolhimento que me deram durante essa fase.

Ao meu grande amigo, Douglas, que fez parte de toda minha trajetória, da escola à faculdade, e não me deixou na mão nesta etapa. Obrigado por todas as palavras de apoio e por acreditar no meu potencial! Meu sincero agradecimento!

Ao meu amigo Santiago, que me recebeu de braços abertos em sua república, que, sem dúvidas, foi um lugar de boas conversas, cervejas e churrascos. Sentirei saudades da “Pire house”!

Ao professor Pedro e à professora Zulma por todo apoio e ensinamentos!

À minha amiga e colega de trabalho Débora Moura, que muito me ajudou durante o desenvolvimento do projeto, e por boas e divertidas conversas e momentos que tornaram os dias no laboratório mais leves.

À minha amiga Débora Silva, por toda sua positividade e apoio.

Às queridas secretárias do departamento, Roseli e Catherine, por toda ajuda e prontidão!

Às funcionárias da portaria, Ideilda, Eliana e Rose, por boas recepções e conversas sempre bem atenciosas e alegres.

A todos os professores que fizeram parte de minha formação e que, sem dúvidas, contribuíram com minha chegada até aqui.

A todos os funcionários e professores do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP. Em especial à professora Ana Maria de Lauro Castrucci pela qual tenho imensa admiração e carinho. E a querida Sandra Muxel, pela amizade, conversas e toda colaboração para a realização deste projeto.

À Isabella, por nossa amizade e por toda, e fundamental colaboração para a realização deste trabalho.

Aos meus queridos amigos e colegas de laboratório: San, Gabriela, Marlina, Carol, Kassiano, Leandro, Yuri, Patrício e Amanda por toda colaboração e boa convivência durante esses anos.

A todos os demais alunos do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP, com os quais dividi a sala de aula, organizei cursos de inverno e outros eventos, além dos bons papos no horário do café.

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Às agências de fomento FAPESP e CNPQ por todo suporte financeiro para a realização deste projeto.

E a todos que, injustamente, eu tenha esquecido de citar nos agradecimentos deste trabalho.

SUMÁRIO

<i>INTRODUÇÃO</i>	10
Melatonina	11
História	11
Síntese de Melatonina: Pineal e Extra-pineal	13
Mecanismos de ação	15
Eixo Imuno-pineal	18
Tecido cerebral	23
Microglias	25
Diferentes fenótipos.....	26
<i>OBJETIVOS</i>	31
Objetivo geral	32
Objetivos específicos	32
<i>RESULTADOS</i>	33
<i>CAPÍTULO 1</i>	35
Abstract.....	37
Introduction	38
Material and methods	40
Animals.....	40
Material, Reagents, Drugs and Antibodies	41
Cell Culture	41
Flowsight cytometry	41
Phenotype Characterization.....	42
Phagocytosis Assay	43
Characterizing the relevance of microglia melatonin for the transition from M1 to M2 phenotype	43
Statistical Analysis	43
Results	44
Microglia Phenotypes in LPS-12h Primary Mixed Cerebellar Glia Cell Cultures	44
Autocrine Melatonin increases microglia phagocytic efficiency	45
Microglia-synthesized melatonin is a key player in phenotype transition	46
Discussion.....	47
Authorship	50
Acknowledgments	50
Conflict of interest statement:	50
Supplementary material	51

References	53
<i>CONCLUSÃO</i>	57
<i>RESUMO</i>	59
<i>ABSTRACT</i>	61
<i>REFERÊNCIAS</i>	63

INTRODUÇÃO

Melatonina

História

Em 1917, Carey McCord e Floyd Allen. relataram que o extrato de glândulas pineais de bovinos clareava a pele de girinos (MCCORD *et al.*, 1917). Quarenta anos depois, Aeron Lerner publicou o artigo intitulado “*isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes*”, no qual sugeriu o nome melatonina para a substância isolada da glândula pineal de bovinos, cujo efeito clareava a pele de sapos devido à agregação de grânulos de melanina nos melanócitos (LERNER *et al.*, 1958). Contudo, um ano antes disso encontra-se uma publicação que já indica ser a melatonina o hormônio da glândula pineal (ALBERTI, 1958). Na mesma década, Mark Altschule e Julian Kitay demonstraram o efeito de extratos da pineal e sua ablação sobre a maturação gonadal (KITAY *et al.*, 1954). Estes dados foram confirmados e incrementados mais tarde por Wurtman *et al.* (1959), que além de testar os efeitos da pinealectomia no ovário, também os observou na glândula adrenal e na hipófise anterior.

Na década de 1960, Virginia M. Fiske observou que ratos mantidos em claro constante apresentavam uma diminuição da glândula pineal e seus estudos identificaram a relação da iluminação ambiental com a atividade reprodutiva em ratos (FISKE *et al.*, 1962). Em 1961, Wurtman e seus colaboradores constataram que, sob iluminação constante, os animais também apresentavam uma hipertrofia de ovário e da glândula adrenal, quando comparados aos ratos mantidos em escuro constante (WURTMAN *et al.*, 1961). Estudos posteriores de Julius Axelrod e Lerner identificaram e classificaram a melatonina como a molécula responsável pelos efeitos observados até então com o extrato da glândula pineal. A partir daí, começaram a perceber a importância da melatonina em regular processos endógenos e que esta regulação era rítmica e estava sobre o controle da luz ambiental. A melatonina ficou conhecida como hormônio antigonadotrófico por diminuir o tamanho e peso de gônadas, principalmente em ratas, sendo que a pinealectomia ou a exposição contínua à luz revertia esse efeito (WURTMAN *et al.*, 1963). Após alguns anos, os resultados que apresentavam conclusões contraditórias e opostas, no qual o efeito da melatonina observado em ovelhas aumentava o tamanho das gônadas, ao invés de seu efeito antigonadotrófico observado em ratas, levaram a novos questionamentos sobre o real efeito desse hormônio (SIMONNEAUX *et al.*, 2003). A relação entre o hormônio pineal e o sistema reprodutor segue com vários estudos mostrando tantos efeitos pró- quanto antigonadotróficos. Estes dados foram todos

contextualizados por Russel J. Reiter, quando mostrou que o efeito estava relacionado com a duração da gestação e a conveniência do nascimento no final da primavera, início do verão (REITER, 1980). Em animais com longos períodos de gestação, a monta deveria ocorrer no outono/ inverno, portanto a melatonina exercia um efeito pró-gonadotrófico, enquanto nos animais de curta gestação, como os roedores, a monta ocorre na primavera.

Simultaneamente, experimentos realizados por Wurtman buscavam entender a função da glândula pineal e como era controlada a produção de melatonina. Em 1963, Johannes Ariens-Kappers identificou que a glândula pineal era inervada por neurônios originários do gânglio cervical superior, e que esta via de sinalização poderia ser a mesma que sinalizava a luz provinda da visão para a glândula pineal. De fato, experimentos comprovaram essa ideia e, mais tarde, estudos confirmaram que a luz que incide na retina é responsável pelo controle circadiano da produção de melatonina e que a sinalização é realizada via trato retino-hipotalâmico para os núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo (NSQs). Então, a melatonina ficou qualificada por sua função rítmica.

Com a descoberta da expressão circadiana da principal enzima da via de biossíntese da melatonina, AA-NAT, primeiramente em pineais de bovinos e posteriormente de outras espécies, novas questões foram levantadas, inclusive a ideia de que serve como um marcador do escuro (KLEIN *et al.*, 1970). Mais tarde, isso explicou por que, em algumas espécies, a melatonina é pró-gonadotrófica e em outras, antigonadotrófica, podendo variar de acordo com o ciclo reprodutivo da espécie e da época do ano que estão reprodutivamente mais ativas, pois independente do animal ser de hábito diurno ou noturno, este hormônio é sintetizado na fase escura; o pico de melatonina marca a existência da noite e a duração do pico marca as estações do ano - desde então, a melatonina passou a ser chamada de “hormônio do escuro” (SIMONNEAUX *et al.*, 2003).

Hoje é consenso que a produção de melatonina pela glândula pineal de mamíferos possui um controle circadiano regulado pela luz, e não possui um sistema de controle por alças de retroalimentação negativa que classicamente acontece com a maioria dos hormônios. A melatonina também é sintetizada em vários órgãos e células, independente da glândula pineal. Há mais de duas décadas, sua produção foi observada também no trato gastrointestinal, retina e no cerebelo de ratos pinealectomizados (BUBENIK *et al.*, 1978; CARDINALI *et al.*, 1971). Estudos sequenciais mostraram que a melatonina não é produzida apenas por pinealócitos. Inúmeros tipos celulares, tecidos e órgãos, tais como cérebro, rim, pâncreas, tireoide, timo, medula óssea e células imunocompetentes sintetizam melatonina (ACUÑA-CASTROVIEJO *et al.*, 2014; CARRILLO-VICO *et al.*, 2005).

A relação entre a melatonina produzida pela glândula pineal e a sintetizada por células de defesa ganhou destaque nas últimas décadas. Tanto a melatonina circulante, quanto a produzida pelas células imunocompetentes na medula óssea, circulação e tecidos participam dos processos de monitoramento, resposta de defesa imediata, recuperação de condições basais e de respostas imunológicas adquiridas (MARKUS *et al.*, 2007; 2018).

Síntese de Melatonina: Pineal e Extra-pineal

A via de biossíntese da melatonina é altamente conservada em todo o reino animal. Inicia-se com o aminoácido triptofano, que sofre a ação da enzima triptofano hidroxilase e o transforma em 5- hidroxitriptofano e deste é convertido em serotonina. Em seguida, ocorre a conversão de serotonina em N-acetilserotonina (NAS) pela enzima aril-alquil-N-acetiltransferase fosforilada (PAA-NAT), e a conversão da NAS em melatonina pela acetilserotonina-metiltransferase (ASMT). Em mamíferos, a produção de melatonina pela glândula pineal é controlada circadianamente e ocorre da mesma forma em animais de hábitos diurno ou noturno (REITER, 1991). Os NSQs do hipotálamo, sede do oscilador circadiano central, recebem inervação direta da camada de células ganglionares da retina, que detectam luz através do fotorreceptor melanopsina. Os NQSs comunicam-se por via polissináptica com a coluna intermediolateral da medula de onde emergem as fibras pré-ganglionares simpáticas que fazem a última sinapse nos gânglios cervicais superiores, e estes inervam a glândula pineal. Terminações simpáticas liberam noradrenalina e trifosfato de adenosina (ATP) e estas vias resultam na fosforilação do fator de transcrição CREB (do inglês, *cyclic AMP response element-binding protein*) nos pinealócitos - células produtoras de melatonina da glândula pineal - que se ligam à região promotora do gene de transcrição da enzima chave na produção de melatonina, AA-NAT (BARBOSA JR *et al.*, 2000) (Figura 1).

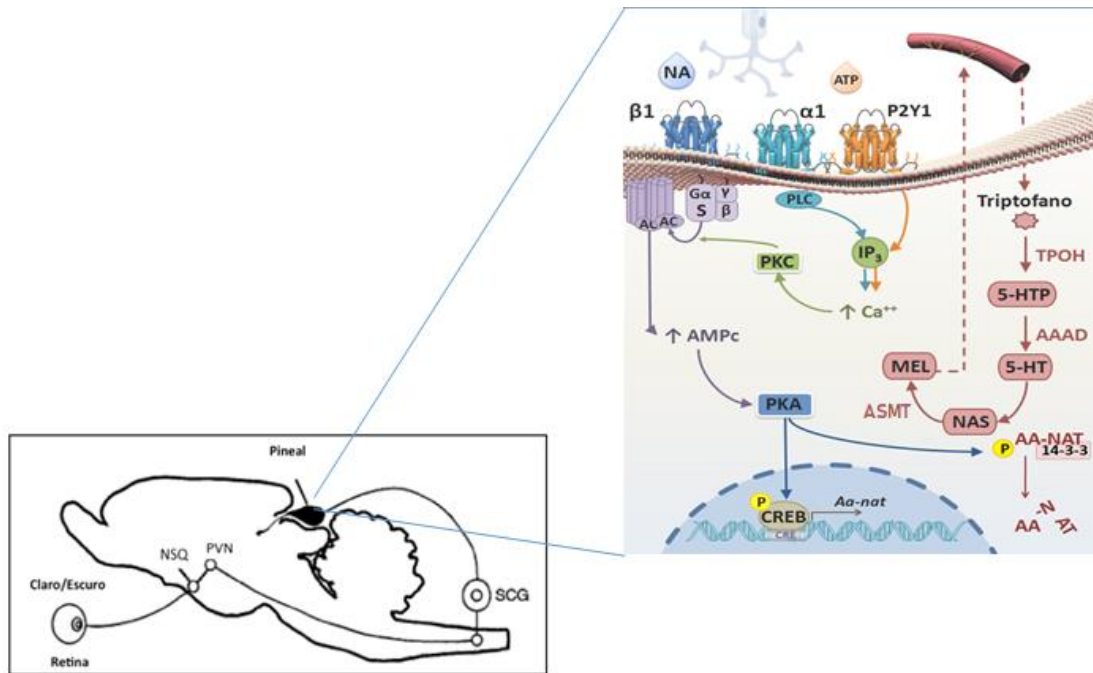


Figura 1 – Controle da produção circadiana da melatonina. Esquema sobre a produção de melatonina em roedores de hábito noturno. **Painel à esquerda** (esquema baseado no apresentado por Schultz & Kay, (2003). Os Núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo (NSQs) recebem informação fótica ambiental captada pela retina e transmitida pelo trato retino-hipotalâmico. A informação é retransmitida para o núcleo paraventricular (PVN) que faz aferências para a coluna intermediolateral que, através do gânglio cervical superior (SCG) induz a síntese noturna de melatonina pela glândula pineal. Os neurônios pós-ganglionares liberam noradrenalina (NA) que interage com receptores β e α adrenérgicos nos pinealócitos. **Painel à direita:** Nos pinealócitos, a ativação de receptores $\beta 1$ adrenérgicos acoplados à proteína Gs (estimulatória) ativa a enzima adenilil ciclase (AC) pela subunidade α da proteína G e aumenta os níveis de AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) que, por sua vez, ativa a proteína quinase dependente de AMPc (PKA). A PKA ativa o fator de transcrição CREB que induz a transcrição do gene da enzima AA-NAT. A ativação de receptores $\alpha 1$ adrenérgicos e receptores P2Y1 purinérgicos – por ATP liberado na fenda sináptica também por neurônios pós-ganglionares - levam ao aumento de Ca^{2+} intracelular e ativação da proteína quinase dependente de cálcio (PKC) que, por sua vez, atua potencializando a ação da AC e a via do receptor $\beta 1$. A enzima AA-NAT é ativada após fosforilação por PKA e ligação à chaperona 14-3-3 que a impede da degradação. A via de biossíntese da melatonina, esquematizada à direita, inicia-se com o metabolismo do triptofano sendo transformado em 5-hidróxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase (TPOH). 5-HTP é transformado em serotonina (5-HT) pela enzima carboxilase de aminoácidos aromáticos (AAAD) e a serotonina, por sua vez, sofre ação direta da enzima AA-NAT fosforilada para formar NAS, que é metilada em melatonina pela enzima ASMT. A melatonina é liberada na circulação à medida que é sintetizada (modificado de Da Silveira Cruz Machado, 2014).

Há uma diferença peculiar na via de síntese da melatonina pela glândula pineal entre animais de hábitos diurno e noturno. Em animais noturnos (ex.: roedores), a ativação β -adrenérgica induz a transcrição e fosforilação da enzima AA-NAT, enquanto em animais de

hábito diurno (ex.: primatas e ungulados), a transcrição da enzima é constitutiva. Em ambos, a fosforilação da enzima AA-NAT é o passo chave para a produção de melatonina, porém a disponibilidade da enzima transcrita constitutivamente em animais de hábito diurno permite uma subida rápida da produção de melatonina após a entrada do escuro, enquanto que, em animais de hábito noturno, o tempo entre a entrada do escuro e a produção de melatonina é mais longo (LEE *et al.*, 2009).

A produção extra-pineal de melatonina ocorre em praticamente todos os órgãos, de maneira rítmica pela retina e constitutiva no trato gastrointestinal, timo, baço, coração, ovário, testículos e outros. Nestes tecidos, foi detectada a presença das enzimas da via de biossíntese da melatonina de forma constitutiva, o que sugere a mesma maquinaria de síntese da glândula pineal, porém a regulação das enzimas AA-NAT e ASMT, como sugerem alguns autores, provavelmente acontece em nível pós-transcricional (ACUÑA-CASTROVIEJO *et al.*, 2014).

A produção de melatonina é observada em diferentes células do sistema imunológico, dentre elas monócitos, macrófagos, linfócitos, mastócitos, células NK (“Natural Killer”) e tímócitos. Essa produção local de melatonina por células imunes acontece de maneira induzida. Em macrófagos, estímulos pró-inflamatórios como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e ao perigo (DAMPs) levam à produção de melatonina através da ativação do fator de transcrição NF- κ B (do inglês, *Nuclear factor kappa B*), que regula a transcrição do gene da enzima AA-NAT (MUXEL *et al.*, 2012; PIRES-LAPA *et al.*, 2013). De fato, a síntese local de melatonina por células imunocompetentes abriu portas para a investigação dos efeitos dessa indolamina na modulação do sistema imunológico durante uma resposta inflamatória, tema que exploraremos com mais detalhes, a seguir.

Mecanismos de ação

A melatonina atua via receptores de alta-afinidade e também como uma molécula doadora de elétrons. Uma das funções mais exploradas da melatonina em todo o reino animal e vegetal é sua capacidade de reduzir estresse oxidativo e nitrérgico. Esta função pode ser exercida por dois mecanismos diferentes. A interação com receptores acoplados à proteína G (GPCRs) leva ao aumento da transcrição de genes ou da expressão e atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathiona peroxidase (GPx), além de inibir a ação de enzimas pró-oxidantes como a síntese de óxido nítrico induzida (NOS - 1) e lipo-oxigenase (LPO) (CARVALHO-SOUSA *et al.*, 2020; HARDELAND *et al.*, 2005). E a participação direta de reações de óxido-redução como doadora de elétrons (AL-KAZWINI *et al.*, 1990; NAIK *et al.*, 2002; POEGGELER *et al.*, 1994). No primeiro caso, o

efeito é exercido por concentrações na faixa de pM – nM, enquanto no segundo é uma reação estequiométrica e há necessidade de melatonina acima de mM.

Há dois subtipos de receptores para melatonina em mamíferos, MT1 e MT2 que podem acoplar a proteínas G inibitória Gi/Go ou à proteína Gq/11. A proteína Gi/Go inibe a fosfolipase A, promovendo uma redução do segundo mensageiro AMPc, o que leva a uma redução da ativação da PKA e às funções correspondentes em cada célula. A Gq promove a ativação da enzima fosfolipase C (PLC), aumento do cálcio livre intracelular e formação de inositol trifosfato (IP3) (CECON *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2016) (detalhes na Figura 2).

