

Daiane Gil Franco

Efeito da Melatonina Sobre a
Viabilidade de Células Granulares
de Cerebelo em Cultura Depende do
Contexto Celular

São Paulo

2014

Daiane Gil Franco

Efeito da Melatonina Sobre a Viabilidade
de Células Granulares de Cerebelo em
Cultura Depende do Contexto Celular

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

Orientador(a):

Regina Pekelmann Markus

São Paulo

2014

Ficha catalográfica

Franco, Daiane Gil

Efeito da melatonina sobre a viabilidade de células granulares de cerebelo em cultura depende do contexto celular /

Daiane Gil Franco ;

Orientadora: Regina P. Markus. -- São Paulo, 2014.

102 f.

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

1. melatonina. 2. cerebelo. 3. NF-κB. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia. II. Título.

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

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

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	5
Melatonina e os Sítios de Produção	6
Mecanismos de ação da melatonina e proteção celular	11
Fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB)	14
Relação NF-κB e Melatonina – Eixo Imune-Pineal	17
Cerebelo – as células granulares	20
OBJETIVOS	23
MATERIAL e MÉTODOS	25
Animais	27
Drogas e Reagentes	27
Protocolos Experimentais	30
Viabilidade Celular	31
Ensaio de Eletromobilidade em Gel (<i>Eletromobility-shift assay</i> – EMSA)	32
Expressão da enzima iNOS	33
Produção de óxido nítrico	34
Expressão da enzima AA-NAT	35
Dosagem de melatonina	36
Análise Estatística	36
CONCLUSÕES	37

RESUMO	39
ABSTRACT	41
REFERÊNCIAS	43
ANEXO I	60

Lista de Abreviaturas

5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
5-HTP	5-hidroxitriptofano
AA-NAT	arilalquilamina-N-acetiltransferase
AC	adenilil ciclase
AFMK	N ¹ -acetil-N ² -formil-5-metoxiquinuramina
AMK	N[1]-acetil-5-metoxiquinuramina
AMPC	adenosina monofosfato cíclica
ATP	adenosina trifosfato
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BDNF	fator neurotrófico derivado do cérebro
BSA	albumina sérica bovina
Ca ²⁺	Cálcio
CaM	Calmodulina
CaMKII	proteína quinase II dependente de CaM
cNOS	sintase de óxido nítrico constitutiva
c.p.m.	contagem por minuto
CREB	proteína ligante ao elemento de resposta do AMPC
DAF-FM	4-amino-5-metilamino-2',7' difluorofluoresceína
DMEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
e.p.m.	erro padrão da média
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
EMSA	ensaio de eletromobilidade em gel
GABA	ácido gama-aminobutírico
GFAP	proteína fibrilar ácida de glia
GMPc	guanosina monofosfato cíclico
G _s	proteína G estimulatória
H	Hora
HEPES	ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinaetanesulfônico
HIOMT	hidroxi-indol-O-metiltransferase
i.c.v.	intracerebroventricular
IκB	proteína inibitória kappa B
IKK	IκB quinase
IL-2	interleucina 2
IL-6	interleucina 6
iNOS	sintase de óxido nítrico induzível
IP ₃	inositol trifosfato
LPS	lipopolissacarídeo de bactéria Gram-negativa
MAP2	proteína associada ao microtúbulo 2
min.	Minuto
mM	Milimolar
MT ₁	receptor de melatonina do subtipo 1
MT ₂	receptor de melatonina do subtipo 2
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium

NA	Noradrenalina
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato-oxidase
NAS	N-acetilserotonina
NEMO	proteína moduladora essencial de NF-κB
NF-κB	fator nuclear kappa B
NIK	proteína quinase indutora de NF-κB
NLS	sinal de localização nuclear
nNOS	sintase de óxido nítrico neuronal
NO	óxido nítrico
NP40	nonil fenoxilpolietoxiletanol
NPV	núcleo paraventricular
NSQs	núcleos supraquiasmáticos
OH•	radical hidroxila
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos
PBS	solução tampão fosfato
PDTC	pirrolidina ditiocarbamato
PKAII	proteína quinase dependente de AMPc
PKC	proteína quinase dependente de Ca ²⁺
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil
poli(dIdC)	Poli(deoxinosinico-deoxicidílico)
QR2	quinona redutase 2
RHD	domínio de homologia Rel
RNA	ácido ribonucleico
RNS	espécie reativa de nitrogênio
RORα	receptor órfão para retinóide do subtipo α
ROS	espécie reativa de oxigênio
RZR	receptor z para retinóide
seg.	Segundo
SFB	soro fetal bovino
SNC	sistema nervoso central
TAD	domínio de transativação
TBE	solução contendo Tris/Borato/EDTA
TLR-4	receptor semelhante ao Toll do subtipo 4
TNF	fator de necrose tumoral
TNF-R	receptor de TNF
TrkB	receptor de BDNF
UV	ultra violeta
V	Volt

INTRODUÇÃO

“Existe uma coisa que uma longa existência me ensinou: toda a nossa ciência, comparada à realidade, é primitiva e inocente; e, portanto, é o que temos de mais valioso.”

Albert Einstein

O fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB) exerce importantes funções na fisiologia e na patologia do sistema nervoso central (SNC). É um alvo de ação da melatonina, molécula sintetizada por diversos tipos celulares e que desempenha múltiplas ações. Encontramos na cultura de células granulares de cerebelo um bom modelo para estudar a interação entre a melatonina e a via de ativação do NF-κB, pois estas células dependem de uma atividade basal deste fator de transcrição para sobreviver.

Melatonina e os Sítios de Produção

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma indolamina versátil, muito conservada entre os filos e que está presente em organismos unicelulares, plantas, fungos, invertebrados e vertebrados (Pandi-Perumal *et al.*, 2006). Em vertebrados é sintetizada pela glândula pineal à noite e por isso é conhecida como o hormônio do escuro, pois marca a entrada e a duração desta fase (Arendt e Skene, 2005). Além disso, outros sítios de produção de melatonina estão espalhados por todo o organismo e, neste caso, esta indolamina desempenha diversas funções autócrinas ou parácrinas, relacionadas ou não à marcação do tempo (Gern e Ralph, 1979; Bubenik, 2001; 2002; Carrilo-Vico *et al.*, 2004; Markus *et al.*, 2013).

A melatonina foi isolada pela primeira vez por Aaron B. Lerner a partir de extratos de glândula pineal bovina (Lerner *et al.*, 1958). Mais tarde, Julius Axelrod fez importantes avanços descrevendo a síntese da melatonina (Axelrod e

Wiessbach, 1960; Weissbach *et al.*, 1960) e a participação do sistema nervoso simpático na imposição do ritmo diário de produção desse hormônio pela glândula pineal (Iversen, 2006). A síntese de melatonina tanto pela glândula pineal quanto por sítios extra-pineais depende da mesma via biossintética, no entanto, os controles envolvidos nessa síntese são diferentes para cada local. A biossíntese da melatonina se inicia com a captação do triptofano que é convertido a 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Este é metabolizado em serotonina (5-HT) que sofre uma acetilação pela enzima arilalquilamina-N-acetiltransferase (AA-NAT) resultando em N-acetilserotonina (NAS) que é, em seguida, *O*-metilada pela enzima hidroxindol-*O*-metiltransferase (HIOMT), resultando em melatonina (Klein *et al.*, 1981).

Nos mamíferos, a glândula pineal é um órgão neuroendócrino que recebe tanto informações neurais quanto humorais (Simonneux e Ribelayga, 2003). A principal via neural que envolve a glândula pineal é chamada de trato retino-hipotalâmico que transmite a informação fótica da retina para os núcleos supraquiasmáticos (NSQs) localizados no hipotálamo (Moore e Klein, 1974). Os NSQs liberaram o neurotransmissor inibitório ácido gama-aminobutírico (GABA) no núcleo paraventricular (NPV) que emite projeções ao gânglio cervical superior, de onde partem fibras simpáticas que inervam a pineal. Na fase de claro, a informação fótica que chega aos NSQs leva a uma inibição da atividade do NPV e, portanto, inibe a via de ativação da glândula pineal. Na fase de escuro, esta via é liberada e os neurotransmissores simpáticos ativam a pineal (Simonneux e Ribelayga, 2003). Apesar da luz ser sincronizadora da atividade

da pineal, não podemos esquecer que os NSQs apresentam uma atividade rítmica endógena. Isso quer dizer que, em escuro constante, a glândula pineal produz melatonina de forma rítmica, obedecendo ao ritmo endógeno dos NSQs (Arendt e Skene, 2005).

A noradrenalina liberada no escuro de terminais simpáticos originários do gânglio cervical superior (Klein, 1985) ativa adrenoceptores α_1 e β_1 (Tobin *et al.*, 2002). A ativação apenas do adrenoceptor β_1 é suficiente para induzir a síntese de melatonina. Estes receptores acoplam-se à proteína G estimulatória (G_s) resultando na produção de adenosina monofosfato cíclica (AMPC) através da adenilil ciclase (AC). O AMPC, por sua vez, ativa a proteína quinase A II dependente de AMPC (PKAII) (Simonneax e Ribelaga, 2003). O aumento da atividade simpática pode elevar as concentrações disponíveis de NA na fenda sináptica ativando adrenoceptores α_1 (Sabban *et al.*, 2004; Serova *et al.*, 2008) que potencia em até vinte vezes a síntese de melatonina induzida pela ativação de adrenoceptores β_1 (Chik e Ho, 1989). Os adrenoceptores α_1 ativam fosfoquinase C (PKC) através da mobilização de cálcio por inositol trifosfato (IP_3). A PKC induz um aumento de guanosina monofosfato cíclica (GMPC) que ativa a AC (Simonneux e Ribelayga, 2003).

Entre os mamíferos podemos distinguir dois grupos quanto à ativação da produção de melatonina pela pineal: os de hábito noturno (roedores) e os de hábito diurno (primatas e ungulados). Em roedores PKAII fosforila o fator de transcrição CREB (do inglês, *cyclic AMP response element binding*) que ativa a transcrição do RNA mensageiro da enzima AA-NAT. Uma vez transcrita e

traduzida, esta enzima é degradada pelo proteossoma 26S. A fosforilação da AA-NAT por PKAII favorece a interação com a proteína 14-3-3, tornando-a estável e expondo o sítio ativo. Portanto, em roedores a ativação β_1 -adrenérgica sinaliza a transcrição do gene da AA-NAT, sua estabilização e ativação. Em primatas e ungulados, o gene *Aa-nat* é transcrito e traduzido constitutivamente, porém a proteína AA-NAT sofre processo contínuo de degradação na ausência de fosforilação. A indução de sua atividade depende, portanto, da fosforilação pela PKAII, obtida através da ativação simpática. Em ambos os grupos, a enzima AA-NAT é o passo chave da síntese de melatonina (Simonneaux e Ribelayga, 2003), mas o decurso temporal de ativação é diferente. No caso dos animais de hábito noturno existe um tempo longo entre a entrada do escuro e o início da produção de melatonina, enquanto que em animais de hábito diurno a subida dos níveis de melatonina ocorre imediatamente após o início do escuro (Lee *et al.*, 2009).