Além destas duas moléculas que interagem diretamente com a melatonina, é importante considerar uma molécula que possui 50% de homologia com MT1 e MT2. O receptor órfão GPR50 (do inglês, *G protein-coupled receptor 50*) é derivado do gene ortólogo do receptor Mel1C (MT3) presente em peixes, anfíbios e pássaros. GPR50 heterodimeriza com o receptor MT1. O receptor MT2 também dimeriza com um dos subtipos dos receptores de serotonina (5HT-2C) (AMARAL *et al.*, 2018; CECOM *et al.*, 2018; DUFOURNY *et al.*, 2008). Portanto, há uma gama importante e ainda não explorada para entender a forma como concentrações bastante reduzidas de melatonina promovem respostas fisiológicas e fisiopatológicas. Neste contexto é preciso destacar que experimentos que utilizem o antagonismo de receptores para avaliar o efeito da melatonina endógena vêm ganhando espaço e têm sido usados regularmente em nosso grupo de trabalho.

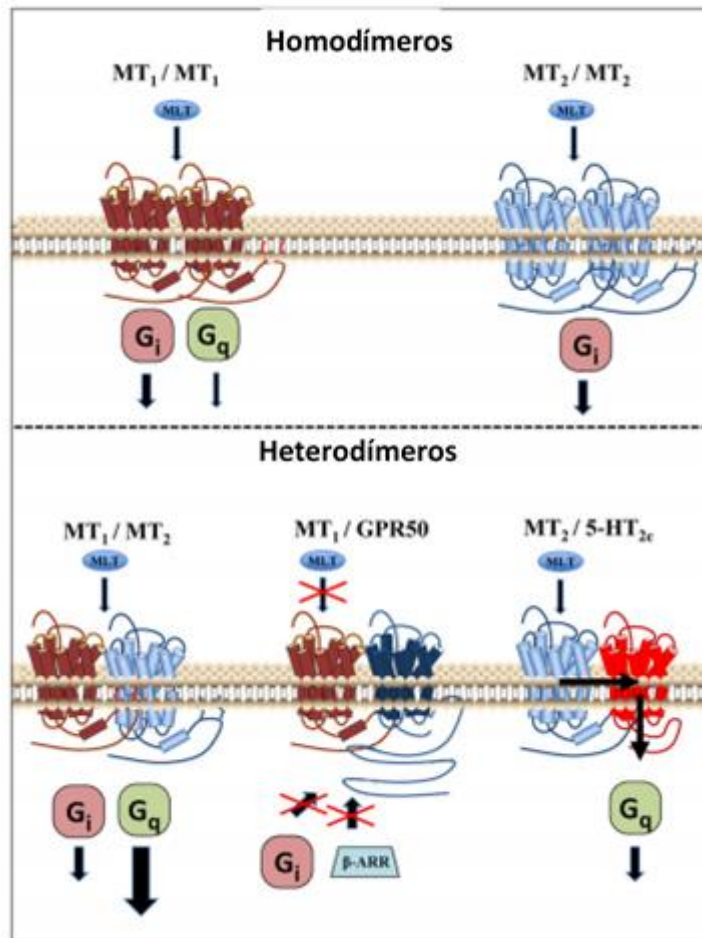


Figura 2 - Sinalização de homodímeros e heterodímeros do receptor de melatonina. A ativação de homodímeros MT1/MT1 dispara a sinalização intracelular predominantemente por meio da via Gi sobre a via Gq, enquanto os homodímeros MT2/MT2 sinalizam exclusivamente por meio de proteínas Gi. No heterodímero MT1/MT2, a sinalização da melatonina é tendenciosa para a ativação Gq sobre Gi. Ao dimerizar com GPR50, o receptor MT1 perde sua capacidade de se ligar à melatonina, de acionar a sinalização de Gi e de recrutar β-arrestina (β-ARR). A ativação da melatonina do heterômero MT2/5-HT_{2c} (subtipo de receptor de serotonina) dispara a sinalização Gq dependente do receptor 5-HT_{2c} por meio de um mecanismo de transativação do receptor MT2. (baseado em Cecon *et al.*, 2018).

Em 1988, foi observada a ligação da melatonina a um receptor que se apresentava claramente diferente de um GPCR, e foi inicialmente caracterizado como *MT3* (DUBOCOVICH, 1988b). Estudos posteriores, com uso de um ligante com alta afinidade para ele e baixa para MT1 e MT2, identificaram que este receptor se tratava de uma quinona redutase 2 (NQO2), e estudos farmacológicos identificaram que a melatonina se ligava ao sítio catalítico desta enzima em concentrações de μM (LIU *et al.*, 2019). Atualmente já é aceito que a afinidade deste receptor é maior para o precursor NAS do que para a própria melatonina. Estudos revelaram que a ativação deste receptor inibe o rolamento e adesão de

células imunes através da camada endotelial dos vasos (ČERNYŠIOV *et al.*, 2015; LOPES *et al.*, 2001).

Em uma revisão sistemática, Liu *et al.* (2019) apontaram 18 alvos propostos de ligação da melatonina, o que abrange enzimas, transportadores, receptores de membrana, receptores nucleares e outras proteínas. Estudos em andamento caracterizam o perfil farmacológico destes alvos em concentrações que vão de nano a milimolar, o que pode indicar uma importante regulação entre as produções sistêmicas de melatonina pela glândula pineal e a produção local de melatonina na periferia, além de seu uso farmacológico (LIU *et al.*, 2019).

Tendo em vista o amplo número de alvos propostos, a concentração é um importante divisor de águas no estudo da melatonina e seus efeitos. A escolha adequada da dose em experimentos conduzidos *in vitro* ou *in vivo* e o alvo a que se almeja é um importante critério para a correta observação do efeito. A faixa de concentração em que a melatonina pode causar algum efeito varia de pM a mM. Em concentrações abaixo de 0,1 μ M, podem-se apresentar efeitos com relevância fisiológica, uma vez que as concentrações plasmáticas e de tecidos não ultrapassam essa faixa, e a afinidade (Kd) dos receptores MT1 e MT2 são de 0,1 nM. Por outro lado, concentrações acima de 0,1 μ M são consideradas farmacologicamente relevantes (CECON *et al.*, 2021).

Portanto, os fatores que contribuem para a característica pleiotrópica da melatonina estão relacionados com a natureza química da molécula e envolvem sua interação com diferentes alvos, que são dependentes da concentração. Neste contexto, em uma abordagem fisiológica, os efeitos dependem também do local de síntese da melatonina, cuja concentração varia de acordo com o volume do meio. Além disso, há uma vasta literatura que explora os efeitos farmacológicos da melatonina em concentrações acima do que encontramos no organismo. Por fim, os efeitos são dependentes também da distribuição, subtipos e arranjos de seus receptores e outros alvos em diferentes tecidos e células (AMARAL *et al.*, 2018; CECOM *et al.*, 2018).

Eixo Imuno-pineal

A resposta imunológica inata é a primeira linha de defesa contra ameaças que podem comprometer a homeostasia do organismo, no qual barreiras físicas e químicas previnem uma possível infecção provocada por agentes patogênicos. Em mamíferos, os mecanismos de defesa se caracterizam por vigilância contínua e por respostas estereotipadas a PAMPs e DAMPs, com função de defesa do organismo e remoção do agente agressor. Uma resposta

adquirida também pode ser ativada por uma infecção microbiana, garantindo respostas mais eficientes em exposições futuras ao mesmo. A regulação eficiente destes mecanismos de defesa é essencial não apenas para uma resposta efetiva contra ameaças, mas também para uma resposta estritamente regulada, garantindo uma resolução tão eficiente quanto uma ativação. Esta balança é, de fato, uma base para uma gama de doenças de importância médica, como câncer, doenças autoimunes e doenças neurodegenerativas (MARKUS *et al.*, 2018).

A descoberta da produção de melatonina por células imunocompetentes reforçou o papel desta indolamina como um importante imunomodulador local, dando à melatonina uma nova face na regulação de processos relacionados à defesa. A primeira evidência de uma produção de melatonina local e seu efeito imunomodulador por células imunocompetentes foi vista em linfócitos; esta produção regula de maneira autócrina e parácrina a expressão de receptores da interleucina-2 (IL2R) nestas células. Em células Th17, a melatonina regula a expressão dos fatores de transcrição ROR α , e ROR γ , envolvidos no processo de diferenciação celular (CARRILLO-VICO *et al.*, 2004). Hoje, sabemos que muitas outras células do sistema imune produzem melatonina, dentre elas os linfócitos (CARRILLO-VICO *et al.*, 2004; 2005), macrófagos (MARTINS JR *et al.*, 2004; MUXEL *et al.*, 2012; PIRES-LAPA *et al.*, 2013), células mono e polimorfonucleares do colostro (PONTES *et al.*, 2006; 2007), timócitos (NARANJO *et al.*, 2007), mastócitos (MALDONADO *et al.*, 2010), células da glia (PINATO *et al.*, 2015) e células da medula óssea (GOLAN *et al.*, 2018).

Para entender a participação da melatonina nos processos de vigilância e resposta aguda, foi introduzido o conceito de Eixo Imuno-Pineal. A glândula pineal está instrumentada para responder a padrões moleculares associados a patógenos, perigo e também morte celular (MARKUS *et al.*, 2007). A ativação dos receptores correspondentes resulta na suspensão temporária da produção de melatonina noturna e o mesmo sistema de sinalização induz a produção da melatonina periférica. A construção desse conhecimento se iniciou na década de 1990, período em que o papel anti-inflamatório da melatonina havia sido descrito pela primeira vez (HARDELAND *et al.*, 1995). Neste período, observou-se em um modelo de inflamação crônica, que o inchaço causado na pata de camundongos após uma injeção de bacilo da tuberculose (BCG – *Bacillus de Calmette-Guérin*), apresentava ritmo ao longo do dia, ficando mais inchada durante o dia e menos durante a noite. Em animais pinealectomizados, o ritmo foi abolido e a reposição de melatonina na água de beber destes animais restaurou a variação dia/noite na espessura da pata (LOPES *et al.*, 2001). Foi observado também um aumento no número de leucócitos no local da inflamação durante o dia em relação à noite. Interessante lembrar que a modulação da melatonina da glândula pineal já

era citada antes disso, sugerindo um efeito relevante na manutenção da homeostasia, uma vez que o papel imunomodulador da melatonina em células imunológicas já havia sido descrito (SKWARLO-SONTA, 1996; SKWARLO-SONTA *et al.*, 2003; TSAI, S-Y *et al.*, 2001; TSAI, SY *et al.*, 2001).

Mais tarde, foi mostrado que a glândula pineal era capaz de “perceber” sinais de alerta durante uma resposta inflamatória, o que levava à inibição da síntese de melatonina. A exposição de glândulas pineais ao fator de necrose tumoral (TNF), citocina pró-inflamatória, e ao lipopolissacarídeo (LPS), PAMP proveniente da parede celular de bactérias gram-negativas, causava uma supressão na produção de melatonina via inibição da enzima AA-NAT (DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO *et al.*, 2010; FERNANDES *et al.*, 2006). O mesmo efeito foi observado em humanos, *in vivo*, em mulheres que desenvolveram mastite. Neste caso, os níveis de TNF- α estavam elevados e o ritmo diário de melatonina foi suprimido. Após a resolução da inflamação, com os níveis de TNF- α basais, o ritmo foi restabelecido (PONTES *et al.*, 2006).

Novos estudos mostraram que a melatonina de origem pineal, circulante no plasma, inibe o rolamento e adesão de leucócitos através da camada endotelial de vasos, reduzindo a expressão de proteínas de adesão (ICAM e PECAM). Este efeito corrobora com o aumento de células encontrado nas patas de camundongos durante o dia (quando não há melatonina circulante), pois a ausência da melatonina, em uma condição inflamatória local, facilita a migração de leucócitos para o tecido, contribuindo para a montagem da resposta inflamatória (LOTUFO *et al.*, 2001). Da mesma forma, estes resultados sustentaram um importante papel da glândula pineal em atuar como um sensor, que, em condições normais, mantém níveis basais de melatonina circulante no plasma com uma função de monitoramento, impedindo a migração de células para o tecido e consequentemente inibindo uma resposta imunológica desnecessária. Por outro lado, em condições de injúria, uma sinalização de dano/perigo inibe a produção de melatonina pela glândula pineal, facilitando a migração de células para o local da inflamação (MARKUS *et al.*, 2018).

Vários estudos foram realizados e sustentaram o papel da glândula pineal em regular o sistema imunológico e hoje sabemos que uma série de mediadores inflamatórios pode modular esse fino sistema. PAMPs como LPS de bactérias gram-negativas, zimosan da parede celular de fungos, e DAMPs como citocinas, ATP intracelular, heparan Sulfato e outros são capazes de inibir a produção de melatonina pela glândula pineal (MARKUS, *et al.*, 2013; PIRES-LAPA *et al.*, 2013; SOUZA-TEODORO *et al.*, 2016). Em contrapartida, a produção de melatonina passa a ocorrer no local da inflamação por células imunocompetentes quando

ativadas. Estes achados postularam a hipótese da existência do Eixo Imuno-pineal, caracterizado pela troca entre as fontes de produção de melatonina durante uma resposta de defesa do organismo. Publicado pela primeira vez em 2007 (MARKUS *et al.*, 2007) e hoje muito bem consolidado na literatura (Figura 3).

O mecanismo por trás desta troca entre as fontes de produção de melatonina está ligado às diferentes formas de ativação do fator de transcrição NF- κ B, que acontece na glândula pineal e nas células imunocompetentes. A família do fator de transcrição NF- κ B é composta por cinco proteínas, três delas (RelA, RelB, e cRel) com um domínio de transativação (TAD) e duas proteínas (p50 e p52) sem o TAD (MARKUS *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2017). Os dímeros contendo TAD induzem a transcrição gênica. Os dímeros translocam para o núcleo após ativação e ligam-se a elementos responsivos à região κ B do DNA e, dependendo das subunidades que formam esses dímeros, o mesmo sinal extracelular pode ativar ou inibir a produção de melatonina, interagindo com os elementos κ B presentes no promotor do gene da enzima AA-NAT (MUXEL *et al.*, 2012; 2016).

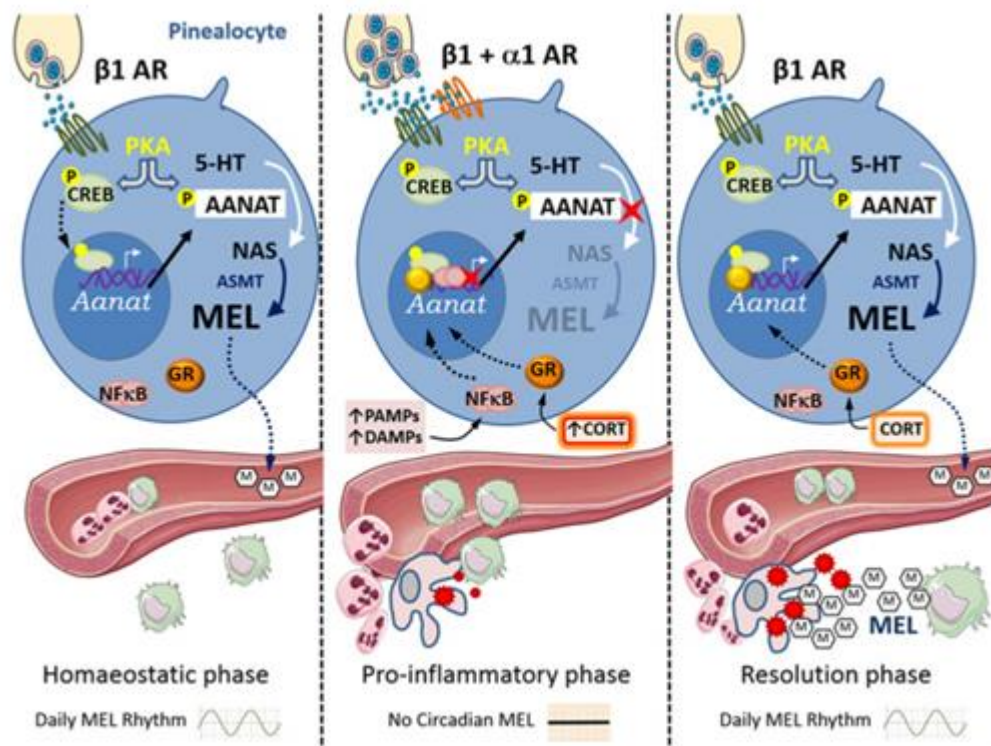


Figura 3 - O Eixo Imuno-Pineal. Painel à esquerda: Em condições normais, a sinalização simpática para a glândula pineal é ativada à noite. A ativação de PKA mediada por receptores β 1-adrenérgicos leva à fosforilação de CREB em CREB fosforilado (PCREB), que migra para o núcleo e induz a transcrição do gene *Aanat*. PKA também fosforila AA-NAT, evitando sua degradação pelo proteassoma. PAA-NAT converte 5-HT em NAS, o precursor direto da melatonina. A ação via receptor de membrana da melatonina em células endoteliais inibe a expressão de moléculas de adesão,

impedindo a migração de leucócitos. **Painel central:** Fase pró-inflamatória – Monócitos residentes detectam patógenos ou lesão no tecido e liberam citocinas. Em pinealócitos, PAMPs e DAMPs interagem com receptores de membrana e induzem a ativação de NF- κ B. O dímero p50/p50 transloca para o núcleo e se liga ao promotor do gene *Aanat*, reduzindo sua transcrição. Com uma maior sinalização simpática, com receptores $\alpha 1$ e $\beta 1$ adrenérgicos ativados, hormônios do córtex adrenal (corticosteroide/cortisol) bloqueiam a síntese de melatonina na pineal. O bloqueio da produção de melatonina à noite permite a migração de neutrófilos através da camada endotelial. Neutrófilos ativados liberam mediadores e citocinas pró-inflamatórias que recrutam monócitos diferenciados em macrófagos que iniciam o processo de limpeza do tecido. **Painel à direita:** Fase de resolução – A melatonina produzida localmente por macrófagos atua de maneira autócrina/parácrina induzindo a expressão de moléculas de membrana como *dectina-1* que potencializa fagocitose. Essa síntese local de melatonina é mediada pelos dímeros cRel/RelA de NF- κ B, que promovem a transcrição de *Aanat* e permitem a recuperação da produção noturna de melatonina (MARKUS *et al.*, 2018).