Como mencionado anteriormente, a via de biossíntese de melatonina em sítios extra-pineal é a mesma já descrita, mas o controle dessa produção é específico para cada local. Em estado de hígidez, células fotorreceptoras da retina, por exemplo, são as responsáveis pela produção de melatonina de forma rítmica sincronizada ao ciclo claro/escuro ambiental (Gern e Ralph, 1979; Cahill e Besharse, 1993; Liu *et al.*, 2004), mas em condições patológicas outros tipos celulares também assumem este papel (Tosini *et al.*, 2012a). Em ambos os casos, a melatonina age apenas no local (Iuvone *et al.*, 2005). O controle da expressão da enzima AA-NAT em fotorreceptores depende apenas do relógio circadiano

interno presente nessas células e não da atividade dos NSQs (Chen e Baler, 2000; Sakamoto *et al.*, 2000).

Células do trato gastrointestinal, com destaque para as células enterocromafins, produzem elevado nível de melatonina que chega a ser 10 à 100 vezes maior que as concentrações encontradas no plasma (Bubenik, 2002). Ao contrário da produção fotoperiódica na pineal, a libertação de melatonina gastrointestinal parece estar relacionada com a periodicidade da ingestão de alimentos e esta produção tem ação endócrina, parácrina ou autócrina, influenciando a regeneração e a função epitelial e modulando o sistema imunológico local (Bubenik, 2008).

A produção de melatonina por células do sistema imunológico ocorre quando essas células são ativadas por agentes pró-inflamatórios, tais como padrões moleculares associados a patógeno (PAMPs) ou citocinas (Carrilo-Vicco *et al.*, 2004; 2005; Martins *et al.*, 2004; Pontes *et al.*, 2006; Maldonado *et al.*, 2010; Muxel *et al.*, 2012; Pires-Lapa *et al.*, 2013). A melatonina produzida por células imunocompetentes tem função autócrina e parácrina, uma vez que aumenta a capacidade fagocítica dos macrófagos (Muxel *et al.*, 2012; Pires-Lapa *et al.*, 2013) e induz a síntese de interleucina-2 (IL-2) (Carrilo-Vico *et al.*, 2005).

No SNC os altos níveis de melatonina encontrados no líquido cefalorraquidiano podem ter origem na própria glândula pineal que se comunica com o terceiro ventrículo através do recesso pineal (Tricoire *et al.*, 2002). Por outro lado, o tecido cerebral apresenta a maquinaria molecular necessária para produzir melatonina (Gaudet *et al.*, 1991; Uz *et al.*, 2002; Jimenez-Jorge *et al.*, 2006)

e existem evidências de que esta produção seja feita por células da glia, já que expressam AA-NAT (Liu *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2010; Pinato *et al.*, 2013). A importância dos altos níveis de melatonina encontrados no SNC pode estar relacionada à função neuroprotetora da melatonina (Hardeland, 2012).

A melatonina, portanto, exerce diversas funções que podem ser divididas em cronobióticas e não-cronobióticas. Os efeitos cronobióticos são mediados pelo ritmo diário de produção de melatonina pela glândula pineal, enquanto que a melatonina produzida por sítios extra-pineal não depende de sincronização pelo ciclo claro-escuro e tem ação no local de síntese.

Mecanismos de ação da melatonina e proteção celular

É largamente difundido o papel da melatonina como agente de proteção celular, tanto em modelos *in vivo* quanto *in vitro*. Podemos citar uma extensa literatura mostrando a melatonina inibindo apoptose em diversos tipos celulares (Yalcin *et al.*, 2004; Luchetti *et al.*, 2010), protegendo as células do estresse oxidativo (Solís Herruzo e Solís Muños, 2009; Esposito e Cuzzocrea, 2010; Cuesta *et al.*, 2011) ou, ainda, combatendo os efeitos do envelhecimento (Srinivasan *et al.*, 2005; Perreau *et al.*, 2007; Pizza *et al.*, 2011). As múltiplas funções desempenhadas pela melatonina, específicas para cada tecido, se devem aos diversos mecanismos de ação possíveis. Muitas das funções da melatonina são mediadas por dois tipos de receptores de membrana acoplados à proteína G (Zlotos *et al.*, 2013). Por outro lado, por ser uma molécula anfipática a melatonina é capaz de atravessar a

membrana plasmática e interagir com moléculas citosólicas e nucleares com uma afinidade muito menor do que para os receptores de membrana. (Shida *et al.*, 1994; Hardeland, 2009; Luchetti *et al.*, 2010).

Em mamíferos os receptores de membrana denominados MT₁ e MT₂ (originalmente descritos como Mel_{1a} e Mel_{1b}, respectivamente) são expressos tanto individualmente como em conjunto em vários tecidos e órgãos (Hardeland, 2009). O subtipo MT₁ é amplamente expresso no SNC, em órgãos reprodutores, rim, fígado, vasos e pele. Nos NSQs, por exemplo, desempenha um papel na retroalimentação envolvida no reajuste do oscilador, já que a glândula pineal de mamíferos é controlada pelos NSQs. Já o subtipo MT₂ é expresso de forma mais restrita, sendo encontrada principalmente no cérebro (com exceção dos NSQs), embora a sua presença também tenha sido detectada no pulmão, células do sistema imunológico, duodeno e adipócitos (Pandi-Perumal *et al.*, 2008). Esses receptores tem afinidades diferentes para a melatonina sendo cerca de três vezes maior para o MT₁ em relação ao MT₂. (Witt-Enderby *et al.*, 2003). Além disso, os receptores podem atuar como monômeros ou dímeros, sendo que a presença de heterodímero MT₁/MT₂ e o homodímero MT₁ são mais prevalentes em relação ao homodímero MT₂ (Zlotos *et al.*, 2014).

Um terceiro tipo de receptor de membrana (MT₃) chegou a ser designado, mas, posteriormente, foi demonstrado que se tratava de uma enzima citosólica denominada quinona redutase 2 (QR2) (Nosjean *et al.*, 2000). Esta enzima pertence ao grupo de redutases que participa da proteção contra o estresse oxidativo (Pandi-Perumal *et al.*, 2008). Além da QR2 a melatonina interage com

outras moléculas citosólicas como, por exemplo, a calmodulina (CaM) que forma um complexo com cálcio (Hardeland, 2009; Luchetti *et al.*, 2010). Essa interação leva a inibição da atividade de proteínas quinases, como a CaM quinase II (CaMKII) (Benítez-King *et al.*, 1996) e da isoforma constitutiva da sintase de óxido nítrico (cNOS) (León *et al.*, 2000).

A superfamília de receptores órfãos de ácido retinóico (ROR e RZR) tem sido alvo de um considerável número de estudos que apontam que esses receptores estão presentes no SNC e em células do sistema imunológico (Hardeland, 2009). A atividade desses receptores pode ser inibida pela melatonina de forma direta ou através de duas formas indiretas: via receptor MT₁ ou através da interação da melatonina com o complexo CaM (Tomás-Zapico e Coto-Montes, 2005).

Um alvo chave da melatonina envolvido na proteção celular é o fator de transcrição NF- κ B (Luchetti *et al.*, 2010). Sua inibição leva, conseqüentemente, a redução da síntese de citocinas proinflamatórias como, por exemplo, as interleucinas (IL-2 e IL-6), o fator de necrose tumoral (TNF), moléculas de adesão e quimiotáticas e a isoforma induzida da sintase de óxido nítrico (iNOS), além de modular a expressão de genes anti e proapoptóticos (Bhakar *et al.*, 2002; Bruck *et al.*, 2004; Kaltschmidt *et al.*, 2005). O mecanismo de ação da melatonina sobre a via de ativação deste fator de transcrição ainda não está estabelecido.

Múltiplas ações da melatonina a tornam uma importante molécula no combate ao estresse oxidativo. Devido às suas características físico-químicas a melatonina se encontra amplamente distribuída nos tecidos, células e

compartimentos celulares (Shida *et al.*, 1994; Costa *et al.*, 1995; Menendez-Pelaez e Reiter, 1993). Isso permite que ela interaja e neutralize espécies reativas de oxigênio (ROS) ou de nitrogênio (RNS), reduzindo os danos oxidativos às moléculas encontradas em compartimentos lipídicos ou aquosos (Tomás-Zapico e Coto-Montes, 2005). A propriedade única da melatonina ao interagir com ROS ou RNS gera metabólitos que também possuem propriedades antioxidantes, tal como o N¹-acetil-N²-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) que sofre a retirada do grupo funcional formil dando origem ao também antioxidante N[1]-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK) (Galano *et al.*, 2013).

A melatonina também age como antioxidante de forma indireta por estimular o aumento da expressão e da atividade de enzimas antioxidantes, tal como a superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e glicose-6-fosfato desidrogenase (Pandi-Perumal *et al.*, 2013). Os mecanismos ainda são incertos, mas existem evidências da ação antioxidante da melatonina através de seus receptores de membrana (Carrilo-Vico *et al.*, 2004) ou através da inibição dos fatores de transcrição ROR α e NF- κ B, ambos envolvidos na transcrição de genes de enzimas pró e antioxidantes (Dai *et al.*, 2001; Luchetti *et al.*, 2010).

Por fim, a melatonina apresenta múltiplas formas de gerar citoproteção associadas às diversas formas específicas de sinalizar.

Fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B)

O fator de transcrição NF- κ B é um mensageiro intracelular conservado evolutivamente que exerce um papel crucial em muitos processos biológicos (Hayden e Ghosh, 2012). Descoberto em linfócito B (Sen e Baltimore, 1986) o NF- κ B é considerado um fator chave na resposta do sistema imunológico, mas também influencia a expressão gênica relacionada à sobrevivência, diferenciação e proliferação celular (Xiao, 2004). A disfunção da atividade do NF- κ B pode levar a consequências severas tais como câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, inflamações crônicas e doenças relacionadas ao SNC (Courtois e Gilmore, 2006).

A superfamília de proteínas do NF- κ B é caracterizada por conter uma porção N-terminal bem conservada com cerca de 300 aminoácidos chamada de domínio de homologia Rel (RHD), a qual se subdivide em uma região que se liga ao DNA e outra chamada de domínio de dimerização, onde se encontra um sinal de localização nuclear (NLS) (Hayden e Ghosh, 2004). A sequência c-terminal divide a superfamília do NF- κ B em dois grupos: os que contêm um domínio de transativação (TAD) e que, portanto, ativam a transcrição gênica – RelA (p65), RelB e c-Rel – e os que não contêm esse domínio e são repressores da expressão gênica – p50 e p52 (Gilmore e Woleski, 2012). Os membros dessa superfamília funcionam como dímeros e as cinco subunidades podem formar homo ou heterodímeros, sendo que o mais abundante é o p50/RelA (Xiao, 2004).