Em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7, a ativação de receptores do tipo Toll4 (TLR4) por LPS, induz a produção de melatonina. Essa produção é mediada pela ativação de dímeros contendo a subunidade cREL do fator de transcrição NF- κ B, que induz à transcrição do gene da enzima AA-NAT (MUXEL *et al.*, 2012; 2016). A produção de melatonina induzida por LPS em macrófagos contribui para a fase de resolução da resposta inflamatória, uma vez que a subunidade cREL apresenta-se de forma tardia no processo, inibindo a transcrição de mediadores inflamatórios (DE JESÚS *et al.*, 2020; MUXEL *et al.*, 2016). Esse dado corrobora vários efeitos benéficos que a melatonina exerce no local da inflamação, como a redução do estresse oxidativo e atuando de maneira parácrina e autócrina via receptor regulando a expressão de citocinas. Outro importante efeito local da melatonina é a indução das células imunes a um fenótipo fagocitário (PIRES-LAPA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2004). Além disso, estudos apontam que o tratamento com melatonina é capaz de induzir a polarização de macrófagos/microglias para um estado anti-inflamatório/resolução (BERKIKS, I *et al.*, 2018; DING *et al.*, 2014; LIN *et al.*, 2016; WU, UN IN *et al.*, 2011). Estes dados evidenciam o potencial imunomodulador da melatonina no tecido em condições de injúria e apontam seus potenciais em inibir fatores pró-inflamatórios e favorecer a fase de resolução da resposta inflamatória favorecendo o *clearence* e manutenção do tecido.

Enquanto o LPS aumenta a produção de melatonina no local da inflamação em monócitos/macrófagos, ele a inibe na glândula pineal. A inibição da produção de melatonina na glândula pineal é possível devido à sua condição anatômica, uma vez que a glândula pineal é um órgão circunventricular e livre da barreira hematoencefálica, o que lhe permite receber sinais provenientes do plasma (KIECKER, 2018). A inibição da produção de melatonina pode acontecer diretamente com a ativação de pinealócitos por PAMPs e DAMPs ou através

da ativação de microglias presentes na glândula pineal que, por sua vez, liberam citocinas, e estas atuam de maneira parácrina nos pinealócitos, inibindo a produção de melatonina (DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO *et al.*, 2010). Vale lembrar que essa inibição é um importante evento que facilita o processo de rolamento e adesão de leucócitos através da camada endotelial dos vasos (DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO *et al.*, 2010; LOTUFO *et al.*, 2001; LOTUFO *et al.*, 2006; MARKUS, R. P. *et al.*, 2013), fundamental para a montagem da resposta inflamatória (GINHOUX *et al.*, 2014).

A ativação do Eixo Imuno-pineal, caracterizada pela inibição da produção de melatonina pela glândula pineal e por uma produção local por células imunocompetentes (Figura 3) já foi observada em diferentes condições, como mastite (PONTES *et al.*, 2006), neuroinflamação (PINATO *et al.*, 2015) e em pulmões expostos à poluição atmosférica (CARVALHO-SOUSA *et al.*, 2020), demonstrando que a melatonina é um importante modulador da resposta inflamatória em condições de injúria. O presente trabalho contribui para o entendimento deste processo no sistema nervoso central.

Tecido cerebral

A primeira evidência de uma produção local de melatonina no cérebro, independente da pineal, foi a presença de enzimas da via biossintética da melatonina, encontradas na retina e no cerebelo, indicando que estes tecidos poderiam produzir melatonina. Mais tarde, altas concentrações de melatonina foram encontradas no cerebelo e no córtex de animais pinealectomizados, mostrando que, pelo menos estas áreas produziam melatonina (ACUÑA-CASTROVIEJO *et al.*, 2014). Hoje sabemos que em várias regiões do cérebro existe a maquinaria necessária para sustentar uma produção local (ALGHAMDI, 2018), porém ainda não se sabe ao certo em que circunstâncias essa produção acontece.

Os tipos celulares que produzem melatonina no sistema nervoso central ainda são incertos e são pouco investigados. Um maior número de evidências concentra-se nas células da glia. A produção em astrócitos foi descrita pela primeira vez em 2007 (LIU *et al.*, 2007), mostrando que astrócitos isolados de ratos expressam as enzimas AA-NAT e ASMT e são capazes de produzir melatonina independente da glândula pineal.

Em nosso laboratório, de modo a investigar se o processo induzido de neuroinflamação levaria à ativação do Eixo Imuno-Pineal – portanto à produção local de melatonina no cérebro e inibição pela glândula pineal – foi observado que ratos pinealectomizados injetados com LPS via intracerebroventricular (ICV) tiveram o pico noturno de melatonina reduzido no plasma e apresentaram um aumento na produção local de

melatonina no cerebelo, mas não no hipocampo e no córtex (PINATO *et al.*, 2015). Este achado confirmou a ativação do Eixo Imuno-Pineal neste modelo. Análises histológicas no cerebelo apontaram um aumento na expressão da enzima AA-NAT em astrócitos e microglias após estímulo com LPS, sugerindo que estas células seriam as responsáveis pela produção local de melatonina após ativação. O aumento de melatonina no cerebelo acontece por um mecanismo dependente da ativação do fator de transcrição NF-κB e o bloqueio dos receptores de melatonina com luzindol aumentou a morte neuronal no tecido, revelando um mecanismo neuroprotetor conferido pela melatonina produzida localmente no cerebelo (PINATO *et al.*, 2015). Vale ressaltar que esta foi a primeira evidência de uma produção de melatonina local no cerebelo sob condições inflamatórias.

Após a observação da produção local de melatonina dependente da ativação do fator de transcrição NF-κB e seu efeito neuroprotetor no cerebelo, novos estudos foram conduzidos a fim de esclarecer o papel das microglias, principais células imunes do sistema nervoso, na produção local de melatonina. Em ensaios conduzidos em cultura primária mista de células do cerebelo de ratos, o estímulo com LPS induziu a produção de melatonina e, interessantemente, após inibição da ativação das microglias com minociclina, esta produção foi suprimida, sugerindo que estas células, quando ativadas, são as principais produtoras de melatonina no cerebelo em condição de injúria (SANTOS, 2015). Além disso, a melatonina endógena aumentou a capacidade fagocítica das microglias cerebelares. Este achado nos levou a investigar, como foco deste projeto, o papel da melatonina produzida por microglias cerebelares em condições de injúria na regulação do perfil de ativação destas células, que está diretamente relacionado com o processo de neuroinflamação e doenças neurodegenerativas.

Importante ressaltar que o aumento da produção de melatonina somente no cerebelo após o estímulo com LPS em ratos pinealectomizados foi uma surpresa. Interessantemente, no cerebelo o número de microglias é menor em relação a outras regiões do cérebro (TAN *et al.*, 2020) e estudos sugerem que as microglias cerebelares são imunologicamente mais reativas (FERRO *et al.*, 2019; GRABERT, KATHLEEN *et al.*, 2016), e isso poderia explicar uma produção de melatonina mediada por NF-κB após estímulo com LPS. O cerebelo também é um órgão com um grande número de neurônios granulares, células que necessitam de um ambiente que mantenha uma despolarização parcial para sobreviver, com elevada concentração de K⁺. Essa hiperatividade dos neurônios leva a um aumento de Ca²⁺ intracelular que, por consequência, induz uma contínua ativação de NF-κB, importante para a sobrevivência celular (FRANCO *et al.*, 2014; GALLI *et al.*, 1995; GALLO *et al.*, 1987). De fato, o estímulo com LPS – e consequente ativação de NF-κB e aumento de NO – leva à

morte de neurônios granulares; porém, na presença de melatonina, o efeito neurotóxico do LPS é reduzido. Já em condições basais, o estímulo com melatonina (100 mM) aumenta a morte neuronal (FRANCO *et al.*, 2014). Esses achados reforçam a ideia de que o fino equilíbrio mantido no cerebelo, quando perturbado, pode ser reestabelecido por uma produção local de melatonina e que, em condições normais, a melatonina em altas concentrações poderia ser um fator perturbador e levar à morte neuronal. Em conjunto, estes dados levam à hipótese de que a melatonina produzida por microglias poderia não apenas modular a resposta inflamatória local, como também ser um importante fator para a prevenção da morte de neurônios neste tecido.

Microglias

As microglias, conhecidas como macrófagos do SNC, são as principais células de defesa do cérebro e atuam na resposta imunológica inata, respondendo prontamente a sinais imunológicos. Estas células carregam uma maquinaria completa de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que lhes confere a capacidade de reconhecer, interpretar e informar sinais de perigo de natureza patológica ou fisiopatológica às demais células. Sendo a principal célula do sistema imunológico presente no SNC, a função das microglias na defesa contra infecções é fundamental para o tecido e, além disso, as microglias são “varredoras” do parênquima cerebral, limpando detritos celulares e células apoptóticas, mantendo o sistema nervoso em homeostasia (MÁRQUEZ-ROPERO *et al.*, 2020).

As microglias possuem características peculiares em relação a outras populações de macrófagos. Por um longo período, acreditou-se que as microglias e outros macrófagos tinham origem de monócitos provenientes da circulação, o que deu origem à teoria do “sistema fagocitário mononuclear” (VAN FURTH *et al.*, 1972). De fato, algumas populações de macrófagos residentes podem ser renovadas a partir de monócitos circulantes, como acontece no intestino, pâncreas e coração. Porém, sabe-se hoje que a origem dos macrófagos, principalmente as microglias – entre outros também – se dão durante o desenvolvimento e que podem se autorrenovar localmente sem o envolvimento significativo de monócitos circulantes (MÁRQUEZ-ROPERO *et al.*, 2020). Entretanto, monócitos circulantes podem migrar para o cérebro e se diferenciar em microglias (microglias derivadas de monócitos) quando requisitados por injúria (HESS *et al.*, 2004).

A origem dos macrófagos residentes ainda é motivo de dúvidas. Contudo, existem duas principais vias que são bem aceitas, o saco vitelino e a região da aorta-gônada-

mesonefros. Neste aspecto, a origem das microglias é a mais indiscutivelmente aceita. Dados sugerem que microglias residentes são de origem embrionária providas do saco vitelino assim como macrófagos do baço, pulmão, fígado e epiderme (GINHOUX *et al.*, 2010; KIERDORF *et al.*, 2013; PERDIGUERO *et al.*, 2015). Apesar de suas características em comum, que abrangem sua origem e funções de defesa, atualmente os macrófagos são vistos como células que exercem funções especializadas que são tecido-específicas. Nos pulmões, os macrófagos limpam o surfactante pulmonar; no tecido adiposo, participam do metabolismo de lipídios e da insulina, bem como no cérebro as microglias interagem com neurônios, monitoram o parênquima cerebral com suas longas extensões e participam da formação de sinapses, aquisição de memória, dentre outras funções. Estas particularidades são conferidas por assinaturas epigenéticas distintas que diferenciam as microglias de outros macrófagos (MÁRQUEZ-ROPERO *et al.*, 2020). Além disso, estudos do transcriptoma de microglias revelam que elas podem apresentar diferentes funções em condições basais e inflamatórias.

Diferentes fenótipos

Ao reconhecerem PAMPs e DAMPs, as microglias adquirem diferentes fenótipos que determinam sua função imunológica. Estes fenótipos podem variar de acordo com o padrão, intensidade e duração do estímulo, e são caracterizados por uma mudança morfológica e uma assinatura molecular específica. As microglias são células fagocitárias especializadas; dessa forma, sua ativação é também importante para a eliminação de partículas estranhas, dentre elas patógenos como bactérias e fungos, e debrís celulares (WAISMAN *et al.*, 2015). A ativação de microglias também está intimamente relacionada com os processos de neuroinflamação e doenças neurodegenerativas (LANNES *et al.*, 2017).

Em estado hígido, também chamado de “M0”, as microglias apresentam longas extensões de seu corpo celular (processos) que contribuem com sua função fisiológica de monitorar o parênquima cerebral (DING *et al.*, 2016). Quando ativadas, assumem uma morfologia amebóide e adquirem fenótipos que podem ser pró- (M1) ou anti-inflamatório (M2), dependendo dos fatores que as modulam. Em um cenário pró-inflamatório, as microglias adquirem um perfil citotóxico e atuam ativamente no combate a patógenos e são nocivas ao tecido. Por outro lado, estas células podem adquirir um fenótipo anti-inflamatório de resolução/recuperação, contribuindo para o reparo e renovação do tecido lesado (FRANCO *et al.*, 1988).

A classificação dicotômica M1/M2, utilizada para categorizar o perfil clássico (M1 – pró-inflamatório) e o perfil alternativo (M2 – anti-inflamatório) de ativação, foi inicialmente

adotada em macrófagos periféricos (DUBBELAAR *et al.*, 2018; MILLS *et al.*, 2000). Essa nomenclatura foi proposta baseando-se na hipótese de que os perfis M1 e M2 eram induzidos por citocinas produzidas por linfócitos Th1 e Th2, respectivamente. Contudo, os linfócitos não são as únicas células que modulam o perfil de ativação de macrófagos/microglias, essa proposta foi descartada conforme a evolução dos estudos e hoje sabe-se que inúmeros sinais como citocinas, quimiocinas e proteínas de membrana, provenientes de diferentes tipos celulares são capazes de modular o perfil de ativação de macrófagos/microglias, inclusive de maneira parácrina/autócrina, controlando a própria ativação (CHERRY, JONATHAN D *et al.*, 2014; FRANCO *et al.*, 2015).

Novas maneiras de caracterizar o perfil de ativação de macrófagos/microglias foram propostas e abrangem uma categorização mais ampla dos perfis de ativação. Pesquisadores observaram que, dependendo da estimulação anti-inflamatória usada para induzir o perfil M2, as células apresentavam fenótipos variados, subdividindo o perfil M2 em M2a, M2b e M2c (FABIAN *et al.*, 2012). Além disso, a heterogeneidade em respostas *in vivo* e análises do transcriptoma em células isoladas têm apontado diferentes assinaturas moleculares que incluem diferentes parâmetros na caracterização dos perfis de ativação de microglias, inserindo subconjuntos que são tecido-específicos e apresentam peculiaridades em diferentes patologias (VAINCHTEIN *et al.*, 2020). Apesar de um amplo avanço no entendimento dos subtipos cada vez mais específicos das microglias em condições de injúria, o termo M1/M2 continua sendo amplamente utilizado como um termo genuíno para considerar a ativação destas células.

Em cada fenótipo, as microglias apresentam uma assinatura molecular que contribui para sua função e modulação da resposta inflamatória no tecido. No fenótipo M1, as microglias expressam moléculas que caracterizam sua função pró-inflamatória, como a síntese de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α) e quimiocinas (CCL5, CCL20, CXCL1) pró-inflamatórias, aumento na expressão de receptores de membrana MHC-II e de enzimas que catalisam reações importantes na resposta inflamatória como óxido nítrico sintase induzida (iNOS ou NOS-2), que aumenta a produção de NO e a enzima ciclooxigenase 2 (COX2), que exacerba a via das prostaglandinas (CHHOR *et al.*, 2013; LAN *et al.*, 2017). Vale ressaltar que este perfil também produz fatores que atuam como indutores do perfil de resolução (M2), permitindo a entrada da fase de resolução da resposta inflamatória.

As microglias com fenótipo M2 (resolução/recuperação) sintetizam marcadores com características anti-inflamatórias, dentre elas as citocinas IL-4, IL-10, TGF β , a quimiocina CCL22, o receptor de manose CD206, e a enzima arginase-1 (ARG-1) (LAN *et al.*, 2017)

(Figura 4). Neste fenótipo, as microglias contribuem para a resolução da resposta inflamatória, com redução do estresse oxidativo, aumento do processo de fagocitose e reparo do tecido. Como citado anteriormente, apesar de uma classificação dicotômica baseada nos marcadores aqui citados, vários estudos propõem diferentes modelos de classificação que diferenciam estes variados fenótipos das microglias de acordo com um conjunto de marcadores específicos (CHHOR *et al.*, 2013), que incluem moléculas intracelulares, moléculas sinalizadoras e proteínas de membrana.

No presente trabalho utilizamos a abordagem clássica (M1/M2), que diferencia os estados de ativação em pró-inflamatório e anti-inflamatório (resolução/recuperação), baseando-se na expressão das enzimas NOS-2 e ARG-1, biomarcadores clássicos dos perfis M1 e M2, respectivamente (CHERRY *et al.*, 2014; MILLS *et al.*, 2000). Estas enzimas competem pelo mesmo substrato, arginina, e dessa forma, os intermediários de cada via inibem a via oposta. O produto da clivagem de arginina pela enzima NOS-2 resulta na produção de óxido nítrico (NO) + citrulina. A ação do NO é bactericida e contribui para a produção de EROs e ERNs, característica de microglias em estado M1. Por outro lado, o produto da clivagem de arginina pela enzima ARG-1 resulta na produção de ornitina + ureia. A ornitina induz o aumento de citocinas anti-inflamatórias como TGF- β e IL-10 e contribui para a formação de poliaminas e prolina, importantes para a regeneração tecidual, características do fenótipo M2.

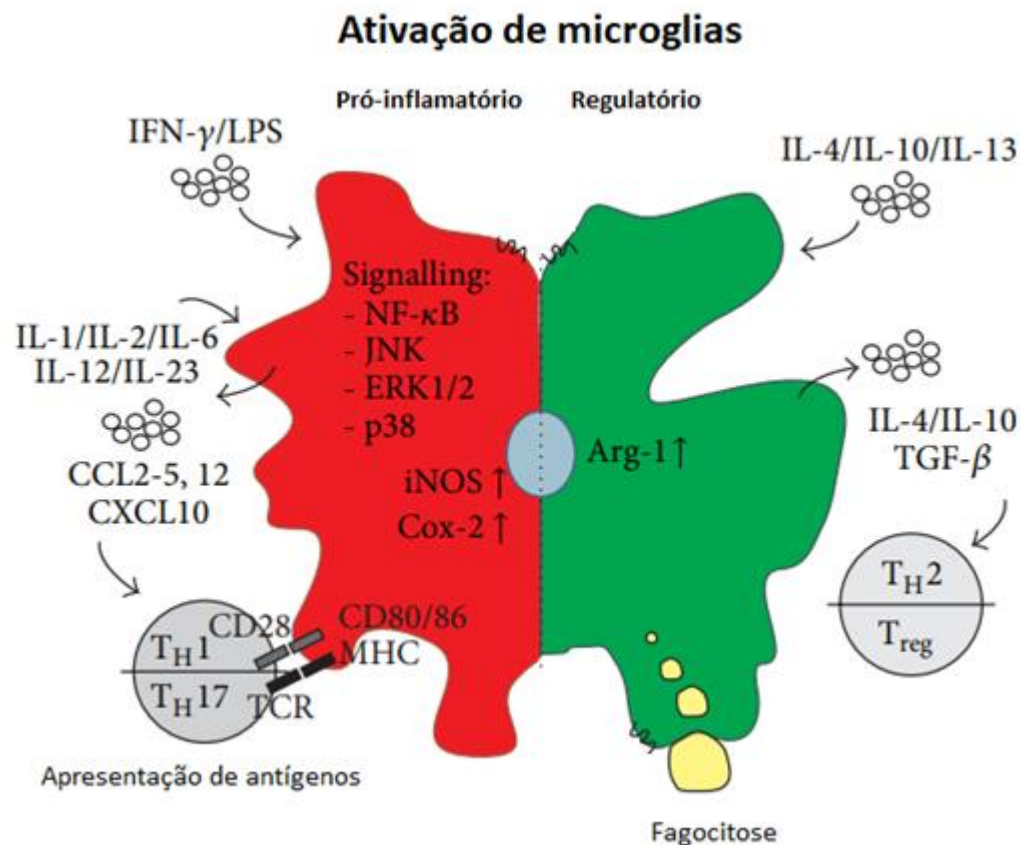


Figura 4 – Fenótipo pró-inflamatório e de resolução/recuperação de microglias ativadas no SNC

- Microglias são ativadas por diversos estímulos, que definem o estado de polarização da célula. Mediadores como IFN- γ /LPS promovem o fenótipo pró-inflamatório, ativando vias de sinalização celular como o fator de transcrição NF- κ B e MAPK (JNK, ERK1/2, p38) (do inglês, *mitogen-activated protein kinase*), que induzem a transcrição de genes pró-inflamatórios. Por outro lado, o estado de resolução/recuperação (regulatório) é induzido por mediadores anti-inflamatórios como IL-4/IL-10 e IL-13, favorecendo a resolução da resposta inflamatória. Microglias em estado pró-inflamatório sintetizam citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-23) e quimiocinas (CCL2-5, 12, CXCL10) pró-inflamatórias e participam da ativação e diferenciação de células T Th1/Th17 patogênicas bem como modulam de maneira autócrina/parácrina a ativação de microglias. Já as microglias em estado regulatório aumentam a fagocitose de mielina, detritos e patógenos, processos importantes para a limpeza do tecido e resolução da resposta inflamatória. Neste estado, as células sintetizam citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10 e TGF- β) que, além de modular a ativação de microglias vizinhas, induzem a diferenciação de linfócitos reguladores Th2/Treg. Microglias regulatórias aumentam a expressão da enzima ARG-1, que induz a síntese de poliaminas, contribuindo para a renovação do tecido e redução da expressão de genes pró-inflamatórios (baseado em Goldmann & Prinz, 2013)

Como um importante fator relacionado ao processo de neuroinflamação, inúmeros estudos foram conduzidos com intuito de regular o processo de polarização de microglias. O papel da melatonina na regulação do perfil de ativação de microglias já é conhecido e vários trabalhos apontam um efeito citoprotetor, que contribui para o fenótipo de

resolução/recuperação (M2). Essa modulação foi observada em vários modelos e diferentes mecanismos foram elucidados. O tratamento com melatonina em linhagens de microglias BV2 reduziu o aumento na expressão das enzimas COX-2 e NOS-2, e da prostaglandina E2 (PGE2) induzida por LPS por meio da supressão de vias de sinalização envolvendo ERK1/2, JNK, p38 MAPKs e NF- κ B (PARK, EUTEUM *et al.*, 2017; YAO *et al.*, 2019). Em estudo realizado *in vivo*, a melatonina inibiu a ativação de microglias no hipocampo de ratos adultos inoculados com *Klebsiella pneumoniae* (bactéria causadora de meningite) (WU *et al.*, 2011) e no córtex pré-frontal de ratos adultos injetados com LPS intraperitoneal no período pós-natal (BERKIKS *et al.*, 2018). Em suma, o tratamento com melatonina é capaz de reduzir o perfil pró-inflamatório de microglias, inibindo vias de sinalização pró-inflamatórias e reduzindo o estresse oxidativo (GAO *et al.*, 2020).

Apesar de evidências que sustentam um efeito anti-inflamatório da melatonina sobre a ativação de microglias, ainda não foi investigado se a produção local de melatonina é capaz de modular o perfil de ativação destas células no local da inflamação, e dessa forma contribuir para a resolução da resposta inflamatória. No presente trabalho, buscamos evidenciar a hipótese de que em uma condição inflamatória local no cerebelo, a melatonina produzida por microglias estaria contribuindo de maneira autócrina/parácrina via receptor regulando a ativação destas células e favorecendo a resolução da resposta inflamatória.

Esta possível modulação local proveniente da produção de melatonina por microglias no cerebelo durante um processo inflamatório é sustentada por estudos que evidenciam o papel da melatonina em modular este processo no cérebro e exercer ação anti-inflamatória em microglias, reforçando o potencial da melatonina em regular a ativação dessas células. Contudo, é importante destacar que os estudos citados e disponíveis na literatura, são conduzidos com melatonina administrada em concentrações farmacológicas e não consideram uma produção endógena de melatonina como apontamos aqui. Portanto, os resultados apresentados no Capítulo 1 evidenciam um mecanismo no qual as microglias são as principais produtoras de melatonina após estímulo com LPS no cerebelo, e que esta produção local regula de maneira autócrina e parácrina a ativação destas células, favorecendo um estado de resolução/recuperação (M2).

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi determinar se a melatonina produzida pelas microglias cerebelares poderia ser um dos sinais causais na progressão de um fenótipo pró-inflamatório (M1) para um fenótipo ligado à finalização da resposta inflamatória e ao reparo do tecido (M2).

Objetivos específicos

1. Estabelecer um modelo de cultura de microglias que permita avaliar a alteração de fenótipo e não apenas o aumento do número de células em um ou outro fenótipo.
2. Demonstrar o efeito da melatonina produzida por microglias sobre a função fagocitária que é relevante no processo de retirada de patógenos e de retirada de debrís celulares
3. Demonstrar que, com o bloqueio dos receptores de melatonina, microglias estimuladas com padrão molecular associado a patógeno, não progridem do estado pró- para o estado anti-inflamatório.

RESULTADOS

Os resultados obtidos para a comprovação da hipótese seguem no CAPÍTULO 1 deste trabalho, em conjunto com resultados anteriormente apresentados na dissertação de Adriessa Aparecida dos Santos (SANTOS, 2015), em artigo científico submetido para publicação no periódico *Journal of Pineal Research* e aguardando indicação dos revisores.

CAPÍTULO 1

Autocrine melatonin effect on activated microglia orchestrates the progression from a Pro-Inflammatory to a Recovery/ Repair Phenotype

Authors' names: Souza, E.S¹., Santos, A.¹, Ribeiro-Paz E. D.¹, Córdoba-Moreno M.¹,Trevizan, I.L.¹,Caldeira W.², Muxel S. M.¹, Sousa, K.S., Markus R.P.^{1*}

RUNNING TITLE: MELATONIN & CEREBELLAR MICROGLIA PHENOTYPES

¹Laboratory of Chronopharmacology, Department of Physiology,

² Microscopy Lab, Department of Genetics and Evolutionary Biology

Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

Contact Information:

Regina P. Markus

Laboratory of Chronopharmacology,

Department of Physiology

Institute of Bioscience, University of São Paulo

Rua do Matão, 323, tv 14, São Paulo, SP

05508-090, Brazil.

e-mail: rmarkus@usp.br

Keywords: Extra-Pineal Melatonin, LPS, cerebellum, Microglia activation, phagocytosis,

O conteúdo apresentado neste capítulo foi submetido para publicação na revista científica *Journal of Pineal Research* no dia 31 de Janeiro de 2021.

Abstract

Microglia, the sentinels of the central nervous system, are the main cells in surveillance and innate immune response. There is a direct relationship between morphology/phenotype and the different functions that microglia exert along an innate-immune response. The mechanism for progression from the proinflammatory to the recovery/repair phenotype is triggered at the beginning of the innate defense response limiting the proinflammatory phase. In this study, we aimed to show that melatonin synthesized at the transition between proinflammatory and anti-inflammatory phases determines activated microglia's progression to recovery/ repair phenotype. We established a mixed rat cerebellar glia culture in which the percentage of activated microglia did not vary significantly with any of the treatments used, and microglia activation and melatonin production were inferred by using pharmacological tools. Total microglia were identified by the expression of CD11b/c, while total activated microglia were positive for IBA-1. The proinflammatory (M1) and the recovery/ repair (M2) phenotypes were distinguished by NOS-2 versus ARG-1 biomarkers, respectively. Minocycline (MINO) and luzindole (LUZ) blocked microglia activation and high-affinity melatonin receptors, respectively. MINO inhibited the expression of NOS-2 and ARG-1 in cultures incubated for 12 hours with LPS, confirming that in our experimental model, the LPS-induced changes in the expression of enzymes that metabolizes L-arginine occurs at the microglia. Finally, we showed that inhibiting the effect of microglia synthesized melatonin with LUZ increases/ decreases LPS-induced NOS-2/ ARG-1, respectively, showing that melatonin induces the progression of microglia from an M1 to an M2 phenotype. In summary, microglia synthesized melatonin is not only relevant for favoring a phagocytic and repair phenotype, but also for orchestrating the timing of an innate immune response.

Introduction

Microglia are nervous system resident macrophages originated from the yolk sac¹. Under baseline conditions, multiple motile processes of stellate microglia (M0) actively monitor the local environment. After stimulation, activated phenotypes (M1, M2) adapted for aggressive, defensive and recovery functions take an amoeboid form^{2, 3}. Microglia response to injuries is stereotyped and its success relies on a proper timing in the progression from M1 to M2. The pro-inflammatory phenotype, characterized by inducing oxidative stress and releasing pro-inflammatory mediators also carried out programs to progress to repair/recovery phenotypes. The defensive (recovery/cleanup) phenotypes are characterized by reduced transcription of pro-oxidative enzymes, such as nitric oxide synthase 2 (NOS-2), and induction of recovery/ repair programs that lead to the cleanup of pathogens, apoptotic/necrotic cells or cell debris, and tissue repair⁴.

Melatonin, N-acetyl-5-methoxytryptamine, well-known as the pineal hormone, is synthesized on demand by activated resident and monocyte derived macrophages⁵⁻⁷. Despite the well documented effect of melatonin as an anti-inflammatory pharmacological tool^{8, 9}, the role of tissue synthesized melatonin as a mediator of innate immune response is still an open question. Mechanistically, the nuclear translocation of the transcription factor kappa B (NFκB), a hallmark of acute inflammatory response, triggers the suppression of pineal melatonin synthesis and the production of melatonin by monocytes/macrophages/natural killer cells¹⁰⁻¹². This switch in melatonin source, is a time fine-tuned event that begins with the activation of the nuclear factor kappa B (NFκB) both in pinealocytes and macrophages, resulting in the suppression of melatonin synthesis in the first and the synthesis of the NFκB subunit cRel in the second. In sequence, the nuclear transfer of cRel-containing NFκB dimers leads to the transcription aryl-alkyl-N-acetyltransferase (*Aa-nat*) code gene⁶. The time interval between the activation of macrophages/ microglia and the synthesis of melatonin, which depends on the conversion of serotonin to N-acetylserotonin by AA-NAT, should determine the duration of the proinflammatory phase, as exogenous melatonin polarizes macrophages and microglia from M1 to M2 phenotypes. Furthermore, melatonin synthesized by alveolar^{5, 13, 14}, colostrals¹², and cell-line macrophages¹¹ increases phagocytosis and decreases tissue injury. In accordance, activation of MT1R melatonin receptor was shown to reduce the transcription of the gene that codifies nitric oxide synthase 2 (NOS-2), and to regulate mitochondrial redox state¹³, conditions that are triggered by pathogens or danger/damage associated molecular patterns (PAMPs and DAMPs).

Injection of lipopolysaccharide (LPS) in rat lateral ventricles induces a significant loss in cortical and hippocampal neurons, but almost no neuronal death in the cerebellum¹⁵. Blocking melatonin receptors prior to LPS injection significantly increases the number or death neurons in the cerebellum, suggesting that melatonin synthesized by cerebellar cells exerts a local neuroprotective effect. This protective effect against LPS was also observed in cerebellar cells in culture¹⁶. Mechanistically, melatonin inhibition of NFκB nuclear translocation impaired LPS-induced NOS-2 transcription reducing oxidative stress¹⁷⁻¹⁹. Now it is well-accepted that melatonin is efficient in inhibiting the pro-inflammatory phase and increasing the efficiency of phagocytosis²⁰.

The highly relevant question, not yet addressed, is whether macrophage/microglia melatonin synthesis during the course of an innate immune response is a key factor for timing the proinflammatory phase. In other words, does melatonin synthesized during an acute inflammatory response is essential for allowing the progression of the response from the anti-inflammatory to the recovery/repair phases? In the present paper we evaluated whether activation of high-affinity G-protein coupled receptors by microglia synthesized melatonin could be an essential step for determining the transition between M1 and M2 microglia phenotypes (Figure 1).

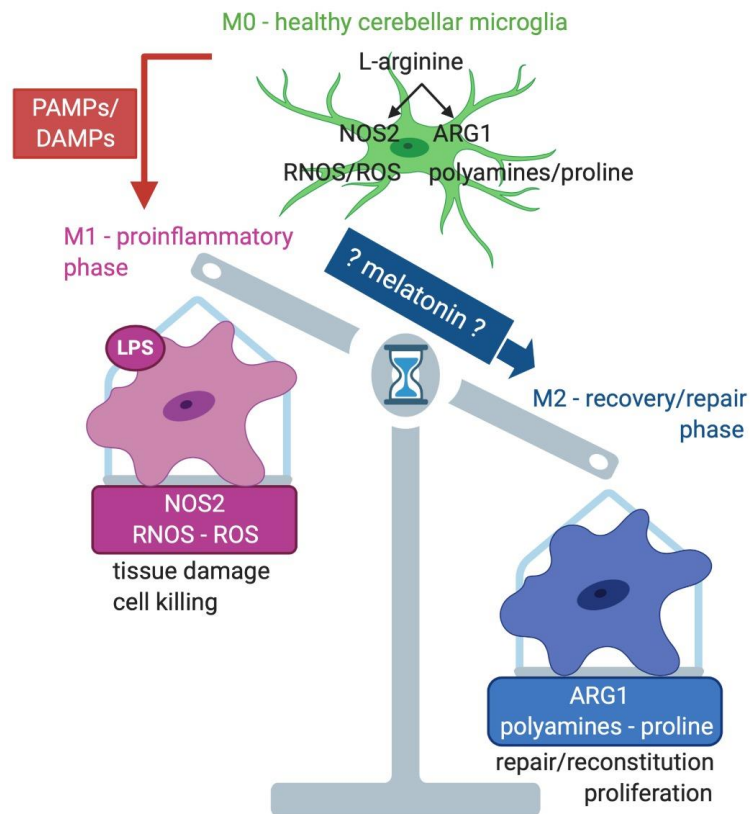


Figure 1 – Working Hypothesis – Surveillance cerebellar microglia metabolize L-arginine via NOS-2 and ARG-1 pathways. The ARG-1 pathway, responsible for surveillance and proliferation, is shared by many cells, while the pathway is unique for cerebellar microglia, which are partially depolarized in healthy NOS-2 conditions²⁷. LPS induces a stereotyped response initiated by microglia activated at the M1 phenotype. Invaders and neighboring cells are killed and the extracellular matrix damaged. This phenotype needs to evolve to enable matrix repair, replacement of injured cells, and phagocytosis of cellular debris and foreign elements (M2 phenotypes). Here we evaluated whether melatonin synthesized by microglia is the key molecule that allows the conversion of M1 to M2.

Material and methods

Animals

Postnatal day (P1 to P5) Wistar rat pups were obtained from the Central Animal Facility of the Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo, Brazil. The experiments were conducted on the same day of weaning. All animal procedures were conducted in accordance with the regulatory standards of the National Council for Control in Animal Experimentation (CONCEA) and were approved by the Animal Use Ethics Commission (CEUA) of the Institute of Biosciences, University of São Paulo (protocol 159/2012, and 198/2014).

Material, Reagents, Drugs and Antibodies

All chemicals and biological material are listed in the supplemental material Table 1.

Cell Culture

Primary mixed glial cell cultures were established from modifications of described methods^{21, 22}. The head of decapitated pups were placed in 70% ethanol, the cerebellum isolated and immersed phosphate buffer saline (1 mL, PBS; 8g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂PO₄) plus 5% of bovine serum albumin (BSA). The meninges were removed, the tissue pricked and the cells dispersed with neural tissue dissociation kit. The homogenate was filtered in a 100 µm cell strainer, centrifuged (400g, 5 min, room temperature, RT), and the cells were resuspended in 2 mL of Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 1% penicillin/streptomycin (pen/strep) and 10% fetal bovine serum (FBS). Cells were seeded in 24-well plates with 2×10^6 cells/well to FlowSight cytometry analysis or in 8-well chamber slides with 5×10^5 cells/well to obtain images in confocal microscopy. The cultures were maintained in 200µL DMEM at 37°C, 5% CO₂ for 7 days with a change of medium on day 5. One hour before treatments the medium was replaced by DMEM without FBS. All the procedure was done in a sterile environment. Viability and cell number were estimated by Trypan blue exclusion.

Enriched microglia cultures used in phagocytosis assay were prepared from the mixed cell cultures maintained for 15 days in 75 cm² cell culture flasks containing DMEM plus 10% FBS and 1% pen/strep. Microglia, isolated by knocking frozen bottles two or three times on the bench, were seeded (10^5 cells/ 200 µL DMEM) in 8-well chamber slides for 7 days (37°C, 5% CO₂). The medium was replaced every 48 hours and 1 hour before the treatments was replaced by DMEM without FBS.

Flowsight cytometry

Mixed cerebellar glial cells were maintained in 24-well plates (2×10^6 cells/well) for 7 days. After experimental procedures, the medium was discarded, 200µL of cold PBS was added to the plate and cells were scraped and placed in 1.5 mL microtubes. The content was centrifuged (400g, 5 min, RT) and the supernatant discarded. Cells were fixed in 150µL PFA (5% in PBS, 15 min) and after centrifugation (400g, 5 min, RT) the pellet was resuspended in 150µL of Triton-X (0.1% in PBS, 15 min) and then in PBS containing BSA (5%). In sequence, cells were incubated 1h at room temperature with anti-CD11b/c PEcy7 conjugated

(1:500) antibody as a microglia biomarker, plus anti-IBA-1 (1:500), anti-NOS-2 (1:500) or anti-ARG-1 (1:500) for identifying total activated, pro-inflammatory or recovery/repair subtypes. Cells were washed 3 times with PBS and incubated 1h with the appropriate secondary antibody, donkey anti-rabbit PercP-Cy5.5 (1:1000) or goat anti-mouse PECy7 (1:1000). In sequence, cells were washed once with PBS and 100 μ L of BSA was added (5% in PBS). Cell nucleus were marked with propidium iodide (PI, 1:10000), added 5 min before sample acquisition. The Samples were acquired using AMNIS[®] FlowSight[®] (Luminex, Austin, TX, USA) flow cytometry and data were analyzed with IDEAS[®] software[®] (Luminex, Austin, TX, USA).