A atividade dos dímeros de NF- κ B é inibida por proteínas citoplasmáticas inibitórias da família I κ B que se ligam ao domínio RHD dos dímeros, mantendo-os no citoplasma, prevenindo a translocação para o núcleo. A família I κ B é caracterizada por repetições de anquirinas que são proteínas adaptadoras que

promovem interação proteína-proteína (Xiao, 2004). Fazem parte dessa família I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ , Bcl-3 e os precursores p100 e p105, que dão origem as subunidades p52 e p50, respectivamente (Gilmore e Wolenski, 2012).

As vias de ativação do NF- κ B podem ser dependente (via clássica) ou independente (via não-clássica) do complexo formado pelas proteínas I κ B quinases (IKK) dos subtipos α e β e da proteína moduladora essencial de NF- κ B (NEMO). Na via clássica, a ativação de receptores de agentes pró-inflamatórios, tal como TNF ou de PAMPs, como o lipopolissacarídeo (LPS), componente da parede de bactéria gram-negativa que ativa o receptor semelhante ao Toll do subtipo 4 (*Toll-like receptor*, TLR-4), levando a ativação do complexo IKK β que está associado ao complexo IKK α /NEMO. A ativação deste complexo leva à fosforilação da proteína I κ B que será, então, ubiquitinada e degradada por proteassoma liberando o dímero de NF- κ B (Hayden e Ghosh, 2012). A via não-clássica é independente de IKK β e NEMO, enquanto que IKK α e a proteína quinase indutora de NF- κ B (NIK) são essenciais. Algumas citocinas e vírus ativam a NIK que ativa IKK α . Esta fosforila p100 que é poliubiquitinada e parcialmente degradada, gerando a subunidade p52 que transloca para o núcleo juntamente com a RelB (Xiao, 2004). Além dessas vias, danos no DNA causados por radiação ionizante ou por drogas quimioterápicas e condições estressantes, como estresse oxidativo, são capazes de ativar NEMO através de uma via “núcleo-citoplasma”. Ainda, a luz UV é capaz de ativar I κ B α via p38 de forma independente de dano no DNA (Neumann e Naumann, 2007).

Ao translocar para o núcleo o NF- κ B ativa a transcrição dos genes da proteína da família I κ B gerando uma retroalimentação negativa que controla a atividade do próprio fator de transcrição (Nelson *et al.*, 2004). Na presença de um estímulo sustentado o NF- κ B transloca para dentro e para fora do núcleo, produzindo uma oscilação com período definido. Em células de neuroblastoma humano (SK-N-A) isoladas este período é de aproximadamente cem minutos (Ashall *et al.*, 2009; Turner *et al.*, 2010). Esta oscilação temporal permite que diferentes conjuntos de genes sejam expressos ao longo do tempo (Ashall *et al.*, 2009). Além dessa retroalimentação outros fatores regulados pelo NF- κ B são capazes de modular a atividade desse fator de transcrição como, por exemplo, o NO sintetizado a partir da iNOS (de la Torre *et al.*, 1999).

Relação NF- κ B e Melatonina – Eixo Imune-Pineal

A produção rítmica de melatonina pela glândula pineal pode ser modulada por mediadores inflamatórios já que a glândula expressa receptores para eles (Jiang-Shieh *et al.*, 2005; da Silveira Cruz-Machado *et al.*, 2010; Carvalho-Sousa *et al.*, 2011). Enquanto isso, na periferia células imunocompetentes produzem melatonina quando estimuladas por esses mesmos agentes inflamatórios (Carrilo-Vicco *et al.*, 2004; 2005; Martins *et al.*, 2004; Pontes *et al.*, 2006, 2007; Maldonado *et al.*, 2010; Muxel *et al.*, 2012; Pires-Lapa *et al.*, 2013). Essa comunicação bidirecional entre as fontes de melatonina pineal e extra-pineal no contexto de uma inflamação (Skwarlo-Sonta *et al.*, 2003; Markus *et al.*, 2007;

Markus e Ferreira, 2011) é dependente da atividade do NF- κ B (da Silveira Cruz-Machado *et al.*, 2010, 2012; Carvalho-Souza *et al.*, 2011). Esta relação tem sido estudada por nosso grupo como a hipótese do Eixo Imune-Pineal (Markus *et al.*, 2007; Fernandes e Markus, 2011; Markus e Ferreira, 2011; Markus *et al.*, 2013).

Em estado de hígidez a melatonina produzida pela glândula pineal na fase de escuro inibe o rolamento e a adesão de leucócitos à camada endotelial dos vasos, impedindo a migração dessas células para o tecido e, portanto, a montagem de uma resposta inflamatória desnecessária (Lotufo *et al.*, 2001; 2006). A glândula pineal apresenta um ritmo de atividade diário do dímero inibidor de transcrição gênica, p50/p50. Na transição claro/escuro, momento em que se inicia a produção de melatonina pela glândula, há uma queda abrupta do conteúdo nuclear desse dímero, que permanece baixo até a próxima fase de claro (Cecon *et al.*, 2010).

No início de um processo inflamatório a ativação de receptores de PAMPs e de citocinas (TLR-4 e TNF-R) na glândula pineal leva a um aumento da translocação nuclear dos dímeros p50/p50 e p50/RelA induzindo a produção de TNF e de iNOS e um bloqueio da produção de melatonina (da Silveira Cruz-Machado *et al.*, 2010, 2012; Carvalho-Souza *et al.*, 2011; Markus e Ferreira, 2011). A ausência de TAD no dímero p50/p50 e o fato de que culturas de pineais incubadas com inibidores de NF- κ B aumentam a produção de NAS (Ferreira *et al.*, 2005) sugerem que este dímero seja responsável pelo bloqueio da expressão da *Aa-nat*.

A síntese de melatonina por células imunocompetentes ativadas por agentes pró-inflamatórios foi demonstrado em linfócitos (Carrilo-Vico *et al.*, 2004; 2005), macrófagos (Martins *et al.*, 2004; Muxel *et al.*, 2012; Pires-Lapa *et al.*, 2013), células mono e polimorfonucleares de colostro (Pontes *et al.*, 2006, 2007), timócitos (Naranjo *et al.*, 2007), mastócitos (Maldonado *et al.*, 2010) e células da glia (Pinato *et al.*, 2013). A produção de melatonina por macrófagos do colostro é bloqueada ao ser inibida a translocação nuclear do NF- κ B (Pires-Lapa *et al.*, 2013) e, em linhagens de macrófagos RAW 264.7, a expressão do gene da AA-NAT é acionada por dímeros de NF- κ B contendo as subunidades RelA ou c-Rel (Muxel *et al.*, 2012). Esta melatonina produzida por macrófagos age de maneira parácrina ativando receptores MT₂ que leva a um aumento da expressão de dectina-1, molécula que participa no englobamento de partículas e microorganismos e na formação do fagolisossomo. Portanto, a melatonina induz um aumento da atividade fagocítica dos macrófagos (Pire-Lapa *et al.*, 2013).

Se por um lado a síntese de melatonina tanto na pineal quanto em sítios extra-pineal é modulada pelo NF- κ B, a atividade deste fator de transcrição é inibida pela melatonina em macrófagos de murino (Gilad *et al.*, 1998), neuroblastoma humano (Lezoualc'h *et al.*, 1998), linhagem de célula humana (SH-SY5Y) (Chetsawang *et al.*, 2006), cultura de endotélio de rato (Tamura *et al.*, 2009) e em microglia de murinos (Min *et al.*, 2012), reduzindo tanto a síntese de citocinas pró-inflamatórias quanto o estresse oxidativo induzido por agentes nocivos. Por essa razão, o uso da melatonina tem sido considerado no tratamento

e prevenção de diversas doenças de caráter inflamatório, incluindo doenças neurodegenerativas (Hardeland, 2009).

Desta forma, a hipótese do Eixo Imune-Pineal postula que mediadores da fase inicial da inflamação bloqueiam a síntese de melatonina induzida por noradrenalina, inibindo o pico noturno de melatonina plasmática e favorecendo a migração de células para o local da lesão. Dados clínicos reforçam essa hipótese, mostrando que mães com mastite ou que realizaram parto cesariano apresentam uma supressão dos níveis noturnos de melatonina acompanhada de um aumento dos níveis de TNF plasmático (Pontes *et al.*, 2006; 2007). Na fase de recuperação os leucócitos migram para o local da lesão celular e produzem melatonina e outros mediadores anti-inflamatórios que contribuem para o término da resposta inflamatória (Fernandes e Markus, 2011).

Cerebelo - as células granulares

O cerebelo (latim: pequeno cérebro) é uma região do encéfalo responsável pelo controle motor fino e por funções cognitivas e emocionais (Hashimoto e Hibi, 2012). O córtex do cerebelo é dividido anatomicamente em três camadas: molecular, Purkinje e granular. A camada molecular possui poucos corpos celulares de dois tipos de interneurônios (em cesto e estrelado) que estão dispersos entre os axônios excitatórios das células granulares e os dendritos inibitórios das células de Purkinje. Na camada de células de Purkinje, além destas, estão os núcleos das células de Bergmann, astrócitos especializados que

lançam seus prolongamentos à camada molecular, perpendicularmente à superfície meníngea. A camada mais interna é composta pelo grande número de células granulares, os menores neurônios do corpo, e uma pequena quantidade de neurônios de Golgi. Nessa camada existem sinapses complexas denominadas glomérulos cerebelares, onde a fibra musgosa termina em um pequeno bulbo que se conecta com as células granulares e os neurônios de Golgi (Ghez e Thach, 2000).

As células granulares de cerebelo, que são neurônios glutamatérgicos, sobrevivem em cultura desde que o meio de cultivo seja mantido em concentração despolarizante de potássio (25 mM) o que ativa os canais de cálcio dependente de voltagem elevando os níveis de cálcio intracelular (Blaustein, 1975; Tsien, 1983; Gallo *et al.*, 1987). A redução dos níveis de potássio na cultura induz apoptose (D'Mello *et al.*, 1993; Galli *et al.*, 1995), enquanto que a abertura de canais de cálcio é indispensável para manter uma atividade basal do fator de transcrição NF- κ B, essencial para a sobrevivência das células (Lilienbaum e Israël, 2003).

De forma geral, o NF- κ B exerce diversas funções essenciais no SNC, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (Mattson *et al.*, 2000; Kaltschmidt *et al.*, 2005). A sobrevivência de células granulares de cerebelo em cultura mantidas em alta concentração de potássio é reduzida quando se incubam as células com bloqueadores da atividade do NF- κ B. Por outro lado, células transfectadas que superexpressam a subunidade RelA não entram em apoptose quando submetidas a um meio com baixa concentração de potássio (Koulich *et al.*, 2001).

Esses resultados indicam que o NF- κ B é indispensável para a sobrevivência dessas células em cultura e uma alteração dos níveis basais pode ocasionar a morte celular (Kaltschmidt *et al.*, 2005).

O cerebelo é alvo de atuação da melatonina via receptores de membrana (MT₁ e MT₂) (Laudon *et al.*, 1998; Al-Ghoul *et al.*, 1998; Imbesi *et al.*, 2008; Adamah-Biassi *et al.*, 2014). Na cultura de células granulares do cerebelo a melatonina apresenta um efeito protetor contra a neurotoxicidade induzida por glutamato (Gepiredman *et al.*, 2000) e o envelhecimento celular (Tajes Orduña *et al.*, 2009). Além disso, a melatonina inibe corrente induzida pela ativação de receptores nicotínicos (Lax *et al.*, 2008) e aumenta a amplitude da corrente de potássio, elevando a migração celular (Liu *et al.*, 2007).