Phenotype Characterization

For cell visualization, mixed glial cells were cultured in 8-well chamber slides (5×10^5 cells/well) for 7 days (as described in Cell culture section). The medium was discarded and cells were fixed with paraformaldehyde (PFA - 5% in PBS, 15 min, RT), permeabilized with Triton-X (0.1% in PBS, 10 min, RT) and blocked with BSA (2% in PBS, 1 h, RT). Microglia and astrocytes were identified with the antibodies anti-CD11b FITC (1:1000), and anti-GFAP AF488 (1:2000), incubated for 1h at RT followed by 3 washes with PBS. The slides were then fixed with Mounting Medium with DAPI and images were captured using the LSM 880 confocal microscope Axio Observer equipped with a 20x EC Plan-Neofluar objective. For excitation of the FITC and AF488 fluorophores (green) was used a 488nm laser with 528nm emission and for DAPI excitation (blue) was used a 543nm laser with 638nm emission.

Microglial phenotypes and percentage in mixed glial cell cultures were determined by FlowSight cytometry analysis. Microglia was identified as nucleated (PI⁺, propidium iodide)/CD11b/c⁺ cells population and represents 3 – 10% from total single cells acquired (Supplemental Figure 1). Microglia activation and phenotypes were addressed by evaluating the protein expression of IBA-1 (all activated), NOS-2 (M1) and ARG-1 (M2) after treatment with LPS (100ng/mL) or LPS plus MINO (300 μ M). Control groups were incubated with MINO or vehicle (medium). After experimental procedures the samples were prepared to FlowSight cytometry analysis (as described in FlowSight cytometry section). The protein expression of the microglia activation biomarkers (IBA-1, NOS-2 and ARG-1) was determined based on the mean fluorescence intensity emitted by each of them in PI⁺/CD11b/c⁺ cells.

Phagocytosis Assay

The phagocytosis of zymosan by microglia was determined by FlowSight cytometry in mixed glial cell cultures. The cultures were maintained in 24-well plates for 7 days. Cells were incubated with zymosan conjugated with Alexa Fluor 488 (10^5 particles/well, 75 min) with or without MINO (300 μ M) incubated for 1 hour before zymosan. Phagocytic activity was determined from the mean fluorescence intensity emitted by zymosan particles conjugated to AF488 in PI⁺/CD11b/c⁺ cell population.

The effect of melatonin and luzindole on the phagocytic capacity of microglia was determined in microglia enriched cultures incubated with zymosan conjugated with AF594 in 8-well chamber slides (10^5 particles/well) for 75 min. Cultures were incubated with melatonin (0 – 100 nM) or luzindole (0 – 1000 nM) for 30 min before zymosan addition. Cells were fixed with acetone and methanol (1:1, 15 min, RT) and the slides were analyzed using LSM 510 confocal microscope using a 63x objective lens with water immersion. Fluorescent zymosan was excited with HeNe 543 laser, and the fluorescence emission measured at 560-615nm. Photographs were taken randomly from four fields in each well with a resolution of 1024 x 1024 pixels with fixed parameters (pinhole, scanning speed and laser power). As a counting criterion, cells that phagocytized one or more zymosan particles were adopted.

Characterizing the relevance of microglia melatonin for the transition from M1 to M2 phenotype

Cells were cultured in 24-wells plates and maintained for 7 days before treatments. The cells were incubated with luzindole (100 nM) for 1h and LPS (100 ng/ mL) was then added and maintained for 12h. After experimental procedures the samples were prepared to FlowSight cytometry analysis (as described in Flowsight cytometry section). Samples were acquired using Amnis[®] FlowSight[®] flow cytometry (Luminex, Austin, TX, USA) and data were analyzed with IDEAS[®] software.

Statistical Analysis

All the numbers shown refer to individual cultures means and not isolated replicates. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 9.0 software. Independent variables are presented as box plot whiskers (10% - 90%), and dependent variables (time-dependent) are presented as the mean \pm SEM, these data were compared by fitting the data to non-linear regressions and the goodness of fitting was tested by ANOVA. Differences between

independent variables were evaluated by Kolmogorov-Smirnov or ANOVA for nonparametric values, followed by the Mann-Whitney or Kruskal-Wallis/Dunn's tests.

Results

Microglia Phenotypes in LPS-12h Primary Mixed Cerebellar Glia Cell Cultures

Confocal images confirm the presence of astrocytes (GFAP⁺) and microglia (CD11b/c⁺) in naïve cultures. Microglia presents phyllopod and are much smaller than astrocytes (Figure 2A). The sorting of the cells from mixed cultures in a FACS cytometer showed that 3-10% of the cells in each culture are marked CD11b/c⁺ (Figure 2B). It is highly relevant that the percentage of these cells that represent the microglia did not change after 12 hours in culture (vehicle) or in the presence of LPS (100 ng/mL) or the drugs that blocks microglia activation (minocycline^{23, 24}) or melatonin receptor (luzindole²⁵). Therefore, any change observed in microglia phenotype should not be attributed to cell proliferation or death, it should be considered as a result of the progression from one to another phenotype.

The time-course of LPS-induced microglia activation was followed by the expression of IBA-1 in cultures treated or not with minocycline (Figure 2B). The time-intervals analyzed were after the peak of the pro-inflammatory response. The phenotype of activated microglia (IBA-1) after 12 hours of incubation with LPS (100 ng/ mL, LPS-12h) was characterized by enzymes that metabolizes L-arginine, NOS-2 and ARG-1 (Figure 2C). Minocycline significantly reduced the expression of NOS-2, confirming that NOS-2 is expressed in basal (non-activated) cerebellar microglia ^{16, 26} (Figure 2D). The M2 microglia phenotype was evaluated by determining the expression of ARG-1, which was reduced by blocking microglia activation.

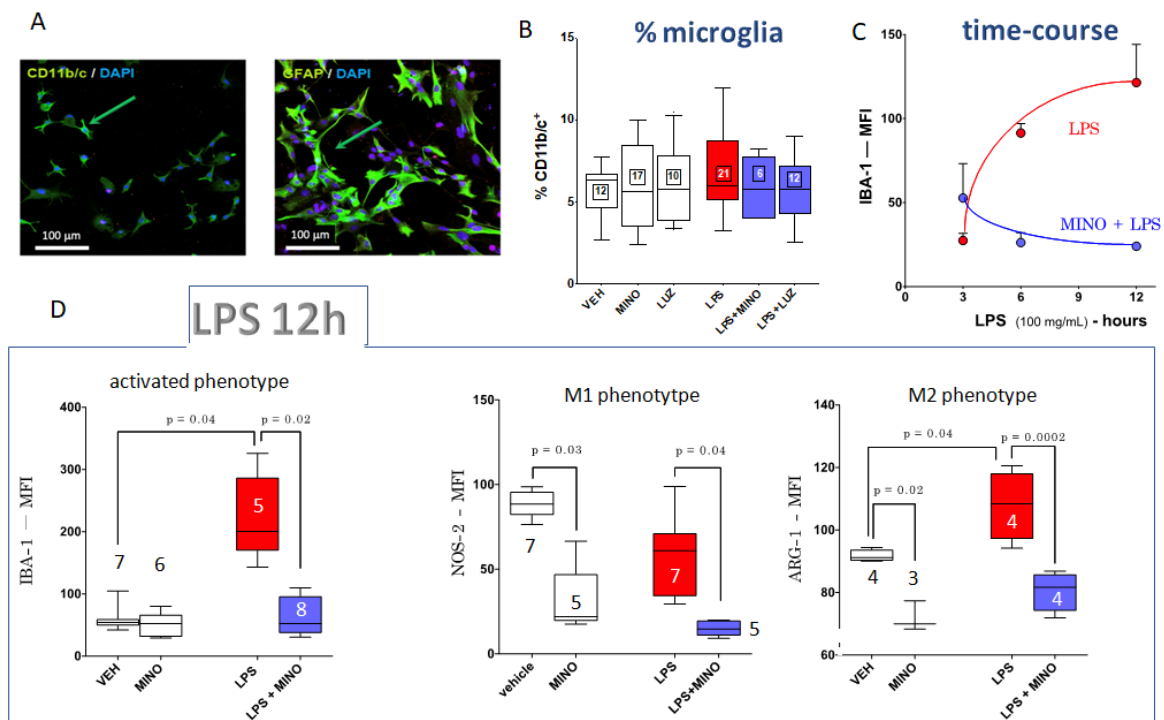


Figure 2 – Characterization of the Experimental Model: primary mixed cerebellar glial cell culture – (A) confocal micrograph highlighting the presence of microglia (CD11b/c⁺) and astroglia (GFAP⁺). (B) The percentage of microglia was maintained independently of the treatments. (C) Time-course (3 - 12 h) of LPS (100 ng/mL)- induced microglia activation (IBA-1 expression). IBA-1 marks any activated phenotype. It is noteworthy that the proinflammatory phase (NOS-2 peak) occurred after three hours. (D) 12 hours after LPS, the inhibition of microglia activation by minocycline (MINO) blocks the induction of NOS-2 and ARG-1 expression. Data are shown as medians in box and whiskers (percentiles 10-90%). Data were tested by the Kruskal-Wallis Multiple Comparison test. The number of independent cultures and the probability of rejecting a null hypothesis is in the graph. VEH (vehicle), MINO (minocycline 300 μ M), LPS (lipopolysaccharide, 100 ng/mL).

Autocrine Melatonin increases microglia phagocytic efficiency

First, it was observed that microglia from mixed cerebellar cell cultures phagocytose zymosan (75 min, 100.000 particles) (Figure 3A). In cultures enriched for microglia exogenous melatonin increased, in a dose-dependent manner, the number of particles inside the cells, and luzindole, the competitive antagonist of melatonin receptors, blocked the entry of these particles (Figure 3B). Indeed, it was already shown that activation of zymosan recognition receptors (TLR2/TLR6) triggers melatonin synthesis in macrophages and dendritic cells²⁷. Therefore, in our experimental condition, microglia synthesized melatonin should be responsible for modulating the phagocytic activity of cerebellar microglia. Reinforcing this conclusion, the pKi value for luzindole (8.15 ± 0.20) was in the range accepted for blocking MT2 melatonin receptor²⁸.

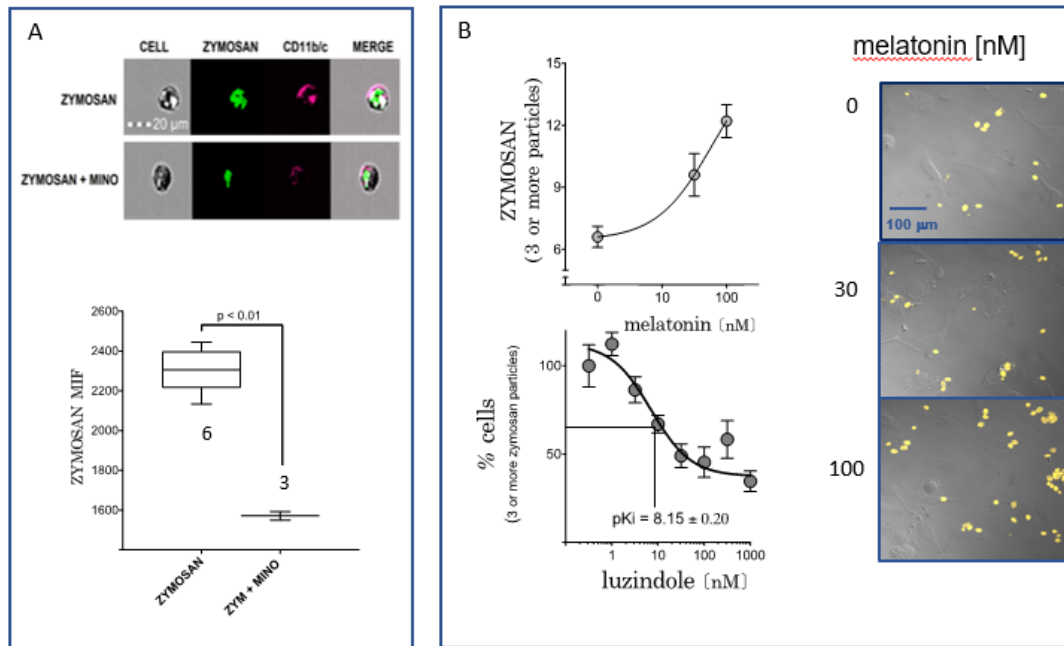


Figure 3 - Autocrine melatonin enhances the phagocytosis of zymosan particles. (A) Phagocytosis of zymosan (10^5 particles/well, 1h) by activated microglia (CD11 b/c⁺) is blocked by minocycline (MINO 300 μM) incubated 1h before zymosan. Number of independent cultures is shown in the graph. Data are shown as median in box and whiskers (percentiles 10-90%), and the difference between means was determined by Student's "t" test. (B) Phagocytosis of fluorescent zymosan particles (10^5 particles/well, 75 min) by enriched microglia cultures visualized by confocal microscopy. Incubation of exogenous melatonin potentiated, while the blockage of melatonin high-affinity G protein coupled receptors with luzindole inhibited zymosan uptake. Thus, microglia synthesized melatonin potentiates microglia phagocytosis. Data are shown as mean +/- s.e.m. of 5 independent cultures in the upper graph and 5-12 in the lower one. Data were fitted to a sigmoidal curve by the least square method.

Microglia-synthesized melatonin is a key player in phenotype transition

The results shown in figure 3 confirmed that melatonin synthesized before the arrival at the M2 phenotype is essential for the progression from M1 to M2. The blockage of melatonin receptors with luzindole increased the presence of microglia that express NOS-2 (M1) and reduces the ones that express ARG-1 (M2) (Figure 3). It is noteworthy that the expression of IBA-1 that occurs both in M1 and M2 cells is increased by LPS and only marginally inhibited by luzindole (tested significantly only when both means were compared by Kolmogorov-Smirnov test). Therefore, our data show that melatonin synthesized by microglia "in vitro" is a key factor in the polarization of microglia from the pro-inflammatory to the recovery/repair.

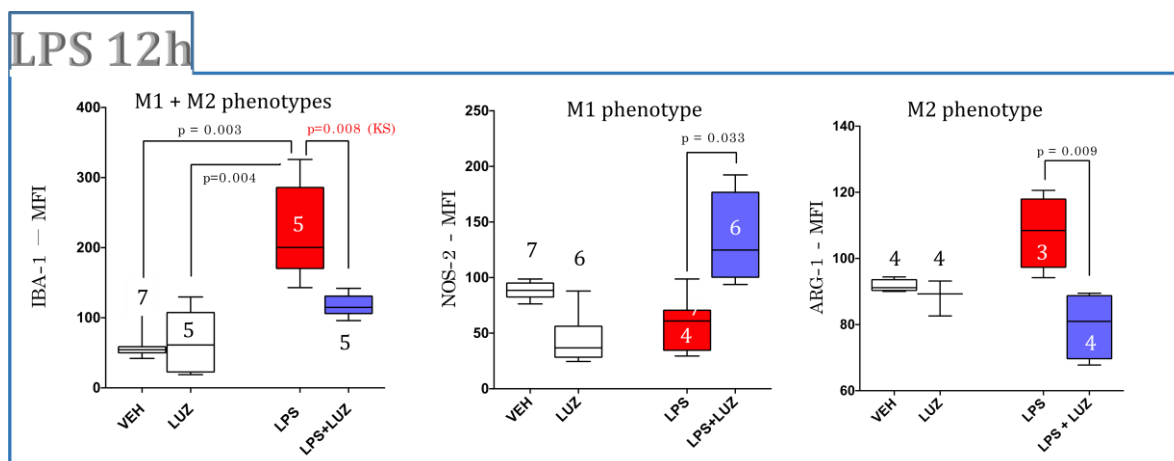


Figure 4 – Melatonin and the transition between M1 to M2 phenotype. Mix cerebellar glial cell cultures were incubated with luzindole (LUZ, 100 nM) for one hour before a stimulus of 12 hours with LPS (100 ng/ mL). Microglia were identified with the biomarker CD11b/c⁺. LPS leads to a significant increase in activated microglia (IBA-1 biomarker). Blocking melatonin receptors with luzindole increases M1 (NOS-2 biomarker) and reduces M2 phenotype (ARG-1 biomarker), indicating that microglia did not progress from a proinflammatory to a recovery/ repair phenotype. Data were plotted as box and whiskers (10 – 90%). Probability of rejecting the null hypothesis was determined by Kruskal-Wallis followed by Dunn’s multiple comparisons test. The pair LPS versus LPS + LUZ was not significantly different when the non-parametric ANOVA was applied, and the Kolmogorov-Smirnov test obtained the probability shown in the figure. Number of independent cultures are shown in the figure.

Discussion

Microglia continuously survey brain parenchyma with highly motile processes and actin-dependent filopodia²⁹. In response to PAMPs and DAMPs stellate shape resident microglia polarize into ameboid cells that migrate to the epicenter of the injury initiating a tailored and fine-tuned defense response (Figure 1). Phagocytosis in macrophages promotes a metabolic shift that upregulates glycolysis and reduces oxidative phosphorylation³⁰ contributing to recovery after traumatic brain injury^{31, 32}. Microglia located far from the lesioned area may assume defense phenotypes in order to restrict the propagation of damages generated by the microglia at the proinflammatory phenotype^{3, 29}. The temporal time-course of the whole process is strictly controlled by loops of inducing/repressing gene expression and protein synthesis^{33, 34}. An interesting example is that after local brain ischemia the expression of molecules responsible for phagocytosis are delayed by 2-3 days, corresponding to the resolution phase of inflammation³⁵.

Exogenous melatonin is known to polarize microglia to resolution phenotypes^{36, 37}. Treatment with melatonin has already shown beneficial effects, such as inhibition of proinflammatory cytokines expression in the hippocampus of mice inoculated with *Klebsiella*

*pneumonia*³⁷. In rats, melatonin inhibits the induction of TNF and NO in cortical microglia of rats injected with LPS³⁸. Melatonin also plays a role in modulating macrophage/ microglia phagocytic activity. We have previously shown that the expression of the molecule that mediates the entry of fungi in macrophages and dendritic cells, dectin-1, is mediated activation of melatonin MT2 receptors^{12, 39}, and that macrophage synthesized melatonin potentiates zymosan phagocytosis in human colostral monocytes⁴⁰, RAW 264-7 macrophage cell line^{11, 12} and rat alveolar macrophages⁵.

Here we evaluated the progression of microglia phenotypes by recording the effect of 12 hours of LPS stimulation. The pro-inflammatory and recovery phenotypes were distinguished according to the expression of IBA-1, NOS-2, and ARG-1. IBA-1 participates in the membrane ruffling and phagocytosis of activated microglia by interacting with F-actin⁴¹, thus, its expression did not differentiate between M1 and M2 phenotypes^{42, 43}. NOS-2 is the hallmark of inflammatory responses, as converts arginine into citrulline and NO, leading to oxidative stress⁴⁴. ARG-1, the last enzyme in the urea cycle, converts arginine into urea and ornithine, contributing to the synthesis of polyamines and proline, essential for collagen formation and tissue repair⁴⁵. ARG-1 shows positive relation with neuroprotection⁴⁶.