O cerebelo é capaz de sintetizar melatonina por um mecanismo dependente de NF- κ B (Pinato *et al.*, 2013). A injeção de LPS no ventrículo lateral de rato reduz o pico noturno de melatonina no plasma e induz a sua síntese no cerebelo, mas não no córtex e no hipocampo. Além disso, a mesma injeção de LPS induz morte celular apenas no córtex e no hipocampo, mas não no cerebelo, indicando que a produção de melatonina nesse tecido tem um papel citoprotetor.

A partir do embasamento teórico descrito, tendo em vista que a sobrevivência das células granulares de cerebelo em cultura depende de uma atividade basal do NF- κ B e que estas células são alvos da melatonina, indagamos como esta indolamina afeta a atividade do NF- κ B em condição basal ou em culturas desafiadas por agente que ativa a via do NF- κ B.

OBJETIVOS

“A vida se expande ou se encolhe de acordo com a nossa coragem”

Anais Nin

Utilizar um modelo de células neuronais em cultura para avaliar se o efeito da melatonina é dependente do estado fisiopatológico do sistema. Culturas de células granulares de cerebelo foram avaliadas no estado basal e após desafio com LPS.

Objetivos específicos:

- 1) Avaliar se o efeito citoprotetor da melatonina depende do estado de ativação do fator de transcrição NF- κ B nas células granulares de cerebelo.
- 2) Determinar se as células granulares de cerebelo em cultura expressam AA-NAT e produzem melatonina em condição basal ou quando estimuladas por LPS.
- 3)

MATERIAL e MÉTODOS

“Os métodos são as verdadeiras riquezas”

Friedrich Nietzsche

Animais

Ratos Wistar (7 - 8 dias de idade) foram obtidos do biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. Os animais permaneceram alojados em gaiolas de polipropileno mantidas em sala com temperatura e umidade controladas. O ciclo claro-escuro empregado foi de 12:12 horas. Todos os procedimentos seguiram as recomendações e os princípios éticos de experimentação animal, aprovados pelo comitê de ética do instituto (CEUA/IB 110/2010) e foram realizados em conformidade com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (ANEXO 1). Foram utilizados cerca de 250 animais para a realização desse trabalho.

Drogas e Reagentes

As drogas e reagentes utilizados tiveram as seguintes procedências:

- Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, EUA): tripsina; inibidor de tripsina; lipopolisacarídeo (LPS), de *Escherichia coli* sw sorotipo 0127:B8, melatonina, anticorpo anti-coelho conjugado a FITC (F7512), anticorpo de coelho anti-AA-NAT (S0939), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanesulfônico (HEPES), bis-acrilamida (N,N'-

metilenebisacrilamida), brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) e N-acetil-2-benzitriptamina (luzindol).

- Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA): anticorpo policlonal de coelho anti-iNOS (NOS2 (N-20): sc-651 TRITC) e anticorpos para NF- κ B p50 (NLS)X sc-114X, p52 (K-27)X sc-298X, RelA (A)X sc-109X, RelB (C-19)X sc-226X e c-Rel (N)X sc-70X.
- GIBCO BRL Products (Grand Island, NY, EUA): *Dubeco's modified Eagles medium* (DMEM); soro fetal bovino (SFB) e penicilina/estreptomicina.
- Amresco (Solon, Ohio, EUA): Triton X-100.
- Invitrogen Life Technology (Carlsbad, CA, EUA): ditioneitol (DTT), fenilmetanesulfonilfluorido (PMSF) e quinase T4 polinucleotídeo.
- Amersham Bioscience (Buckinghamshire, UK) foram obtidos: sal ácido sódico Poli(deoxinosinico-deoxicidílico) [poli(dIdC)].
- Bio-Rad (Richmond, CA, EUA): acrilamida.
- Calbiochem (Darmstadt, Germany): Nonidet-p40 (NP40).
- Perkin Elmer (Boston, MA, EUA): Easy Tides®: adenosina 5'-trifosfato, [γ^{32} P].
- Promega (Madison, WI, EUA): Oligonucleotídeo consenso para NF- κ B (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3').
- Molecular Probes (Eugene, OR, EUA): diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7' difluorofluoresceína (DAF-FM DA), 1400W.

- IBL international (Hamburg, Alemanha): kit de dosagem de melatonina.

Todos os demais reagentes utilizados apresentavam grau de pureza analítico. A melatonina foi diluída inicialmente em 5 % de etanol, sendo estocada na concentração de 10 mM. Luzindol foi diluído e estocado na concentração de 10 mM em 100% de etanol. DAF-FM foi estocado na concentração de 1 mM em dimetilsulfóxido (DMSO) 100%. Todo o material restante foi diluído, aliquotado e estocado em água deionizada e purificada por sistema Milli-Q. As diluições seguintes foram feitas com as soluções descritas em cada protocolo.

Cultura de Células Granulares de Cerebelo

Os ratos foram decapitados e os cerebelos isolados foram lavados, picotados e incubados em tripsina 0,05 % em solução fisiológica (NaCl 120 mM; KCl 5 mM; KH₂PO₄ 1,2 mM; MgSO₄.7H₂O 1,2 mM; NaHCO₃ 25 mM e glicose 13 mM; pH = 7,4) a 37 °C durante 40 minutos. Na sequência, a dispersão química foi interrompida pela adição de inibidor de tripsina 0,06 % e as células isoladas por dispersão mecânica seguida de centrifugação (300 g, 5 min.) foram plaqueadas em meio DMEM: 13,4 g/L, SFB 10 %, KCl 25 mM, NaHCO₃ 44 mM, penicilina 50 U/mL / estreptomicina 50 µg/mL, na concentração de 5x10⁵ - 5x10⁶ células/poço, mantidas a 37 °C, 5 % CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas e os experimentos foram realizados no 7º ou 8º dia de cultura *in vitro*.

A imunofluorescência utilizando os anticorpos MAP-2 (marcador de neurônio), GFAP (marcador de astrócito) e ED-1 (marcador de microglia) indicaram que a cultura é composta de 80 - 90 % de neurônios (células granulares), 10 - 15 % de astrócitos e 2 - 3 % de microglias, semelhantemente à cultura descrita por Kawamoto e colaboradores (2008).

Protocolos Experimentais

Para avaliar a viabilidade celular as culturas foram incubadas com melatonina (0,1 nM - 1 μ M), LPS (100 ng/mL) ou ambos por 24 horas. Com o intuito de avaliar o papel da expressão da iNOS na viabilidade as células foram incubadas com o bloqueador seletivo 1400W (1 μ M) por 30 minutos antes dos tratamentos com LPS (100 ng/mL) ou melatonina (100 nM), seguindo por mais 24 horas de incubação. E para avaliar o papel da melatonina endógena na viabilidade as células foram incubadas com o antagonista não-seletivo de receptores de melatonina, luzindol (100 nM) durante 24 horas na presença ou ausência de LPS (100 ng/mL).

Para avaliar a atividade do fator de transcrição NF- κ B foi feita uma curva de concentração (10 nM - 1 μ M; 15 min.) e uma curva de tempo (100 nM, 15 - 60 min.) para a melatonina. Além disso, foi avaliado o efeito da melatonina (100 nM) na atividade do NF- κ B induzido por LPS (100 ng/mL) incubados por 15 minutos.

A expressão da iNOS foi induzida por LPS (100 ng/mL), melatonina (30 - 300 nM) ou ambos incubados por 30 - 120 minutos. A produção de NO foi

avaliada após 24 horas de incubação com melatonina (100 nM), LPS (100 ng/mL) ou ambos.

A expressão da AA-NAT foi avaliada por imunocitoquímica em culturas de células incubadas com LPS (100 ng/mL) por 2, 4 e 6 horas. A dosagem de melatonina foi feita no meio de cultura de células incubadas com LPS (30 ng/mL - 1 µg/mL) por 6 ou 12 horas.

Os veículos de melatonina continham 0,005 % de etanol e o de luzindol 0,01 % de etanol.

Viabilidade Celular

Culturas de células de cerebelo foram incubadas por 2 horas com MTT (5 µg/mL, 37 °C), um sal tetrazólio de coloração amarela. O MTT solúvel é reduzido por enzimas oxirredutases dependentes de NADPH transformando-se em um composto formazan insolúvel de coloração violeta. A atividade desta enzima indica, de forma indireta, as células que estão viáveis. Os cristais de formazan foram diluídos com DMSO (30 min. com agitação orbital) e a absorbância da solução violeta foi quantificada em um espectrofotômetro de placa (SpectraMax 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) no comprimento de onda de 540 nm. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem da absorbância medida em células controles.

Ensaio de Eletromobilidade em Gel (*Eletromobility-shift assay - EMSA*)

Proteínas nucleares foram previamente extraídas das culturas de cerebelo como descrito por Ferreira e colaboradores (2005). De forma breve, as culturas foram homogeneizadas em tampão de lise (HEPES 10 mM, KCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,1 mM), centrifugadas (12000 g, 1 min.) duas vezes e ressuspendidas em tampão de extração (HEPES 10 mM, KCl 500 mM, EDTA 1mM, DTT 1 mM, PMSF 0,1 mM). Após incubação de 15 minutos em gelo e centrifugação (2000 g, 5 min.) o sobrenadante contendo a proteína nuclear foi coletado e armazenado a -20 °C. A proteína nuclear total foi quantificada no espectrofotômetro ND-1000 (Nanodrop, Wilmington, DE, EUA) no comprimento de onda de 280 nm. Seis microgramas da proteína foram incubadas em um volume final de tampão de ligação (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; MgCl₂ 1 mM; NaCl 50 mM; DTT 0,5 mM; EDTA 0,5 mM; glicerol 4 %; poli-dIdC 1 µg) por 20 minutos à temperatura ambiente.

Na sequência, cerca de 40000 c.p.m. de sonda de oligonucleotídeo dupla fita contendo a sequência consenso de NF-κB (5' AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC) marcada com γ ATP-³²P foi adicionada por 30 minutos à temperatura ambiente. O complexo DNA-proteína foi analisado em gel não-desnaturante de poliacrilamida 6 % em tampão Tris-borato/EDTA (TBE 0,25x) a 150 V por 2,5 horas. O gel foi seco a vácuo, em seguida, exposto ao filme XAR-5 (Kodak®, Rochester, NY, EUA) por 36 - 48 horas à -70 °C, revelado

(solução reveladora e fixadora Kodak®) e, por último, quantificado densitometricamente no programa ImageJ (*Image Processing and Analysis in Java*).