Interestingly, even after 12 hours of LPS, the blockage of melatonin receptors maintains microglia in the proinflammatory phenotype, strongly suggesting that for the progression of M1 to M2 phenotype the microglia synthesized melatonin acts in an autocrine manner, activating high-affinity melatonin receptors located in the same cell. Mechanistically, LPS-induced activation of toll-like receptor 4 (TLR4) promotes the nuclear translocation of the NFκB dimer p50/RelA, which besides regulating the transcription of genes directly involved in the pro-inflammatory phase, leads to the transcription of the gene that codifies the NFκB subunit cRel. This subunit that is not expressed constitutively, forms a dimer with RelA. The dimer cRel/RelA binds to NFκB elements in the promoter of *Aanat*, inducing its transcription^{11, 12}. Inhibition of microglia activation^{11, 12} with minocycline blocks NFκB nuclear translocation²³. AA-NAT is the enzyme that converts serotonin in N-acetylserotonin, the direct precursor of melatonin, which triggers its high-affinity G-protein coupled receptor switching L-arginine metabolism from citrulline/NO to polyamines/proline. Closing the cycle, the pKi value for luzindole (Figure 3B) points to an MT2 receptor mediation, the same melatonin receptor subtype responsible for the expression of dectin-1, the membrane binding site for internalization of zymosan¹². Thus, melatonin synthesized at the transition between M1 and M2 phenotypes is essential for increasing the availability of molecules necessary for tissue repair and the expression of receptors essential for phagocytosis (Figure 5). This work

opens a new perspective for understanding the role of microglia melatonin and for improving the mechanistic-based search and timing of pharmacological melatonergic drugs.

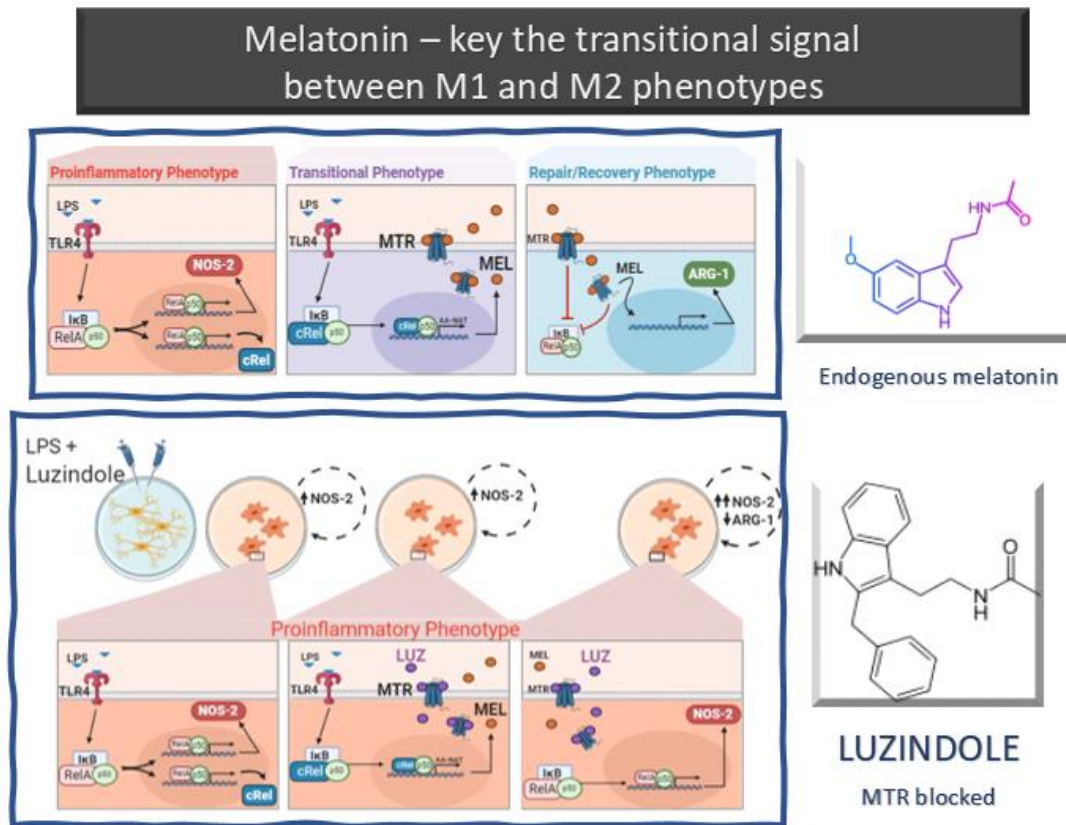


Figure 5 - Cerebellar microglia melatonin is a key element in the transition between proinflammatory (M1) and recovery/ repair phenotypes (M2). Upper Panel - THE HYPOTHESIS: The effect of microglia synthesized melatonin is highlighted. Activation of TLR4 receptors by LPS leads to the nuclear translocation of NFκB dimer p50/RelA, which promotes not only the transcription of genes that code proinflammatory proteins but also the NFκB subunit cREL. NOS-2, here used as a biomarker of the proinflammatory response, is among the first transcribed proteins. As the response progresses, the dimer p50/ cRel translocates to the nucleus and leads to the transcription of proteins involved in the recovery/repair phase. AA-NAT, a key enzyme in melatonin synthesis, is one of these proteins. In sequence, melatonin activates high-affinity G-protein coupled melatonin receptors leading to the synthesis of ARG-1, a biomarker of M2. To test this hypothesis, melatonin receptors were blocked with the non-selective competitive antagonist - luzindole. **Lower Panel: Microglia melatonin is a key signal in the transition between M1 and M2 microglia phenotypes.** Blocking melatonin receptors microglia are kept at M1 phenotype, and the inflammatory response is not solved. Here we show for the first time that microglia melatonin synthesis is essential for the progression of M1 to M2 phenotype. Therefore, if melatonin is not synthesized or their receptors are not expressed, no resolution of the inflammatory response will occur.

Authorship

RPM: Conceived the study. ESS and RPM: Designed the study. RPM provided essential resources for the study. ESS, AS, EDRP, MCM, ILT, WC and SMM performed experiments and processed the data. ESS, KSS and RPM performed the formal analysis of the data. ESS, AS, KS and RPM interpreted the data. KSS and RPM prepared the figures. ESS, ILT, KSS and RPM wrote the manuscript. All authors edited, revised and approved the final version of the manuscript to be sent to the Journal of Pineal Research.

Acknowledgments

This study was supported by research grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2013/13691-1) and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 480097/2013-5) to RPM. KSS is a graduate fellow of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 140274/2018-9). ESS, AS, EDRP, MCM, ILT and KSS are graduate fellows of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – finance code 001). The technical assistance of Debora Aparecida Moura (technical fellow of CNPq) is gratefully acknowledged.

Conflict of interest statement:

The authors declare no competing interests.

Supplementary material

Figure 1

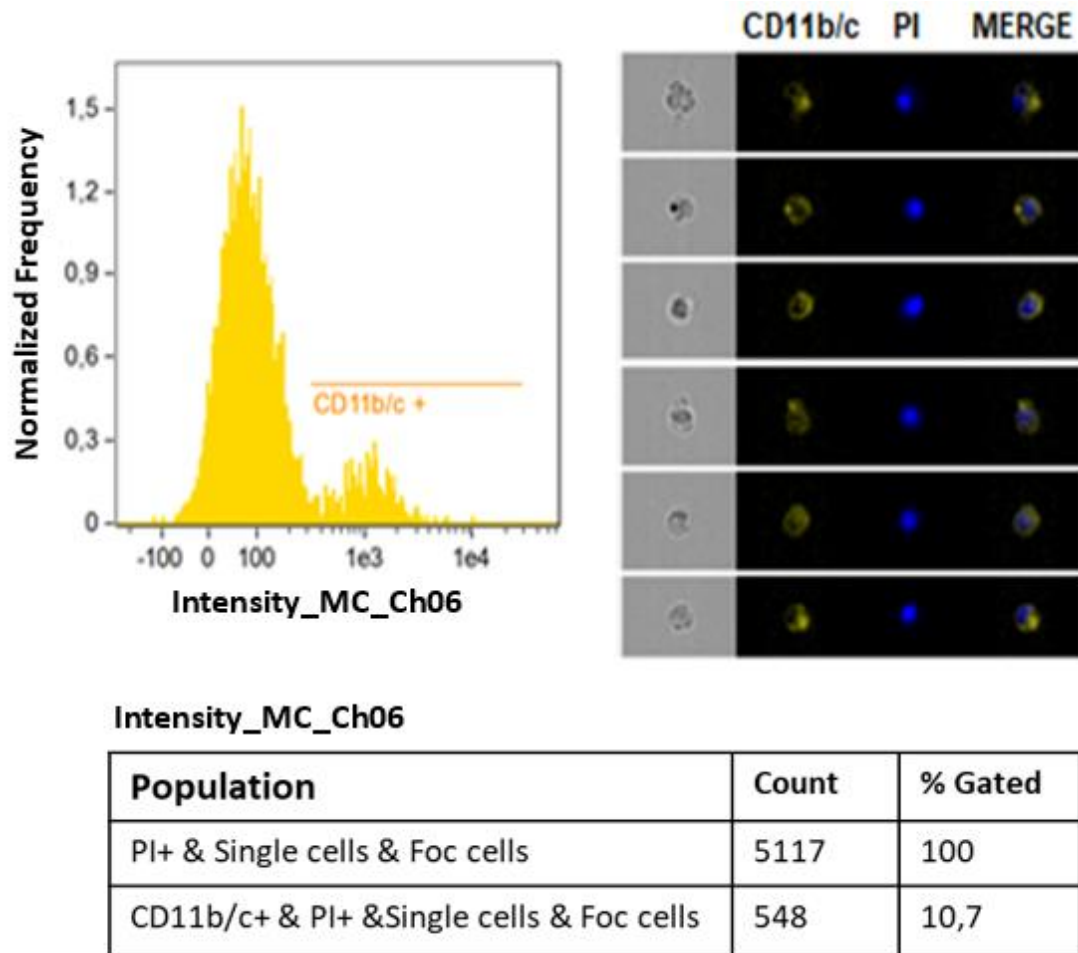


Figure 1 – Representative histogram and microphotographs obtained by Flowsight cytometry. Histogram of a selected sample showing 10.7% of CD11b/c⁺ cells gated from cells marked with nucleus (PI⁺/CD11b/c⁺). All analysis in Flowsight cytometry were performed according to this template. Microphotographs show cells (left column) expressing CD11b/c (green emission), PI (blue emission) and overlapping channels (MERGE).

Table 1

PRODUCT	SUPPLIER	CATALOG #
Culture PLATES AND SLIDES		
cell strainer	BD Falcon®, New Jersey, USA	352360
75 cm ² Cell culture Flask	Nest Biotech Co., Ltda, Jiangsu, China.	708011
24-well plates	Nest Biotech Co., Ltda, Jiangsu, China.	702011
8-well chamber slides	Millicell® EZ slide, Merck KGaA, Darmstadt, Germany	PEZGS0816
CHEMICALS, MEDIUM		
Ethanol		
Sodium Chloride (NaCl)	Labsynth, São Paulo, BR	C1060.01.AH
Potassium Chloride (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Germany,	1049361000
Anhydrous disodium hydrogen phosphate (Na ₂ HPO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt, Germany,	1065861000
Potassium dihydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt, Germany,	1048771000
bovine serum albumin BSA -	Merck KGaA, Darmstadt, Germany,	9048-46-8
neural tissue dissociation kit	Mytiltenyi Bergisch Gladbach, Germany	130-094802
paraformaldehyde, PFA	Labsynth, São Paulo, BR	P1005.01.AH
Triton-X	AMRESCO®, VWR Life Sciences, Pensilvania, USA	97062-208
Acetone	Labsynth, São Paulo, BR	A1017.01.BJ
Methanol	Labsynth, São Paulo, BR	A1085.01.BJ
Dulbecco's modified Eagle's medium DMEM	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA	12100-046
penicillin/streptomycin, pen/strep	Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA	15070-063
fetal bovine serum, FBS	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA	10437028
DRUGS		
Trypan blue	Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA	15250-061
Lipopolysaccharides from Escherichia coli, LPS	O127:B8, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA	97-473-0
Minocycline hydrochloride	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA	13614-98-7
Melatonin	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA	M5250
Luzindole	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA	117946-91-5
ANTIBODIES AND FLUORESCENT MARKERS		
Mounting Medium with DAPI - Aqueous, Fluoroshield	Abcam, Cambridge, England	Ab104139
Propidium Iodid, PI	Molecular probes, Invitrogen, Oregon, USA	P3566
anti-CD11b FITC	BD Biosciences, New Jersey, USA	554982
anti-CFAP AF488	Biologend, San Diego, CA, USA	644704
Anti-CD11b/c PEcy7 conjugated	Biologend, San Diego, CA, USA	201818
Anti-IBA-1	Immunny, Campinas, SP, Brazil	IM0565
Anti-NOS2	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA	SC651
Anti-ARG-1	Biologend, San Diego, CA, USA	678862
Donkey Anti-Rabbit PercP-Cy5.5	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA	SC45106
Goat Anti-Mouse PEcy7	Biologend, San Diego, CA, USA	405315
Zymosan A from Saccharomyces cerevisiae	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA	58856-93-2
Zymosan conjugated with Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA	Z23373
EQUIPMENT AND SOFTWARES		
Amnis® FlowSight® flow cytometry	Luminex, Austin, TEXAS, USA	
IDEAS® software	Luminex, Austin, TEXAS, USA	
LSM 880 confocal microscope Axio Observer	Zeiss Microscopy, Jena, Germany	
LSM 510 confocal microscope	Zeiss Microscopy, Jena, Germany	
GraphPad Prism 9.0 software	Graphpad, San Diego, California, USA	

References

1. Colton CA. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *Journal of neuroimmune pharmacology*. 2009;4(4):399-418.
2. Stence N, Waite M, Dailey ME. Dynamics of microglial activation: A confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia*. 2001;33(3):256-266.
3. Hanisch UK. Functional diversity of microglia - how heterogeneous are they to begin with? *Front Cell Neurosci*. 2013;7:65. doi:10.3389/fncel.2013.00065
4. Grabert K, Michoel T, Karavolos MH, et al. Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nat Neurosci*. Mar 2016;19(3):504-16. doi:10.1038/nn.4222
5. Carvalho-Sousa CE, Pereira EP, Kinker GS, et al. Immune-pineal axis protects rat lungs exposed to polluted air. *J Pineal Res*. Apr 2020;68(3):e12636. doi:10.1111/jpi.12636
6. Markus RP, Cecon E, Pires-Lapa MA. 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*. 2013;14(6):10979-10997.
7. Boutin JA, Witt-Enderby PA, Sotriffer C, Zlotos DP. Melatonin receptor ligands: A pharmaco-chemical perspective. *J Pineal Res*. Oct 2020;69(3):e12672. doi:10.1111/jpi.12672
8. Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological actions of melatonin in acute and chronic inflammation. *Curr Top Med Chem*. Feb 2002;2(2):153-65. doi:10.2174/1568026023394425
9. Hardeland R. Melatonin and inflammation-Story of a double-edged blade. *J Pineal Res*. Nov 2018;65(4):e12525. doi:10.1111/jpi.12525
10. Finocchiaro LM, Arzt ES, Fernandez-Castelo S, Criscuolo M, Finkielman S, Nahmod VE. Serotonin and melatonin synthesis in peripheral blood mononuclear cells: stimulation by interferon-gamma as part of an immunomodulatory pathway. *J Interferon Res*. Dec 1988;8(6):705-16. doi:10.1089/jir.1988.8.705
11. Muxel SM, Pires-Lapa MA, Monteiro AW, et al. NF-kappaB drives the synthesis of melatonin in RAW 264.7 macrophages by inducing the transcription of the arylalkylamine-N-acetyltransferase (AA-NAT) gene. *PLoS One*. 2012;7(12):e52010. doi:10.1371/journal.pone.0052010
12. Pires-Lapa MA, Tamura EK, Salustiano EM, Markus RP. Melatonin synthesis in human colostrum mononuclear cells enhances dectin-1-mediated phagocytosis by mononuclear cells. *J Pineal Res*. Oct 2013;55(3):240-6. doi:10.1111/jpi.12066
13. Gao J, Su G, Liu J, et al. Mechanisms of Inhibition of Excessive Microglial Activation by Melatonin. *J Mol Neurosci*. Aug 2020;70(8):1229-1236. doi:10.1007/s12031-020-01531-w
14. Zhang Y, Liu Z, Zhang W, et al. Melatonin improves functional recovery in female rats after acute spinal cord injury by modulating polarization of spinal microglial/macrophages. *J Neurosci Res*. Jul 2019;97(7):733-743. doi:10.1002/jnr.24409

15. Pinato L, da Silveira Cruz-Machado S, Franco DG, et al. Selective protection of the cerebellum against intracerebroventricular LPS is mediated by local melatonin synthesis. *Brain Struct Funct*. Mar 2015;220(2):827-40. doi:10.1007/s00429-013-0686-4
16. Franco DG, Markus RP. The cellular state determines the effect of melatonin on the survival of mixed cerebellar cell culture. *PLoS One*. 2014;9(9):e106332. doi:10.1371/journal.pone.0106332
17. Bruck R, Aeed H, Avni Y, et al. Melatonin inhibits nuclear factor kappa B activation and oxidative stress and protects against thioacetamide induced liver damage in rats. *J Hepatol*. Jan 2004;40(1):86-93. doi:10.1016/s0168-8278(03)00504-x
18. Gilad E, Wong HR, Zingarelli B, et al. Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFkappaB activation. *FASEB J*. Jun 1998;12(9):685-93. doi:10.1096/fasebj.12.9.685
19. Shi D, Xiao X, Wang J, et al. Melatonin suppresses proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated CRL1999 cells via targeting MAPK, NF-kappaB, c/EBPbeta, and p300 signaling. *J Pineal Res*. Sep 2012;53(2):154-65. doi:10.1111/j.1600-079X.2012.00982.x
20. Hu L, Zhang S, Wen H, et al. Melatonin decreases M1 polarization via attenuating mitochondrial oxidative damage depending on UCP2 pathway in prorenin-treated microglia. *PLoS One*. 2019;14(2):e0212138. doi:10.1371/journal.pone.0212138
21. Mecha M, Iñigo PM, Mestre L, Hernangómez M, Borrell J, Guaza C. An easy and fast way to obtain a high number of glial cells from rat cerebral tissue: A beginners approach. *Protocol Exchange*. 2011;218:1038.
22. Tamashiro TT, Dalgard CL, Byrnes KR. Primary microglia isolation from mixed glial cell cultures of neonatal rat brain tissue. *J Vis Exp*. Aug 15 2012;(66):e3814. doi:10.3791/3814
23. Kobayashi K, Imagama S, Ohgomori T, et al. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death Dis*. Mar 7 2013;4:e525. doi:10.1038/cddis.2013.54
24. Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinänen R, Koistinaho J. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *Journal of Neuroscience*. 2001;21(8):2580-2588.
25. Dubocovich ML. Luzindole (N-0774): a novel melatonin receptor antagonist. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1988;246(3):902-910.
26. Kaltschmidt B, Widera D, Kaltschmidt C. Signaling via NF-kappaB in the nervous system. *Biochim Biophys Acta*. Sep 30 2005;1745(3):287-99. doi:10.1016/j.bbamcr.2005.05.009
27. Markus RP, Fernandes PA, Kinker GS, da Silveira Cruz-Machado S, Marcola M. Immune-pineal axis - acute inflammatory responses coordinate melatonin synthesis by pinealocytes and phagocytes. *Br J Pharmacol*. Aug 2018;175(16):3239-3250. doi:10.1111/bph.14083