Para identificar as subunidades do NF- κ B presentes em extratos proteicos nucleares incubamos os extratos protéicos nucleares com 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de anticorpos policlonal de coelho para p50, p52, RelA, RelB e c-Rel por 30 minutos temperatura ambiente. Estes foram incubados juntos aos extratos protéicos (30 min., temperatura ambiente) antes da adição do oligonucleotídeo. As subunidades presentes no extrato se conjugam ao anticorpo formando um complexo que fica retido no início do gel (*super-shift*). O EMSA foi realizado conforme descrito previamente.

Expressão da enzima iNOS

A expressão da enzima iNOS foi determinada de acordo com o protocolo adaptado de Ferrari e colaboradores (2008). Após os tratamentos descritos na sessão de Protocolos Experimentais, as células foram lavadas duas vezes em solução fosfato salina (PBS: NaCl 125 mM, Na₂HPO₄ 2 mM, NaH₂PO₄ 2 mM, KCl 5 mM) e fixadas em metanol/acetona (1:1, 15 min., -20 °C). Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente com 0,2 % de Triton X-100 diluído em PBS. Por fim, as células foram incubadas com anticorpo anti-iNOS (1:50) conjugado ao fluoróforo TRITC e, após 16 - 20 horas à 4 °C, as células foram lavadas três vezes em PBS e as lâminas foram montadas com PBS:glicerol (1:1).

A fluorescência foi analisada em microscopia confocal (LSM 500, Carl Zeiss, New York, NY, EUA) em objetiva de imersão em óleo com aumento de 40 vezes, utilizando o laser HeNe (543 nm) para excitação. Para quantificar a fluorescência, foi utilizado o software LSM510 (Carl Zeiss, LSM510) e apenas as células granulares, que foram identificadas e diferenciadas dos outros tipos celulares presentes na cultura por sua morfologia, foram computadas. Cinco imagens contendo entre 15 - 25 células foram escolhidas aleatoriamente e fotografadas (1024 x 1024 pixels). Todos os parâmetros, incluindo abertura do *pinhole*, velocidade de escaneamento e potência do laser permaneceram os mesmos durante todo o experimento. A expressão da iNOS foi apresentada como porcentagem da média do grupo controle de cada experimento.

Produção de óxido nítrico

O nível de NO foi determinado conforme protocolo descrito previamente por Tamura e colaboradores, 2006. Após os devidos tratamentos (ver sessão Protocolos Experimentais), as células foram incubadas por 50 minutos em solução fisiológica contendo: NaCl 120 mM, KCl 25 mM, NaH₂PO₄ 1,2 mM, MgCl₂ 1,3 mM, CaCl₂ 2 mM, NaHCO₃ 25 mM, glicose 11 mM e L-arginina 10 mM (pH = 7,4), à temperatura ambiente na presença do indicador fluorescente DAF-FM DA (5 µM). O composto fluorescente foi excitado com laser argônio (488 nm) e a fluorescência emitida foi medida a 515 - 530 nm no microscópio confocal utilizando a objetiva de imersão em óleo com aumento de 40 vezes. A

quantificação da fluorescência foi realizada seguindo o mesmo protocolo descrito para a expressão da iNOS, considerando apenas as células granulares. O nível de NO foi expresso como porcentagem em relação ao grupo controle de cada experimento.

Expressão da enzima AA-NAT

A expressão da enzima chave na síntese de melatonina, AA-NAT (anticorpo de coelho anti-AA-NAT c-terminal, Sigma 0689) foi avaliada em células granulares de cerebelo. As células granulares foram identificadas e diferenciadas dos outros tipos celulares por sua morfologia. Após os devidos tratamentos as células foram fixadas com paraformaldeído (4 %, -20 °C), lavadas com PBS, incubadas com solução de bloqueio (PBS, soro albumina bovina, BSA 1 % e glicina 0,3 M, 60 min.). Em seguida, as culturas foram incubadas com anticorpo anti-AA-NAT (1:100) por cerca de 18 horas. Por fim, as células foram lavadas com PBS e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com anticorpo secundário anti-coelho conjugado ao fluorescente FITC (1:200), antes que as lâminas fossem finalmente montadas com PBS e glicerol (1:1).

A fluorescência foi analisada em microscopia confocal (LSM 500, Carl Zeiss, New York, NY, EUA) equipado com objetiva de imersão em óleo com aumento de 40 vezes e o laser argônio (488 nm) para excitação. Para quantificar a fluorescência, foi utilizado o software LSM510 (Carl Zeiss, LSM510). Cinco imagens contendo entre 25 - 40 células granulares foram escolhidas

aleatoriamente e fotografadas (1024 x 1024 pixels). Todos os parâmetro, incluindo abertura do *pinhole*, velocidade de escaneamento e potência do laser permaneceram o mesmo durante todo o experimento. A expressão da AA-NAT foi apresentada como porcentagem da média do grupo controle de cada experimento.

Dosagem de melatonina

A dosagem da melatonina foi feita através de kit comercial de ELISA (IBL, Hamburg, Alemanha).

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. As diferenças entre os grupos experimentais foram testadas por análise de variância seguida do teste de Newman-Keuls quando todos os grupos foram comparados entre si e do teste de Dunnet quando os grupos foram comparados apenas com o grupo controle. O programa utilizado foi o GraphPad Prism® versão 5. (Motulski, 2007).

CONCLUSÕES

“Se queremos progredir, não devemos repetir a história, mas fazer uma história nova”

Mahatma Gandh

1. Melatonina desempenha efeito dual sobre a viabilidade celular dependendo do contexto: protegendo as células dos efeitos neurotóxicos causados pelo LPS ou induzindo morte celular em células não tratadas.
2. Em condição basal as células granulares de cerebelo apresentam dois complexos (C1 e C2) formados por dímeros que contém p50, RelA, RelB e c-Rel;
3. O LPS induz a ativação de diferentes subunidades do NF- κ B ao longo do tempo;
4. A melatonina inibe a translocação nuclear do NF- κ B, bem como reduz a expressão da iNOS e a produção de NO induzidos por LPS;
5. Em condição basal a melatonina induz uma redução transiente do NF- κ B, seguida de um aumento dos níveis nucleares do fator de transcrição;
6. Nesse contexto, a melatonina induz a expressão da iNOS e a produção de NO;
7. O aumento de NO está envolvido na morte celular induzida tanto pelo LPS quanto pela melatonina;
8. Células granulares do cerebelo em cultura expressam AA-NAT e produzem melatonina;
9. Melatonina endógena protege a cultura de células do cerebelo da morte celular induzida por LPS.

RESUMO

Diversos neurônios apresentam uma atividade constitutiva de NF- κ B, o qual desempenha múltiplas funções fisiológicas, além da modulação de respostas patológicas. A melatonina, hormônio produzido ritmicamente pela glândula pineal na fase de escuro, é também um fator autócrino e parácrino envolvido em múltiplos processos biológicos, sendo que a citoproteção é uma ação de destaque dessa molécula. A melatonina inibe a translocação nuclear do NF- κ B e a expressão do seu produto iNOS em modelos de danos celular. No presente trabalho avaliamos se o efeito citoprotetor da melatonina depende do estado de ativação do NF- κ B em cultura de células granulares de cerebelo, tendo em vista que essas células apresentam uma atividade basal deste fator de transcrição fundamental para a sobrevivência das células. Além disso, questionamos se essas células em cultura produziram melatonina e se esta teria algum papel citoprotetor. Testamos a viabilidade da cultura de células granulares de cerebelo de rato (Wistar 7-8 dias de idade) após 24 horas de incubação com melatonina na presença ou ausência de LPS. Em condição basal a melatonina diminuiu a sobrevivência das células e inibiu a morte celular induzida pelo LPS. Este efeito foi compatível com os resultados da ativação do NF- κ B e da expressão da iNOS. Na presença do LPS a melatonina bloqueia a indução da translocação nuclear do NF- κ B, a expressão da iNOS e a produção de NO. Quando apenas a melatonina foi incubada, observamos uma inibição transiente (15 min.) do NF- κ B, seguida por um aumento do conteúdo nuclear do fator de transcrição (60 min.). A expressão da iNOS seguiu o mesmo perfil, ou seja, sofreu uma inibição transiente (30 min.) seguida de um aumento acima do nível basal após 120 minutos de incubação. Portanto, demonstramos que a melatonina afeta de forma diferente a viabilidade de células granulares de cerebelo dependendo do contexto em que as células se encontram. Além disso, obtivemos evidências de que essas células expressam a enzima a AA-NAT, e produzem melatonina, que exerce função protetora para a cultura. Desta forma, nossos dados proporcionam uma base mecanicista para a compreensão da influência do contexto celular na resposta à melatonina.

ABSTRACT

Several neurons constitutively express NF- κ B, which plays some physiological roles, besides the well-known control of pathological responses. Melatonin, the hormone produced by the pineal gland rhythmically in the dark phase is also an autocrine and paracrine factor of immune competent cells, involved in multiple biological processes and the cytoprotective action is a highlight of this molecule. Melatonin inhibits the nuclear translocation of NF- κ B and the expression of iNOS in models of cell damage. The present study evaluated whether the cytoprotective effect of melatonin depends on the state of activation of NF- κ B in cultured cerebellar granule cells, given that these cells have a basal activity of this transcription factor essential for cell survival. Moreover, we questioned whether these cells in culture produce melatonin and whether it would have a cytoprotective role. We tested the viability of the rat (7-8 days old Wistar) cerebellar granule cell culture after 24 h incubation with melatonin in the presence or absence of LPS. In basal condition melatonin decreased cell survival while inhibited cell death induced by LPS. These effects were consistent with the results from the activation of NF- κ B and the expression of iNOS. In the presence of LPS melatonin blocked the activation of the NF- κ B, the expression of iNOS and the production of NO. When only melatonin was incubated, we observed a transient reduction (15 min) of NF- κ B nuclear content, followed by an increase of its nuclear content (60 min). The iNOS expression followed the same profile, i.e. undergone a transient inhibition (30 min), followed by an increase above baseline after 120 min of incubation. Therefore, we have demonstrated that melatonin affects differently the viability of cerebellar granule cells depending on the context. Furthermore, we founded evidences that the granule cells in culture express the key enzyme in the synthesis of melatonin, AA-NAT and produce melatonin, which carries protective function for the culture. Our data provide a mechanistic basis for understanding the influence of cell context on the final output response to melatonin.