28. Jockers R, Delagrangé P, Dubocovich ML, et al. Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20. *Br J Pharmacol*. Sep 2016;173(18):2702-25. doi:10.1111/bph.13536
29. Bernier LP, Bohlen CJ, York EM, et al. Nanoscale Surveillance of the Brain by Microglia via cAMP-Regulated Filopodia. *Cell Rep*. Jun 4 2019;27(10):2895-2908 e4. doi:10.1016/j.celrep.2019.05.010
30. Morioka S, Perry JSA, Raymond MH, et al. Efferocytosis induces a novel SLC program to promote glucose uptake and lactate release. *Nature*. Nov 2018;563(7733):714-718. doi:10.1038/s41586-018-0735-5
31. Donat CK, Scott G, Gentleman SM, Sastre M. Microglial Activation in Traumatic Brain Injury. *Front Aging Neurosci*. 2017;9:208. doi:10.3389/fnagi.2017.00208
32. Loane DJ, Kumar A. Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Exp Neurol*. Jan 2016;275 Pt 3:316-327. doi:10.1016/j.expneurol.2015.08.018
33. Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation*. Jun 3 2014;11:98. doi:10.1186/1742-2094-11-98
34. Franco R, Fernandez-Suarez D. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog Neurobiol*. Aug 2015;131:65-86. doi:10.1016/j.pneurobio.2015.05.003
35. Neher JJ, Emmrich JV, Fricker M, Mander PK, Théry C, Brown GC. Phagocytosis executes delayed neuronal death after focal brain ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(43):E4098-E4107.
36. Park E, Chun HS. Melatonin Attenuates Manganese and Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Activation of BV2 Microglia. *Neurochem Res*. Feb 2017;42(2):656-666. doi:10.1007/s11064-016-2122-7
37. Wu UI, Mai FD, Sheu JN, et al. Melatonin inhibits microglial activation, reduces pro-inflammatory cytokine levels, and rescues hippocampal neurons of adult rats with acute *Klebsiella pneumoniae* meningitis. *J Pineal Res*. Mar 2011;50(2):159-70. doi:10.1111/j.1600-079X.2010.00825.x
38. Berkikis I, Benmhammed H, Mesfioui A, et al. Postnatal melatonin treatment protects against affective disorders induced by early-life immune stimulation by reducing the microglia cell activation and oxidative stress. *Int J Neurosci*. Jun 2018;128(6):495-504. doi:10.1080/00207454.2017.1398156
39. Pires-Lapa MA, Koga MM, da Silva Jr IA, Filgueiras LR, Jancar S. Leukotriene B4 modulation of murine dendritic cells affects adaptive immunity. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2019;141:34-39.
40. Pontes GN, Cardoso EC, Carneiro-Sampaio MM, Markus RP. Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) - melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. *J Pineal Res*. Sep 2006;41(2):136-41. doi:10.1111/j.1600-079X.2006.00345.x

41. Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem.* Feb 2004;88(4):844-56. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.02213.x
42. Chhor V, Le Charpentier T, Lebon S, et al. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain Behav Immun.* Aug 2013;32:70-85. doi:10.1016/j.bbi.2013.02.005
43. Hoogland ICM, Westhoff D, Engelen-Lee JY, et al. Microglial Activation After Systemic Stimulation With Lipopolysaccharide and Escherichia coli. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:110. doi:10.3389/fncel.2018.00110
44. Lee M, Rey K, Besler K, Wang C, Choy J. Immunobiology of Nitric Oxide and Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase. *Results Probl Cell Differ.* 2017;62:181-207. doi:10.1007/978-3-319-54090-0_8
45. Caldwell RW, Rodriguez PC, Toque HA, Narayanan SP, Caldwell RB. Arginase: A Multifaceted Enzyme Important in Health and Disease. *Physiol Rev.* Apr 1 2018;98(2):641-665. doi:10.1152/physrev.00037.2016
46. Hamzei Taj S, Kho W, Riou A, Wiedermann D, Hoehn M. MiRNA-124 induces neuroprotection and functional improvement after focal cerebral ischemia. *Biomaterials.* Jun 2016;91:151-165. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.03.025

CONCLUSÃO

A melatonina produzida localmente por microglias cerebelares ativadas com LPS, é um fator chave para a transição do fenótipo das microglias de um estado pró-inflamatório (M1) para um estado de resolução/recuperação (M2). Esta melatonina local induziu um aumento na capacidade fagocítica destas células. Portanto, estes resultados revelam um fino ajuste exercido pela melatonina no início da resposta imune inata, sugerindo um mecanismo de proteção com objetivo de evitar danos no tecido nervoso após a resposta inflamatória.

RESUMO

SOUZA, Ewerton da Silva. Melatonina como fator regulador do perfil de ativação de microglias no cerebelo de ratos. 2021. Dissertação (Mestrado em ciências – Fisiologia geral) – Instituto de Biociências da USP, São Paulo, 2021.

Frente a estímulos com padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou dano celular (DAMPs), a síntese noturna de melatonina pela glândula pineal é inibida, enquanto a mesma é ativada em macrófagos e microglias. Esta troca da fonte de síntese de melatonina e os efeitos endócrinos e parácrinos/autócrinos desta indolamina, sugeriu a existência de um Eixo Imuno-Pineal. As microglias, conhecidas como macrófagos do sistema nervoso central (SNC), podem apresentar fenótipos de ativação/polarização pró ou anti-inflamatórios (recuperação/reparo). A modulação destes fenótipos depende da natureza, intensidade e duração do estímulo, podendo ser modulados pelo próprio agente agressor, por quimiocinas, citocinas pró e anti-inflamatórias, e outras moléculas sintetizadas durante a resposta inflamatória. Microglias presentes na cultura primária mista de células da glia do cerebelo de ratos produzem melatonina quando ativadas com lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular de bactérias gram-negativas, e o efeito autócrino e parácrino da melatonina leva ao aumento da capacidade fagocítica destas células via receptores de alta afinidade acoplados a proteína G, MT1 e MT2. Em ratos tratados via intracerebroventricular (ICV) com LPS, há uma produção local de melatonina no cerebelo que previne a morte de neurônios e que esse efeito é mediado via receptores, MT1 e MT2. Porém, os mecanismos celulares que medeiam este efeito ainda não são conhecidos. O efeito citotóxico de microglias com perfil pró-inflamatório está diretamente relacionado com a morte de neurônios no processo de neuroinflamação e sabe-se que a melatonina é capaz de regular a polarização destas células, induzindo um fenótipo anti-inflamatório/regulatório. Neste projeto, avaliamos se a melatonina produzida localmente por microglias induzida por LPS, regula o processo de polarização de microglias, de um estado pró-inflamatório para um estado de resolução/recuperação. Observamos que após ativação com LPS, a melatonina produzida por microglias atua de maneira autócrina/parácrina aumentando a capacidade fagocítica das microglias e induzindo um fenótipo de resolução/recuperação.

Palavras-chave: Melatonina. Microglias. Ativação de microglias. Cerebelo.

ABSTRACT

SOUZA, Ewerton da Silva. Melatonin as a regulatory factor of rat cerebellar microglia activation. 2021. Dissertação (Mestrado em ciências – Fisiologia geral) – Instituto de Biociências da USP, São Paulo, 2021.

In the face of stimuli with Pathogen or danger/damage associated molecular patterns (PAMPs or DAMPs), the nocturnal synthesis of melatonin by the pineal gland is inhibited, while it is activated in macrophages and microglia. This change in the source of melatonin synthesis and the endocrine and paracrine/autocrine effects of this indolamine, suggested the existence of an immune-pineal axis. Microglia, known as Central Nervous System (CNS) macrophages, may present pro or anti-inflammatory (recovery/repair) phenotypes under activation. The modulation of these phenotypes depends on the nature, intensity and duration of the stimulus, and may be modulated by the aggressive agent itself, chemokines, pro and anti-inflammatory cytokines, and other molecules synthesized during the inflammatory response. Microglia present in the mix primary culture of rat cerebellar glia cells produce melatonin when activated with lipopolysaccharide (LPS), a PAMP of gram-negative bacteria, and the autocrine/ paracrine effect of melatonin leads to the increase of phagocytic capacity of these cells via high affinity G protein coupled receptors, MT1 and MT2. In rats treated intracerebroventricular (ICV) with LPS, there is a local production of melatonin in the cerebellum that prevents the death of neurons via melatonin receptors, MT1 and MT2. However, the cellular mechanisms that mediate this effect are not yet known. Indeed, microglia with a pro-inflammatory phenotype is directly related to the death of neurons in the neuroinflammatory process and it is known that melatonin is able to regulate the polarization of these cells, inducing a recovery/repair phenotype. Here, we evaluated if melatonin produced locally by microglia induced by LPS, regulates the polarization of microglia, from a pro-inflammatory to a recovery/repair state. We show that after activation with LPS, melatonin produced by microglia acts in an autocrine/paracrine manner increasing the phagocytic capacity of microglia and inducing a recovery/repair phenotype.

Key words: Melatonin. Microglia. Microglia activation. Cerebellum.

REFERÊNCIAS

ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; ESCAMES, G.; VENEGAS, C.; DÍAZ-CASADO, M. E. *et al.* Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cellular and molecular life sciences*, 71, n. 16, p. 2997-3025, 2014.

AL-KAZWINI, A.; O'NEILL, P.; ADAMS, G.; CUNDALL, R. *et al.* One-electron oxidation of methoxylated and hydroxylated indoles by azide. 1. Characterization of the primary indolic radicals. *Journal of physical chemistry*, 94, n. 17, p. 6666-6670, 1990.

ALBERTI, C. Melatonin: the first hormone isolated from the pineal body. II *Farmaco; edizione scientifica*, 13, n. 8, p. 604-605, 1958.

ALGHAMDI, B. The neuroprotective role of melatonin in neurological disorders. *Journal of neuroscience research*, 96, n. 7, p. 1136-1149, 2018.

AMARAL, F. G. D.; CIPOLLA-NETO, J. A brief review about melatonin, a pineal hormone. *Archives of endocrinology and metabolism*, 62, n. 4, p. 472-479, 2018.

BARBOSA JR, E. J. M.; FERREIRA, Z. S.; MARKUS, R. P. Purinergic and noradrenergic cotransmission in the rat pineal gland. *European journal of pharmacology*, 401, n. 1, p. 59-62, 2000.

BERKIKS, I.; BENMHAMMED, H.; MESFIOUI, A.; OUICHOU, A. *et al.* Postnatal melatonin treatment protects against affective disorders induced by early-life immune stimulation by reducing the microglia cell activation and oxidative stress. *International Journal of Neuroscience*, 128, n. 6, p. 495-504, 2018.

BERNIER, L. P.; BOHLEN, C. J.; YORK, E. M.; CHOI, H. B. *et al.* Nanoscale Surveillance of the Brain by Microglia via cAMP-Regulated Filopodia. *Cell Rep*, 27, n. 10, p. 2895-2908 e2894, Jun 4 2019.

BOUTIN, J. A.; WITT-ENDERBY, P. A.; SOTRIFFER, C.; ZLOTOS, D. P. Melatonin receptor ligands: A pharmaco-chemical perspective. *J Pineal Res*, 69, n. 3, p. e12672, Oct 2020.

BRUCK, R.; AEED, H.; AVNI, Y.; SHIRIN, H. *et al.* Melatonin inhibits nuclear factor kappa B activation and oxidative stress and protects against thioacetamide induced liver damage in rats. *J Hepatol*, 40, n. 1, p. 86-93, Jan 2004.

BUBENIK, G.; PURTILL, R.; BROWN, G.; GROTA, L. Melatonin in the retina and the Harderian gland. Ontogeny, diurnal variations and melatonin treatment. *Experimental eye research*, 27, n. 3, p. 323-333, 1978.

CALDWELL, R. W.; RODRIGUEZ, P. C.; TOQUE, H. A.; NARAYANAN, S. P. *et al.* Arginase: A Multifaceted Enzyme Important in Health and Disease. *Physiol Rev*, 98, n. 2, p. 641-665, Apr 1 2018.

CARDINALI, D. P.; ROSNER, J. M. Retinal localization of the hydroxyindole-O-methyl transferase (HIOMT) in the rat. *Endocrinology*, 89, n. 1, p. 301-303, 1971.

CARRILLO-VICO, A.; GUERRERO, J. M.; LARDONE, P. J.; REITER, R. J. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine*, 27, n. 2, p. 189-200, 2005.

CARRILLO-VICO, A.; CALVO, J. R.; ABREU, P.; LARDONE, P. J. *et al.* Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *The FASEB journal*, 18, n. 3, p. 537-539, 2004.

CARVALHO-SOUSA, C. E.; PEREIRA, E. P.; KINKER, G. S.; VERAS, M. *et al.* Immune-pineal axis protects rat lungs exposed to polluted air. *Journal of pineal research*, 68, n. 3, p. e12636, 2020.

CECON, E.; LEGROS, C.; BOUTIN, J. A.; JOCKERS, R. Journal of pineal research guideline for authors: Defining and characterizing melatonin targets. *Journal of pineal research*, 70, n. 2, p. e12712, 2021.

CECON, E.; OISHI, A.; JOCKERS, R. Melatonin receptors: molecular pharmacology and signalling in the context of system bias. *British journal of pharmacology*, 175, n. 16, p. 3263-3280, 2018.

ČERNÝŠIOV, V.; MAURICAS, M.; GIRKONTAITE, I. Melatonin inhibits granulocyte adhesion to ICAM via MT3/QR2 and MT2 receptors. *International immunology*, 27, n. 12, p. 599-608, 2015.

CHERRY, J. D.; OLSCHOWKA, J. A.; O'BANION, M. K. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *Journal of neuroinflammation*, 11, n. 1, p. 1-15, 2014.

CHHOR, V.; LE CHARPENTIER, T.; LEBON, S.; ORÉ, M.-V. *et al.* Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain, behavior, and immunity*, 32, p. 70-85, 2013.

COLTON, C. A. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *Journal of neuroimmune pharmacology*, 4, n. 4, p. 399-418, 2009.

CUZZOCREA, S.; REITER, R. J. Pharmacological actions of melatonin in acute and chronic inflammation. *Curr Top Med Chem*, 2, n. 2, p. 153-165, Feb 2002.

DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.; CARVALHO-SOUSA, C. E.; TAMURA, E. K.; PINATO, L. *et al.* TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NF κ B pathway. *J Pineal Res*, 49, n. 2, p. 183-192, Sep 2010.

DE JESÚS, T. J.; RAMAKRISHNAN, P. NF- κ B c-Rel dictates the inflammatory threshold by acting as a transcriptional repressor. *Iscience*, 23, n. 3, p. 100876, 2020.

DING, K.; WANG, H.; XU, J.; LU, X. *et al.* Melatonin reduced microglial activation and alleviated neuroinflammation induced neuron degeneration in experimental traumatic brain injury: possible involvement of mTOR pathway. *Neurochemistry international*, 76, p. 23-31, 2014.

DING, Y.; PARDON, M. C.; AGOSTINI, A.; FAAS, H. *et al.* Novel methods for microglia segmentation, feature extraction, and classification. *IEEE/ACM transactions on computational biology and bioinformatics*, 14, n. 6, p. 1366-1377, 2016.

DONAT, C. K.; SCOTT, G.; GENTLEMAN, S. M.; SASTRE, M. Microglial Activation in Traumatic Brain Injury. *Front Aging Neurosci*, 9, p. 208, 2017.

DUBBELAAR, M. L.; KRACHT, L.; EGGEN, B. J.; BODDEKE, E. W. The kaleidoscope of microglial phenotypes. *Frontiers in immunology*, 9, p. 1753, 2018.

DUBOCOVICH, M. L. Luzindole (N-0774): a novel melatonin receptor antagonist. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 246, n. 3, p. 902-910, 1988a.

DUBOCOVICH, M. L. Pharmacology and function of melatonin receptors. *The FASEB journal*, 2, n. 12, p. 2765-2773, 1988b.

DUFOURNY, L.; LEVASSEUR, A.; MIGAUD, M.; CALLEBAUT, I. *et al.* GPR50 is the mammalian ortholog of Mel1c: evidence of rapid evolution in mammals. *BMC evolutionary biology*, 8, n. 1, p. 1-14, 2008.

FABIAN, M. R.; SONENBERG, N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nature structural & molecular biology*, 19, n. 6, p. 586, 2012.

FERNANDES, P. A.; CECON, E.; MARKUS, R. P.; FERREIRA, Z. S. Effect of TNF-alpha on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a 'feedback' of the immune response on circadian timing. *J Pineal Res*, 41, n. 4, p. 344-350, Nov 2006.

FERRO, A.; SHEELER, C.; ROSA, J.-G.; CVETANOVIC, M. Role of microglia in ataxias. *Journal of molecular biology*, 431, n. 9, p. 1792-1804, 2019.

FINOCCHIARO, L. M.; ARZT, E. S.; FERNANDEZ-CASTELO, S.; CRISCUOLO, M. *et al.* Serotonin and melatonin synthesis in peripheral blood mononuclear cells: stimulation by interferon-gamma as part of an immunomodulatory pathway. *J Interferon Res*, 8, n. 6, p. 705-716, Dec 1988.

FISKE, V. M.; POUND, J.; PUTNAM, J. Effect of light on the weight of the pineal organ in hypophysectomized, gonadectomized, adrenalectomized or thiouracil-fed rats. *Endocrinology*, 71, n. 1, p. 130-133, 1962.

FRANCO, D. G.; MARKUS, R. P. The cellular state determines the effect of melatonin on the survival of mixed cerebellar cell culture. *PLoS One*, 9, n. 9, p. e106332, 2014.

FRANCO, R.; CENTELLES, J.; CANELA, E. Determination of the characteristics, properties and homogeneity of rat brain microsomes. Binding of lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase and 5'nucleotidase to microsomal membranes. *Biochemistry international*, 16, n. 4, p. 689-699, 1988.

FRANCO, R.; FERNANDEZ-SUAREZ, D. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Progress in neurobiology*, 131, p. 65-86, 2015.

GALLI, C.; MEUCCI, O.; SCORZIELLO, A.; WERGE, T. M. *et al.* Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin, and IGF-1 through distinct mechanisms of action: the involvement of intracellular calcium and RNA synthesis. *Journal of Neuroscience*, 15, n. 2, p. 1172-1179, 1995.

GALLO, V.; KINGSBURY, A.; BALAZS, R.; JORGENSEN, O. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *Journal of Neuroscience*, 7, n. 7, p. 2203-2213, 1987.