REFERÊNCIAS

- ADAMAH-BIASSI, E.B., ZHANG, Y., JUNG, H., VISSAPRAGADA, S., MILLER, R.J. & DUBOCOVICH, M.L. (2014). Distribution of MT1 melatonin receptor promoter-driven RFP expression in the brains of BAC C3H/HeN transgenic mice. *J Histochem Cytochem*, **62**: 70-84.
- AL-GHOUL, W.M., HERMAN, M.D. & DUBOCOVICH, M.L. (1998). Melatonin receptor subtype expression in human cerebellum. *Neuroreport*, **9**: 4063-4068.
- ALONSO, M., COLLADO, P.S. & GONZÁLEZ-GALLEGO, J. (2006). Melatonin inhibits the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase and nuclear factor kappa B activation in rat skeletal muscle. *J. Pineal Res*, **41**: 8-14.
- ARENDDT, J. & SKENE, D.J. (2005). Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med Rev*, **9**: 25-39.
- ASHALL, L., HORTON, C.A., NELSON, D.E., PASZEK, P., HARPER, C.V., SILLITOE, K., RYAN, S., SPILLER, D.G., UNITT, J.F., BROOMHEAD, D.S., KELL, D.B., RAND, D.A., SÉE, V. & WHITE, M.R. (2009). Pulsatile stimulation determines timing and specificity of NF-kappaB-dependent transcription. *Science*, **324**: 242-246.
- AXELROD, J. & WEISSBACH, H. (1960). Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science*, **131**: 1312.
- BEJARANO, I., ESPINO, J., BARRIGA, C., REITER, R.J., PARIENTE, J.A. & RODRÍGUEZ, A.B. (2011). Pro-oxidant effect of melatonin in tumor leucocytes: relation with its cytotoxic and pro-apoptotic effects. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **108**: 14-20.
- BEKYAROVA, G., APOSTOLOVA, M. & KOTZEV, I. (2012). Melatonin protection against burn-induced hepatic injury by down-regulation of nuclear factor kappa B activation. *Int J Immunopathol Pharmacol*, **25**: 591-596.
- BENÍTEZ-KING, G., RÍOS, A., MARTÍNEZ, A. & ANTÓN-TAY, F. (1996). In vitro inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1290**: 191-196.
- BHAKAR, A.L., TANNIS, L.L., ZEINDLER, C., RUSSO, M.P., JOBIN, C., PARK, D.S., MACPHERSON, S. & BARKER, P.A. (2002). Constitutive nuclear factor-kappa B activity is required for central neuron survival. *J Neuroscience*, **22**: 8466-8475.
- Biofactors*, **35**: 183-192.
- BISHOP, A. & ANDERSON, J.E. (2005). NO signalling in the CNS: from the physiological to the pathological. *Toxicology*, **208**: 193-205.

- BLAUSTEIN, M. P. (1975). Effects of potassium, veratridine and scorpion venom on calcium accumulation and transmitter release by nerve terminals in vitro. *J. Physiol*, **247**: 617-655.
- BRUCK, R., AEED, H., AVNI, Y., SHIRIN, H., MATAS, Z., SHAHMUROV, M., AVINOACH, I., ZOZULYA, G., WEIZMAN, N. & HOCHMAN, A. (2004). Melatonin inhibits nuclear factor kappa B activation and oxidative stress and protects against thioacetamide induced liver damage in rats. *J Hepatol*, **40**: 86-93.
- BUBENIK, G.A. (2001). Localization, physiological significance and possible clinical implication of gastrointestinal melatonin. *Biol Signals Recept*, **10**: 350-366.
- BUBENIK, G.A. (2002). Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig Dis Sci*, **47**: 2336-2348.
- BUBENIK, G.A. (2008). Thirty four years since the discovery of gastrointestinal melatonin. *J Physiol Pharmacol*, **59**: 33-51.
- CAHILL, G.M. & BESHARSE, J.C. (1993). Circadian clock functions localized in xenopus retinal photoreceptors. *Neuron*, **10**: 573-577.
- CALABRESE, V., CORNELIUS, C., RIZZARELLI, E., OWEN, J.B., DINKOVA-KOSTOVA, A.T. & BUTTERFIELD, D.A. (2009). Nitric oxide in cell survival: a janus molecule. *Antioxid Redox Signal*, **11**: 2717-2739.
- CARRILLO-VICO, A., CALVO, J.R., ABREU, P., LARDONE, P.J., GARCIA-MAURÍÑO, S., REITER, R.J. & GUERRERO, J.M. (2004). Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J*, **18**: 537-539.
- CARRILLO-VICO, A., LARDONE, P. J., NAJI, L., FERNANDEZ-SANTOS, J. M., MARTIN-LACAVE, I., GUERRERO, J.M. & CALVO, J.R. (2005). Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. *J. Pineal Res*, **39**: 400-408.
- CARVALHO-SOUSA, C.E., DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S., TAMURA, E.K., FERNANDES, P.A., PINATO, L., MUXEL, S.M., CECON, E. & MARKUS, R.P. (2011). Molecular basis for defining the pineal gland and pinealocytes as targets for tumor necrosis factor. *Front Endocrinol*, **2**: 10.

- CECON, E., FERNANDES, P.A., PINATO, L., FERREIRA, Z.S. & MARKUS, R.P. (2010). Daily variation of constitutively activated nuclear factor kappa B (NFkB) in rat pineal gland. *Chronobiol Int*, **27**: 52-67.
- CHAE, H.D., PARK, T.J., LEE, Y.K., LEE, T.G. & KIM, K.T. (1999). Rapid and simple measurement of serotonin N-acetyltransferase activity by liquid biphasic diffusion assay. *Neurochem Int*, **35**: 447-441.
- CHEN, W. & BALER, R. (2000). The rat arylalkylamine N-acetyltransferase E-box: differential use in a master vs. a slave oscillator. *Brain Res Mol Brain Res*, **81**: 43-50.
- CHETSAWANG, B., PUTTHAPRASART, C., PHANSUWAN-PUJITO, P., GOVITRAPONG, P. (2006). Melatonin protects against hydrogen peroxide-induced cell death signaling in SH-SY5Y cultured cells: involvement of nuclear factor kappa B, Bax and Bcl-2. *J Pineal Res*, **41**: 116-123.
- CHIK, C.L. & HO, A.K. (1989). Multiple receptor regulation of cyclic nucleotides in rat pinealocytes. *Prog Biophys Mol Biol*, **53**: 197-203.
- COLASANTI, M., PERSICHINI, T., MENEGAZZI, M., MARIOTTO, S., GIORDANO, E., CALDARERA, C.M., SOGOS, V., LAURO, G.M. & SUZUKI, H. (1995). Induction of nitric oxide synthase mRNA expression. Suppression by exogenous nitric oxide. *J Biol Chem*, **270**: 26731-26733.
- COSTA, E.J., LOPES, R.H. & LAMY-FREUND, M.T. (1995). Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J Pineal Res*, **19**: 123-126.
- COURTOIS, G. & GILMORE, T.D. (2006). Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene*, **25**: 6831-6943.
- CRISTOFANON, S., UGUCCIONI, F., CERELLA, C., RADOGNA, F., DICATO, M., GHIBELLI, L. & DIEDERICH, M. (2009). Intracellular prooxidant activity of melatonin induces a survival pathway involving NF-kappaB activation. *Ann N Y Acad Sci*, **1171**: 472-478.
- CUESTA, S., KIREEV, R., GARCÍA, C., FORMAN, K., ESCAMES, G., VARA, E. & TRESGUERRES, J.A. (2011). Beneficial effect of melatonin treatment on inflammation, apoptosis and oxidative stress on pancreas of a senescence accelerated mice model. *Mech Ageing Dev*, **132**: 573-582.

- D'MELLO, S.R., GALLI, C., CIOTTI, T. & CAHSSANO, P. (1993). Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-growth factor I and CAMP. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**: 10989-10993.
- DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S., CARVALHO-SOUSA, C.E., TAMURA, E.K., PINATO, L., CECON, E., FERNANDES, P.A., AVELLAR, M.C., FERREIRA, Z.S. & MARKUS, R.P. (2010). TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFkB pathway. *J Pineal Res*, **49**: 183-192.
- DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S., PINATO, L., TAMURA, E.K., CARVALHO-SOUSA, C.E. & MARKUS RP. (2012). Glia-pinealocyte network: the paracrine modulation of melatonin synthesis by tumor necrosis factor (TNF). *PLoS One*, **7**: e40142.
- DAI, J., RAM, P.T., YUAN, L., SPRIGGS, L.L. & HILL, S.M. (2001). Transcriptional repression of RORalpha activity in human breast cancer cells by melatonin. *Mol Cell Endocrinol*, **176**: 111-120.
- DELATORRE, A., SCHROEDER, R.A., PUNZALAN, C. & KUO, P.C. (1999). Endotoxin-mediated S-nitrosylation of p50 alters NF-kappa B-dependent gene transcription in ANA-1 murine macrophages. *J Immunol*, **162**: 4101-4108.
- ESPOSITO, E. & CUZZOCREA, S. (2010). Antiinflammatory activity of melatonin in central nervous system. *Curr Neuropharmacol*, **8**: 228-442.
- FERNANDES, P.A.C.M. & MARKUS, R.P. (2011). Melatonin and inflammation – the role of the immune-pineal axis and the sympathetic tónus. In: Melatonin in the promotion of health 2nd ed., cap. **28**: 435-450.
- FERRARI, M.F., RAIZADA, M.K. & FIOR-CHADI, D.R. (2008). Differential regulation of the renin-angiotensin system by nicotine in WKY and SHR glia. *J Mol Neurosci*, **35**: 151-160.
- FERREIRA, Z.S., FERNANDES, P.A., DUMA, D., ASSREUY, J., AVELLAR, M.C., MARKUS, R.P. (2005). Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. *J Pineal Res*, **38**: 182-188.
- FINK, T., GLAS, M., WOLF, A., KLEBER, A., REUS, E., WOLFF, M., KIEFER, D., WOLF, B., RENSING, H., VOLK, T. & MATHES, A.M. (2014). Melatonin receptors mediate improvements of survival in amodel of polymicrobial sepsis. *Crit Care Med*, **42**: e22-31.

- GALANO, A., TAN, D.X. & REITER, R.J. (2011). Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res*, **51**: 1-16.
- GALANO, A., TAN, D.X. & REITER, R.J. (2013). On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *J Pineal Res*, **54**: 245-257.
- GALLI, C., MEUCCI, O., SCORZIELLO, A., WERGE, T.M., CALISSANO, P. & SCHETTINI, G. (1995). 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. *J Neurosci*, **15**: 1172-1179.
- GALLO, V., KINGSBURY, A., BALÁZS, R. & JØRGENSEN, O.S. (1987). The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci*, **7**: 2203-2213.
- GAUDET, S., PALKOVITS, M. & NAMBOODIRI, M.A. (1991). Regional distribution of arylamine and arylalkylamine N-acetyltransferase activities in the rat brain. *Brain Res*, **539**: 355-357.
- GEPDIREMEN, A., DÜZENLI, S., HACIMÜFTÜOĞLU, A., BULUCU, D. & SÜLEYMAN, H. (2000). The effects of melatonin in glutamate-induced neurotoxicity of rat cerebellar granular cell culture. *Jpn J Pharmacol*, **84**: 467-469.
- GERN, W.A & RALPH, C.L. (1979). Melatonin synthesis by the retina. *Science*, **204**: 183-184.
- GHEB, C. & THACH, T. (2000). The cerebellum. In: Principles of Neurosciences. Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. McGraw-Hill, 4th ed., cap. 42.
- GILAD, E., WONG, H.R., ZINGARELLI, B., VIRÁG, L., O'CONNOR, M., SALZMAN, A.L. & SZABÓ, C. (1998). Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFkappaB activation. *FASEB J*, **12**: 685-693.
- GILMORE, T.D., WOLENSKI, F.S. (2012). NF-κB: where did it come from and why? *Immunol Rev*, **246**: 14-35.
- GRIVICICH, I., REGNER, A. & ROCHA, A.B. (2007). Morte celular por apoptose. *Rev Bras Canc*, **53**: 335-343.
- HARDELAND R. (2009). Melatonin: signaling mechanisms of a pleiotropic agent. *Biofactors*, **35**: 183-192.

- HARDELAND, R. (2012). Neurobiology, pathophysiology, and treatment of melatonin deficiency and dysfunction. *Scientific World Journal*, **2012**: 640389.
- HASHIMOTO, M. & HIBI, M. (2012). Development and evolution of cerebellar neural circuits. *Dev Growth Differ*, **54**: 373-389.
- HAYDEN, M.S. & GHOSH, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*, **18**: 2195-224.
- HAYDEN, M.S. & GHOSH, S. (2012). NF-κB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev*, **26**: 203-234.
- HUSSON, I., MESPLÈS, B., BAC, P., VAMECQ, J., EVRARD, P. & GRESSENS, P. (2002). Melatonergic neuroprotection of the murine periventricular white matter against neonatal excitotoxic challenge. *Ann Neurol*, **51**: 82-92.
- IMBESI, M., UZ, T., DZITOEVA, S., GIUSTI, P. & MANEV, H. (2008). Melatonin signaling in mouse cerebellar granule cells with variable native MT1 and MT2 melatonin receptors. *Brain Res*, **1227**: 19-25.
- IUVONE, P.M., TOSINI, G., HAQUE, R., KLEIN, D.C. & CHAURASIA, S.S. (2005). Circadian Clocks, Clock-Controlled Genes and Melatonin Biosynthesis in the Retina. *Prog Retin Eye Res*, **24**: 433-456.
- IVERSEN L. (2006). Julius Axelrod: 20 May 1912 - 29 December 2004. *Biogr Mem Fellows R Soc*, **52**: 1-13.
- JANG, S.W., LIU, X., PRADOLDEJ, S., TOSINI, G., CHANG, Q., IUVONE, P.M. & YE, K. (2010). N-acetylserotonin activates TrkB receptor in a circadian rhythm. *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**: 3876-3881.
- JIANG-SHIEH, Y.F., WU, C.H., CHIEN, H.F., WEI, I.H., CHANG, M.L., SHIEH, J.Y. & WEN, C.Y. (2005). Reactive changes of interstitial glia and pinealocytes in the rat pineal gland challenged with cell wall components from gram-positive and -negative bacteria. *J Pineal Res*, **38**: 17-26.
- JIMENEZ-JORGE, S., GUERRERO, J.M., JIMENEZ-CALIANI, A.J., NARANJO, M.C., LARDONE, P.J., CARRILLO-VICO, A., OSUNA, C. & MOLINERO, P. (2006). Evidence for melatonin synthesis in the rat brain during development. *J Pineal Res*, **42**: 240-246.
- KALTSCHMIDT, B., WIDERA, D. & KALTSCHMIDT, C. (2005). Signaling via NF-κB in the nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1745**: 287-299.

- KAUR, C., SIVAKUMAR, V., ZHANG, Y. & LING, E.A. (2006). Hypoxia-induced astrocytic reaction and increased vascular permeability in the rat cerebellum. *Glia*, **54**: 826-839.
- KAWAMOTO, E.M., LEPSCH, L.B., BOAVENTURA, M.F., MUNHOZ, C.D., LIMA, L.S., YSHII, L.M., AVELLAR, M.C., CURI, R., MATTSON, M.P. & SCAVONE, C. (2008). Amyloid beta-peptide activates nuclear factor-kappaB through an N-methyl-D-aspartate signaling pathway in cultured cerebellar cells. *J Neurosci Res*, **86**: 845-860.
- KLEIN, D.C. (1985). Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. In Everet, D & Clark, D. (eds), *Photoperiodism, Melatonin and the Pineal*. *Ciba Foundation Symposium*, **117**: 38-56.
- KLEIN, D.C., AUERBACH, D.A., NAMBOODIRI, M.A.A. & WHEELER, G.H.T. (1981). Indole metabolism in the mammalian pineal gland. *The Pineal Gland*, 199-227.
- KOH, P.O. (2008). Melatonin regulates nitric oxide synthase expression in ischemic brain injury. *J Vet Med Sci*, **70**: 747-750.
- KOULICH, E., NGUYEN, T., JOHNSON, K., GIARDINA, C. & D'MELLO, S. (2001). NF-kappaB is involved in the survival of cerebellar granule neurons: association of IkappaBbeta [correction of Ikappabeta] phosphorylation with cell survival. *J Neurochem*, **76**: 1188-1198.
- LANOIX, D., LACASSE, A.A., REITER, R.J. & VAILLANCOURT, C. (2012). Melatonin: the smart killer: the human trophoblast as a model. *Mol Cell Endocrinol*, **348**: 1-11.
- LAUDON, M., NIR, I. & ZISAPEL, N. (1988). Melatonin receptors in discrete brain areas of the male rat. Impact of aging on density and on circadian rhythmicity. *Neuroendoc*, **48**: 577-583.
- LAX, P. (2008). Melatonin inhibits nicotinic currents in cultured rat cerebellar granule neurons. *J Pineal Res*, **44**: 70-77.
- LEE, S.J., LIU, T., CHATTORAJ, A., ZHANG, S.L., WANG, L., LEE, T.M., WANG, M.M. & BORJIGIN, J. (2009). Posttranscriptional regulation of pineal melatonin synthesis in *Octodon degus*. *J Pineal Res*, **47**: 75-81.
- LEÓN, J., MACÍAS, M., ESCAMES, G., CAMACHO, E., KHALDY, H., MARTÍ, M., ESPINOSA, A., GALLO, M. A. & ACUÑA-CASTROVIEJO, D. (2000). Structure related

inhibition of calmodulin-dependent neuronal nitric-oxide synthase activity by melatonin and synthetic kynurenines. *Mol. Pharmacol*, **58**: 967-975.

LERNER, A.B., TAKAHASHI, Y., LEE, T.H., & MORI, W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc*, **80**: 2587.

LEZOUALCH, F., SPARAPANI, M. & BEHL, C. (1998). N-acetyl-serotonin (normelatonin) and melatonin protect neurons against oxidative challenges and suppress the activity of the transcription factor NF-kappaB. *J Pineal Res*, **24**: 168-78.

LILIENBAUM, A. & ISRAËL, A. (2003). From calcium to NF-kappa B signaling pathways in neurons. *Mol Cell Biol*, **23**: 2680-2698.

LIU, C., FUKUHARA, C., WESSEL, J.H., IUVONE, P.M. & TOSINI, G. (2004). Localization of Aa-nat mRNA in the rat retina by fluorescence in situ hybridization and laser capture microdissection. *Cell Tissue Res*, **315**: 197-201.

LIU, LY., HOFFMAN, G.E., FEI, XW., LI, Z., ZHANG, ZH. & MEI, YA. (2007). Delayed rectifier outward K⁺ current mediates the migration of rat cerebellar granule cells stimulated by melatonin. *Journal of Neurochemistry*, **102**: 333-344.

LOTUFO, C.M., LOPES, C., DUBOCOVICH, M.L., FARSKY, S.H. & MARKUS, R.P. (2001). Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur J Pharmacol*, **430**: 351-357.

LOTUFO, C.M., YAMASHITA, C.E., FARSKY, S.H. & MARKUS, R.P. (2006). Melatonin effect on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B₄. *Eur J Pharmacol*, **534**: 258-263.

LUCHETTI, F., CANONICO, B., BETTI, M., ARCANGELETTI, M., PILOLLI, F., PIRODDI, M., CANESI, L., PAPA, S. & GALLI, F. (2010). Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J*, **24**: 3603-3624.

MALDONADO, M.D., MORA-SANTOS, M., NAJI, L. NAJI, L., CARRASCOSA-SALMORAL, M.P., NARANJO, M.C. & CALVO, J.R. (2010). Evidence of melatonin synthesis and release by mast cells. Possible modulatory role on inflammation. *Pharmacol Res*, **62**: 282-287.

MARKUS, R.P. & FERREIRA, Z.S. (2011). The Immune-Pineal Axis: the Role of Pineal and Extra-Pineal Melatonin in Modulating Inflammation. *Advances in Neuroimmune Biology*, **1**: 95-104.

- MARKUS, R.P., CECON, E. & PIRES-LAPA, M.A. (2013). Immune-Pineal Axis: Nuclear Factor κ B (NF- κ B) Mediates the Shift in the Melatonin Source from Pinealocytes to Immune Competent Cells. *Int J Mol Sci*, **14**: 10979-10997.
- MARKUS, R.P., FERREIRA, Z.S., FERNANDES, P.A. & CECON, E. (2007). The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *Neuroimmunomodulation*, **14**: 126-133.
- MARTINS, E., FERREIRA, A.C.F., SKORUPA, A.L., AFECHÉ, S.C., CIPOLLA-NETO, J. & COSTA-ROSA, L.F.B.P. (2004). Tryptophan consumption and indoleamines production by peritoneal cavity macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, **75**: 1116-1121.
- MATTHEWS, J.R., BOTTING, C.H., PANICO, M., MORRIS, H.R. & HAY, R.T. (1996). Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res*, **24**: 2236-2242.
- MATTSON, M. P., C. CULMSEE, Z. YU, & S. CAMANDOLA. (2000). Roles of nuclear factor κ B in neuronal survival and plasticity. *J. Neurochem*, **74**: 443- 456.
- MENENDEZ-PELAEZ, A. & REITER, R.J. (1993). Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J Pineal Res*, **15**: 59-69.
- MIN, K.J., JANG, J.H. & KWON, T.K. (2012). Inhibitory effects of melatonin on the lipopolysaccharide-induced CC chemokine expression in BV2 murine microglial cells are mediated by suppression of Akt-induced NF- κ B and STAT/GAS activity. *J Pineal Res*, **52**: 296-304.
- MOORE, R.Y. & KLEIN, D.C. (1974). Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Brain Res*, **71**: 17-33.
- MOTULSKY, H.J. (2007). Prism 5 Statistics Guide, 2007, GraphPad Software Inc., San Diego CA, www.graphpad.com.
- MUXEL, S.M., PIRES-LAPA, M.A., MONTEIRO, A.W., CECON, E., TAMURA, E.K., FLOETER-WINTER, L.M. & MARKUS, R.P. (2012). NF- κ B drives the synthesis of melatonin in RAW 264.7 macrophages by inducing the transcription of the arylalkylamine-N-acetyltransferase (AA-NAT) gene. *PLoS One*, **7**: e52010.
- NARANJO, M.C., GUERRERO, J.M., RUBIO, A., LARDONE, P.J., CARRILLO-VICO, A., CARRASCOSA-SALMORAL, M.P., JIMÉNEZ-JORGE, S., ARELLANO, M.V., LEAL-