GAO, J.; SU, G.; LIU, J.; ZHANG, J. *et al.* Mechanisms of inhibition of excessive microglial activation by melatonin. *Journal of Molecular Neuroscience*, 70, n. 8, p. 1229-1236, 2020.

GILAD, E.; WONG, H. R.; ZINGARELLI, B.; VIRAG, L. *et al.* Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NF κ B activation. *FASEB J*, 12, n. 9, p. 685-693, Jun 1998.

GINHOUX, F.; GRETER, M.; LEOEUF, M.; NANDI, S. *et al.* Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 330, n. 6005, p. 841-845, 2010.

GINHOUX, F.; JUNG, S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 14, n. 6, p. 392-404, 2014.

GOLAN, K.; KUMARI, A.; KOLLET, O.; KHATIB-MASSALHA, E. *et al.* Daily Onset of Light and Darkness Differentially Controls Hematopoietic Stem Cell Differentiation and Maintenance. *Cell Stem Cell*, 23, n. 4, p. 572-585 e577, Oct 4 2018.

GOLDMANN, T.; PRINZ, M. Role of microglia in CNS autoimmunity. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013, 2013.

GRABERT, K.; MICHOEL, T.; KARAVOLOS, M. H.; CLOHISEY, S. *et al.* Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nature neuroscience*, 19, n. 3, p. 504-516, 2016.

HAMZEI TAJ, S.; KHO, W.; RIOU, A.; WIEDERMANN, D. *et al.* MiRNA-124 induces neuroprotection and functional improvement after focal cerebral ischemia. *Biomaterials*, 91, p. 151-165, Jun 2016.

HANISCH, U. K. Functional diversity of microglia - how heterogeneous are they to begin with? *Front Cell Neurosci*, 7, p. 65, 2013.

HARDELAND, R. Melatonin and inflammation-Story of a double-edged blade. *J Pineal Res*, 65, n. 4, p. e12525, Nov 2018.

HARDELAND, R.; PANDI-PERUMAL, S. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutrition & metabolism*, 2, n. 1, p. 1-15, 2005.

HARDELAND, R.; RODRÍGUEZ, C. Minireview: Versatile melatonin: A pervasive molecule serves various functions in signaling and protection. *Chronobiology international*, 12, n. 3, p. 157-165, 1995.

HESS, D. C.; ABE, T.; HILL, W. D.; STUDDARD, A. M. *et al.* Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Experimental neurology*, 186, n. 2, p. 134-144, 2004.

HOOGLAND, I. C. M.; WESTHOFF, D.; ENGELEN-LEE, J. Y.; MELIEF, J. *et al.* Microglial Activation After Systemic Stimulation With Lipopolysaccharide and Escherichia coli. *Front Cell Neurosci*, 12, p. 110, 2018.

HU, L.; ZHANG, S.; WEN, H.; LIU, T. *et al.* Melatonin decreases M1 polarization via attenuating mitochondrial oxidative damage depending on UCP2 pathway in prorenin-treated microglia. *PLoS One*, 14, n. 2, p. e0212138, 2019.

KALTSCHMIDT, B.; WIDERA, D.; KALTSCHMIDT, C. Signaling via NF-kappaB in the nervous system. *Biochim Biophys Acta*, 1745, n. 3, p. 287-299, Sep 30 2005.

KIECKER, C. The origins of the circumventricular organs. *Journal of anatomy*, 232, n. 4, p. 540-553, 2018.

KIERDORF, K.; ERNY, D.; GOLDMANN, T.; SANDER, V. *et al.* Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu. 1-and Irf8-dependent pathways. *Nature neuroscience*, 16, n. 3, p. 273-280, 2013.

KITAY, J. I.; ALTSCHULE, M. D. Effects of pineal extract administration on ovary weight in rats. *Endocrinology*, 65, n. 6, p. 782-784, Dec 1954.

KLEIN, D. C.; WELLER, J. L. Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science*, 169, n. 3950, p. 1093-1095, 1970.

KOBAYASHI, K.; IMAGAMA, S.; OHGOMORI, T.; HIRANO, K. *et al.* Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death Dis*, 4, p. e525, Mar 7 2013.

LAN, X.; HAN, X.; LI, Q.; YANG, Q.-W. *et al.* Modulators of microglial activation and polarization after intracerebral haemorrhage. *Nature Reviews Neurology*, 13, n. 7, p. 420, 2017.

LANNES, N.; EPPLER, E.; ETEMAD, S.; YOTOVSKI, P. *et al.* Microglia at center stage: a comprehensive review about the versatile and unique residential macrophages of the central nervous system. *Oncotarget*, 8, n. 69, p. 114393, 2017.

LARSSON, S. C.; TRAYLOR, M.; MISHRA, A.; HOWSON, J. M. M. *et al.* Serum 25-Hydroxyvitamin D Concentrations and Ischemic Stroke and Its Subtypes. *Stroke*, 49, n. 10, p. 2508-2511, Oct 2018.

LEE, M.; REY, K.; BESLER, K.; WANG, C. *et al.* Immunobiology of Nitric Oxide and Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase. *Results Probl Cell Differ*, 62, p. 181-207, 2017.

- LEE, S. J.; LIU, T.; CHATTORAJ, A.; ZHANG, S. L. *et al.* Posttranscriptional regulation of pineal melatonin synthesis in *Octodon degus*. *Journal of pineal research*, 47, n. 1, p. 75-81, 2009.
- LERNER, A. B.; CASE, J. D.; TAKAHASHI, Y.; LEE, T. H. *et al.* Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocyteS1. *Journal of the American Chemical Society*, 80, n. 10, p. 2587-2587, 1958.
- LIN, S.-H.; HUANG, Y.-N.; KAO, J.-H.; TIEN, L.-T. *et al.* Melatonin reverses morphine tolerance by inhibiting microglia activation and HSP27 expression. *Life sciences*, 152, p. 38-43, 2016.
- LIU, J.; CLOUGH, S. J.; HUTCHINSON, A. J.; ADAMAH-BIASSI, E. B. *et al.* MT1 and MT2 melatonin receptors: a therapeutic perspective. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 56, p. 361-383, 2016.
- LIU, L.; LABANI, N.; CECON, E.; JOCKERS, R. Melatonin target proteins: too many or not enough? *Frontiers in endocrinology*, 10, p. 791, 2019.
- LIU, Y. J.; ZHUANG, J.; ZHU, H. Y.; SHEN, Y. X. *et al.* Cultured rat cortical astrocytes synthesize melatonin: absence of a diurnal rhythm. *Journal of pineal research*, 43, n. 3, p. 232-238, 2007.
- LOANE, D. J.; KUMAR, A. Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Exp Neurol*, 275 Pt 3, p. 316-327, Jan 2016.
- LOPES, C.; MARIANO, M.; MARKUS, R. P. Interaction between the adrenal and the pineal gland in chronic experimental inflammation induced by BCG in mice. *Inflamm Res*, 50, n. 1, p. 6-11, Jan 2001.
- LOTUFO, C. M.; LOPES, C.; DUBOCOVICH, M. L.; FARSKY, S. H. *et al.* Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur J Pharmacol*, 430, n. 2-3, p. 351-357, Nov 2 2001.
- LOTUFO, C. M.; YAMASHITA, C. E.; FARSKY, S. H.; MARKUS, R. P. Melatonin effect on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B4. *Eur J Pharmacol*, 534, n. 1-3, p. 258-263, Mar 18 2006.
- MACHADO, S. D. S. C. Caracterização dos receptores tipo Toll em glândulas pineais de ratos e sua implicação no entedimento do Eixo Imune-Pineal. 2014. 140 f. - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. Acesso em: 20/02/2021.
- MALDONADO, M.; MORA-SANTOS, M.; NAJI, L.; CARRASCOSA-SALMORAL, M. *et al.* Evidence of melatonin synthesis and release by mast cells. Possible modulatory role on inflammation. *Pharmacological research*, 62, n. 3, p. 282-287, 2010.
- 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*, 14, n. 6, p. 10979-10997, 2013.

MARKUS, R. P.; FERNANDES, P. A.; KINKER, G. S.; DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S. *et al.* Immune-pineal axis - acute inflammatory responses coordinate melatonin synthesis by pinealocytes and phagocytes. *Br J Pharmacol*, 175, n. 16, p. 3239-3250, Aug 2018.

MARKUS, R. P.; FERREIRA, Z. S.; FERNANDES, P. A.; CECON, E. The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *Neuroimmunomodulation*, 14, n. 3-4, p. 126-133, 2007.

MÁRQUEZ-ROPERO, M.; BENITO, E.; PLAZA-ZABALA, A.; SIERRA, A. Microglial corpse clearance: lessons from macrophages. *Frontiers in immunology*, 11, 2020.

MARTINS JR, E.; FERREIRA, A.; SKORUPA, A.; AFECHE, S. *et al.* Tryptophan consumption and indoleamines production by peritoneal cavity macrophages. *Journal of leukocyte biology*, 75, n. 6, p. 1116-1121, 2004.

MCCORD, C. P.; ALLEN, F. P. Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *Journal of Experimental Zoology*, 23, n. 1, p. 207-224, 1917.

MECHA, M.; IÑIGO, P. M.; MESTRE, L.; HERNANGÓMEZ, M. *et al.* An easy and fast way to obtain a high number of glial cells from rat cerebral tissue: A beginners approach. *Protocol Exchange*, 218, p. 1038, 2011.

MILLS, C. D.; KINCAID, K.; ALT, J. M.; HEILMAN, M. J. *et al.* M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *The Journal of immunology*, 164, n. 12, p. 6166-6173, 2000.

MORIOKA, S.; PERRY, J. S. A.; RAYMOND, M. H.; MEDINA, C. B. *et al.* Efferocytosis induces a novel SLC program to promote glucose uptake and lactate release. *Nature*, 563, n. 7733, p. 714-718, Nov 2018.

MUXEL, S. M.; LARANJEIRA-SILVA, M. F.; CARVALHO-SOUSA, C. E.; FLOETER-WINTER, L. M. *et al.* The RelA/cRel nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) dimer, crucial for inflammation resolution, mediates the transcription of the key enzyme in melatonin synthesis in RAW 264.7 macrophages. *J Pineal Res*, 60, n. 4, p. 394-404, May 2016.

MUXEL, S. M.; PIRES-LAPA, M. A.; MONTEIRO, A. W.; CECON, E. *et al.* NF-kappaB drives the synthesis of melatonin in RAW 264.7 macrophages by inducing the transcription of the arylalkylamine-N-acetyltransferase (AA-NAT) gene. *PLoS One*, 7, n. 12, p. e52010, 2012.

NAIK, G.; PRIYADARSINI, K. I.; MOHAN, H. One-electron reduction of some indole derivatives: Effect of 5-hydroxy substitution. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 4, n. 23, p. 5872-5877, 2002.

NARANJO, M.; GUERRERO, J. rubio A. Lardone PJ, Carrillo-Vico A., carrascosca-Salmoral MP, Jimenez-Jorge S., Arellano MV, Leal-Novel Sr, Leal M., Lissen E., Molinero P. Melatonin biosynthesis in the thymus of humans and rats. *Cell Mol. Life Sci*, 64, p. 781-790, 2007.

NEHER, J. J.; EMMRICH, J. V.; FRICKER, M.; MANDER, P. K. *et al.* Phagocytosis executes delayed neuronal death after focal brain ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, n. 43, p. E4098-E4107, 2013.

OHSAWA, K.; IMAI, Y.; SASAKI, Y.; KOHSAKA, S. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem*, 88, n. 4, p. 844-856, Feb 2004.

PARK, E.; CHUN, H. S. Melatonin attenuates manganese and lipopolysaccharide-induced inflammatory activation of BV2 microglia. *Neurochemical research*, 42, n. 2, p. 656-666, 2017.

PERDIGUERO, E. G.; KLAPPROTH, K.; SCHULZ, C.; BUSCH, K. *et al.* Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*, 518, n. 7540, p. 547-551, 2015.

PINATO, L.; DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.; FRANCO, D. G.; CAMPOS, L. M. *et al.* Selective protection of the cerebellum against intracerebroventricular LPS is mediated by local melatonin synthesis. *Brain Struct Funct*, 220, n. 2, p. 827-840, Mar 2015.

PIRES-LAPA, M. A.; KOGA, M. M.; DA SILVA JR, I. A.; FILGUEIRAS, L. R. *et al.* Leukotriene B4 modulation of murine dendritic cells affects adaptive immunity. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 141, p. 34-39, 2019.

PIRES-LAPA, M. A.; TAMURA, E. K.; SALUSTIANO, E. M.; MARKUS, R. P. Melatonin synthesis in human colostrum mononuclear cells enhances dectin-1-mediated phagocytosis by mononuclear cells. *J Pineal Res*, 55, n. 3, p. 240-246, Oct 2013.

POEGGELER, B.; SAARELA, S.; REITER, R. J.; TAN, D. X. *et al.* Melatonin—A Highly Potent Endogenous Radical Scavenger and Electron Donor: New Aspects of the Oxidation Chemistry of this Indole Accessed in vitro a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 738, n. 1, p. 419-420, 1994.

PONTES, G. N.; CARDOSO, E. C.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M.; MARKUS, R. P. Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) - melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. *J Pineal Res*, 41, n. 2, p. 136-141, Sep 2006.

PONTES, G. N.; CARDOSO, E. C.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M.; MARKUS, R. P. Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF-alpha increase after cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. *J Pineal Res*, 43, n. 4, p. 365-371, Nov 2007.

REITER, R. J. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr Rev*, 1, n. 2, p. 109-131, Spring 1980.

REITER, R. J. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Molecular and cellular endocrinology*, 79, n. 1-3, p. C153-C158, 1991.

SANTOS, A. A. D. Melatonina sintetizada por microglias de cerebelo em cultura regula o processo de fagocitose. 2015. 95 f. - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. Disponível em: https://teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41135/tde-17072015-153623/publico/Adriessa_Santos.pdf. Acesso em: 20/02/2021.

SCHULTZ, T. F.; KAY, S. A. Circadian clocks in daily and seasonal control of development. *Science*, 301, n. 5631, p. 326-328, 2003.

SHI, D.; XIAO, X.; WANG, J.; LIU, L. *et al.* Melatonin suppresses proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated CRL1999 cells via targeting MAPK, NF-kappaB, c/EBPbeta, and p300 signaling. *J Pineal Res*, 53, n. 2, p. 154-165, Sep 2012.

SILVA, S. O.; RODRIGUES, M.; XIMENES, V.; BUENO-DA-SILVA, A. *et al.* Neutrophils as a specific target for melatonin and kynuramines: effects on cytokine release. *Journal of neuroimmunology*, 156, n. 1-2, p. 146-152, 2004.

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*, 55, n. 2, p. 325-395, 2003.

SKWARLO-SONTA, K. Functional connections between the pineal gland and immune system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 56, n. 1, p. 341-357, 1996.

SKWARLO-SONTA, K.; MAJEWSKI, P.; MARKOWSKA, M.; OBLAP, R. *et al.* Bidirectional communication between the pineal gland and the immune system. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 81, n. 4, p. 342-349, 2003.

SOUZA-TEODORO, L. H.; DARGENIO-GARCIA, L.; PETRILLI-LAPA, C. L.; SOUZA EDA, S. *et al.* Adenosine triphosphate inhibits melatonin synthesis in the rat pineal gland. *J Pineal Res*, 60, n. 2, p. 242-249, Mar 2016.

STENCE, N.; WAITE, M.; DAILEY, M. E. Dynamics of microglial activation: A confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia*, 33, n. 3, p. 256-266, 2001.

TAMASHIRO, T. T.; DALGARD, C. L.; BYRNES, K. R. Primary microglia isolation from mixed glial cell cultures of neonatal rat brain tissue. *J Vis Exp*, n. 66, p. e3814, Aug 15 2012.

TAN, Y.-L.; YUAN, Y.; TIAN, L. Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. *Molecular psychiatry*, 25, n. 2, p. 351-367, 2020.

TIKKA, T.; FIEBICH, B. L.; GOLDSTEINS, G.; KEINÄNEN, R. *et al.* Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *Journal of Neuroscience*, 21, n. 8, p. 2580-2588, 2001.

TSAI, S.-Y.; O'BRIEN, T.; MCNULTY, J. Microglia play a role in mediating the effects of cytokines on the structure and function of the rat pineal gland. *Cell and tissue research*, 303, n. 3, p. 423-431, 2001.

TSAI, S.; SCHLUNS, K.; LE, P.; MCNULTY, J. A. TGF- β 1 and IL-6 expression in rat pineal gland is regulated by norepinephrine and interleukin-1 β . *Histology and histopathology*, 16, n. 4, p. 1135-1141, 2001.

VAINCHTEIN, I. D.; MOLOFSKY, A. V. Astrocytes and microglia: in sickness and in health. *Trends in neurosciences*, 43, n. 3, p. 144-154, 2020.

VAN FURTH, R.; COHN, Z.; HIRSCH, J.; HUMPHREY, J. *et al.* The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bulletin of the World Health Organization*, 46, n. 6, p. 845, 1972.

WAISMAN, A.; GINHOUX, F.; GRETER, M.; BRUTTGER, J. Homeostasis of microglia in the adult brain: review of novel microglia depletion systems. *Trends in immunology*, 36, n. 10, p. 625-636, 2015.

WU, U. I.; MAI, F. D.; SHEU, J. N.; CHEN, L. Y. *et al.* Melatonin inhibits microglial activation, reduces pro-inflammatory cytokine levels, and rescues hippocampal neurons of adult rats with acute *Klebsiella pneumoniae* meningitis. *Journal of pineal research*, 50, n. 2, p. 159-170, 2011.

WURTMAN, R. J.; ALTSCHULE, M. D.; HOLMGREN, U. Effects of pinealectomy and of a bovine pineal extract in rats. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 197, n. 1, p. 108-110, 1959.

WURTMAN, R. J.; AXELROD, J.; PHILLIPS, L. S. Melatonin Synthesis in the pineal gland: control by light. *Science*, 142, n. 3595, p. 1071-1073, 1963.

WURTMAN, R. J.; ROTH, W.; ALTSCHULE, M. D.; WURTMAN, J. J. Interactions of the pineal and exposure to continuous light on organ weights of female rats. *European Journal of Endocrinology*, 36, n. 4, p. 617-624, 1961.

YAO, C.; LIU, X.; ZHOU, Z.; XIANG, Y. *et al.* Melatonin attenuates expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in activated microglia induced by lipopolysaccharide (LPS). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 82, n. 7, p. 437-446, 2019.

ZHANG, Q.; LENARDO, M. J.; BALTIMORE, D. 30 years of NF- κ B: a blossoming of relevance to human pathobiology. *Cell*, 168, n. 1-2, p. 37-57, 2017.

ZHANG, Y.; LIU, Z.; ZHANG, W.; WU, Q. *et al.* Melatonin improves functional recovery in female rats after acute spinal cord injury by modulating polarization of spinal microglial/macrophages. *J Neurosci Res*, 97, n. 7, p. 733-743, Jul 2019.