- NOVAL, S.R., LEAL, M., LISSEN, E. & MOLINERO, P. (2007). Melatonin biosynthesis in the thymus of humans and rats. *Cell Mol Life Sci*, **64**: 781-790.
- NEGI, G., KUMAR, A. & SHARMA, S.S. (2011). Melatonin modulates neuroinflammation and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy: effects on NF- κ B and Nrf2 cascades. *J Pineal Res*, **50**: 124-131.
- NELSON, D.E., IHEKWABA, A.E., ELLIOTT, M., JOHNSON, J.R., GIBNEY, C.A., FOREMAN, B.E., NELSON, G., SEE, V., HORTON, C.A., SPILLER, D.G., EDWARDS, S.W., MCDOWELL, H.P., UNITT, J.F., SULLIVAN, E., GRIMLEY, R., BENSON, N., BROOMHEAD, D., KELL, D.B., WHITE, M.R. (2004). Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science*, **306**: 704-708.
- NEUMANN, M. & NAUMANN, M. (2007). Beyond IkappaBs: alternative regulation of NF-kappaB activity. *FASEB J*, **21**: 2642-2654.
- NOSJEAN, O., FERRO, M., COGE, F., BEAUVERGER, P., HENLIN, J. M., LEFOULON, F., FAUCHERE, J. L., DELAGRANGE, P., CANET, E. & BOUTIN, J. A. (2000). Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J. Biol. Chem.* **275**: 31311-31317.
- ORTIZ, G.G., BENÍTEZ-KING, G.A., ROSALES-CORRAL, S.A., PACHECO-MOISÉS, F.P. & VELÁZQUEZ-BRIZUELA, I.E. (2008). Cellular and biochemical actions of melatonin which protect against free radicals: role in neurodegenerative disorders. *Curr Neuropharmacol*, **6**: 203-214.
- OXENKRUG, G. (2005). Antioxidant effects of N-acetylserotonin: possible mechanisms and clinical implications. *Ann N Y Acad Sci*, **1053**: 334-347.
- PANDI-PERUMAL, S.R., BAHAMMAM, A.S., BROWN, G.M., SPENCE, D.W., BHARTI, V.K., KAUR, C., HARDELAND, R. & CARDINALI, D.P. (2013). Melatonin antioxidative defense: therapeutical implications for aging and neurodegenerative processes. *Neurotox Res*, **23**: 267-300.
- PANDI-PERUMAL, S.R., SRINIVASAN, V., MAESTRONI, G.J.M, CARDINALI, D.P., POEGGELER, B. & HARDELAND, R. (2006). Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS Journal*, **273**: 2813-2838.

- PANDI-PERUMAL, S.R., TRAKHT, I., SRINIVASAN, V., SPENCE, D.W., MAESTRONI, G.J., ZISAPEL, N. & CARDINALI, D.P. (2008). Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol*, **85**: 335-353.
- PARK, O.K., YOO, K.Y., LEE, C.H., CHOI, J.H., HWANG, I.K., PARK, J.H., KWON, Y.G., KIM, Y.M. & WON, M.H. (2010). Arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) is expressed in astrocytes and melatonin treatment maintains AANAT in the gerbil hippocampus induced by transient cerebral ischemia. *J Neurol Sci*, **294**: 7-17.
- PARK, S.K., LIN, H.L. & MURPHY, S. (1994). Nitric oxide limits transcriptional induction of nitric oxide synthase in CNS glial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **201**: 762-768.
- PARK, S.W., HUQ, M.D., HU, X. & WEI, L.N. (2005). Tyrosine nitration on p65: a novel mechanism to rapidly inactivate nuclear factor-kappaB. *Mol Cell Proteomics*, **4**: 300-309.
- PAUL, S.M., HSU, L.L. & MANDELL, A.J. (1974). Extrapyramidal N-acetyltransferase activity in rat brain. *Life Sci*, **15**: 2135-2143.
- PENG, H.B., LIBBY, P. & LIAO, J.K. (1995). Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem*, **270**: 14214-14219.
- PERREAU, V.M., BONDY, S.C., COTMAN, C.W., SHARMAN, K.G. & SHARMAN, E.H. (2007). Melatonin treatment in old mice enables a more youthful response to LPS in the brain. *J Neuroimmunol*, **182**: 22-31.
- PINATO, L., DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S., FRANCO, D.G., CAMPOS, L.M., CECON, E., FERNANDES, P.A., BITTENCOURT, J.C. & MARKUS, R.P. (2013). Selective protection of the cerebellum against intracerebroventricular LPS is mediated by local melatonin synthesis. *Brain Struct Funct*, in press.
- PIRES-LAPA, M.A., TAMURA, E.K., SALUSTIANO, E.M. & MARKUS, R.P. (2013). Melatonin synthesis in human colostrum mononuclear cells enhances dectin-1-mediated phagocytosis by mononuclear cells. *J Pineal Res*, **55**: 240-246.
- PIZZA V., AGRESTA, A., D'ACUNTO, C.W., FESTA, M. & CAPASSO, A. (2011). Neuroinflammation and ageing: current theories and an overview of the data. *Rev Recent Clin Trials*, **6**: 189-203.
- PONTES, G.N., CARDOSO, E.C., CARNEIRO-SAMPAIO, M.M. & MARKUS, R.P. (2006). Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine

(phagocytes) - melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. *J Pineal Res*, **41**: 136-141.

PONTES, G.N., CARDOSO, E.C., CARNEIRO-SAMPAIO, M.M. & MARKUS, R.P. (2007). Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF- α increase after cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. *J Pineal Res*, **43**: 365-371.

PSARAKIS, S., PULIDO, O.M., BROWN, G.M., GROTA, L.J. & SMITH, G.K. (1982). Identification and quantification of n-acetylserotonin (NAS) in the developing hippocampus of the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **6**: 439-422.

RADOGNA, F., PATERNOSTER, L., ALBERTINI, M.C., CERELLA, C., ACCORSI, A., BUCCHINI, A., SPADONI, G., DIAMANTINI, G., TARZIA, G., DE NICOLA, M., D'ALESSIO, M. & GHIBELLI, L. (2007). Melatonin antagonizes apoptosis via receptor interaction in U937 monocytic cells. *J Pineal Res*, **43**: 154-62.

RADOGNA, F., PATERNOSTER, L., DE NICOLA, M., CERELLA, C., AMMENDOLA, S., BEDINI, A., TARZIA, G., AQUILANO, K., CIRIOLO, M. & GHIBELLI, L. (2009). Rapid and transient stimulation of intracellular reactive oxygen species by melatonin in normal and tumor leukocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*, **239**: 37-45.

RAO, P., HAYDEN, M.S., LONG, M., SCOTT, M.L., WEST, A.P., ZHANG, D., OECKINGHAUS, A., LYNCH, C., HOFFMANN, A., BALTIMORE, D. & GHOSH, S. (2010). I κ B β acts to inhibit and activate gene expression during the inflammatory response. *Nature*, **466**: 1115-1119.

RAWASHDEH, O. & MARONDE, E. (2012). The hormonal Zeitgeber melatonin: role as a circadian modulator in memory processing. *Front Mol Neurosci*, **5**: 27.

RAWASHDEH, O., DE BORSETTI, N.H., ROMAN, G. & CAHILL, G.M. (2007). Melatonin suppresses nighttime memory formation in zebrafish. *Science*, **318**: 1144-1146.

REYNAERT, N.L., CKLESS, K., KORN, S.H., VOS, N., GUALA, A.S., WOUTERS, E.F., VAN DER VLIET, A. & JANSSEN-HEININGER, Y.M. (2004). Nitric oxide represses inhibitory κ B kinase through S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**: 8945-8950.

SABBAN, E.L., NANKOVA, B.B., SEROVA, L.I., KVETNANSKY, R. & LIU, X. (2004). Molecular regulation of gene expression of catecholamine biosynthetic enzymes by stress: sympathetic ganglia versus adrenal medulla. *Ann N Y Acad Sci*, **1018**: 370-377.

- SAINZ, R.M., MAYO, J.C., RODRIGUEZ, C., TAN, D.X., LOPEZ-BURILLO, S. & REITER, R.J. (2003). Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell Mol Life Sci*, **60**: 1407-1426.
- SAINZ, R.M., REITER, R.J., TAN, D.X., ROLDAN, F., NATARAJAN, M., QUIROS, I., HEVIA, D., RODRIGUEZ, C. & MAYO, J.C. (2008). Critical role of glutathione in melatonin enhancement of tumor necrosis factor and ionizing radiation-induced apoptosis in prostate cancer cells in vitro. *J Pineal Res*, **45**: 258-270.
- SAKAMOTO, K., LIU, C. & TOSINI, G. (2004). Circadian Rhythms in the retina of rats with photoreceptor degeneration. *J Neurochemistry*, **90**: 1019-1024.
- SAKAMOTO, K., OISHI, K., SHIRAISHI, M., HAMANO, S., OTSUKA, H., MIYAKE, Y. & ISHIDA, N. (2000). Two circadian oscillatory mechanisms in the mammalian retina. *Neuroreport*, **11**: 3995-3997.
- SATO, I., HIMI, T. & MUROTA, S. (1996). Lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase activity in cultured cerebellar granule neurons. *Neuroscience Letters*, **205**: 45-48.
- SATO, I., KIM, Y., HIMI, T. & MUROTA, S. (1995). Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in cultured cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett*, **184**: 145-148.
- SEABRA, M.L.V., BIGNOTTO, M., PINTO, JR. L.R. & TUFIK, S. (2000). Randomized, double-blind clinical trial, controlled with placebo, of the toxicology of chronic melatonin treatment *J. Pineal Res*, **29**: 193-200.
- SEN, R. & BALTIMORE, D. (1986). Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell*, **47**: 921-928.
- SEROVA, L.I., GUEORGUIEV, V., CHENG, S.Y. & SABBAN, E.L. (2008). Adrenocorticotrophic hormone elevates gene expression for catecholamine biosynthesis in rat superior cervical ganglia and locus coeruleus by an adrenal-independent mechanism. *Neuroscience*, **153**: 1380-1389.
- SHIDA, C.S., CASTRUCCI, A.M. & LAMY-FREUND, M.T. (1994). High melatonin solubility in aqueous medium. *J Pineal Res*, **16**: 198-201.
- SIMONNEAUX, V. & RIBELAYGA, C. (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev*, **55**: 325-395.

- SKWARLO-SONTA, K., MAJEWSKI, P., MARKOWSKA, M., OBLAP, R. & OLSZANSKA, B. (2003). Bidirectional communication between the pineal gland and the immune system. *Can J Physiol Pharmacol*, **81**: 342.
- SOLÍS HERRUZO, J.A. & SOLÍS MUÑOZ, P. (2009). Melatonin and oxidative stress. *Rev Esp Enferm Dig*, **101**: 453-459.
- SOTO-MOYANO, R., BURGOS, H., FLORES, F., VALLADARES, L., SIERRALTA, W., FERNÁNDEZ, V., PÉREZ, H., HERNÁNDEZ, P. & HERNÁNDEZ, A. (2006). Melatonin administration impairs visuo-spatial performance and inhibits neocortical long-term potentiation in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, **85**: 408-414.
- SRINIVASAN, V., MAESTRONI, G.J., CARDINALI, D.P., ESQUIFINO, A.I., PERUMAL, S.R. & MILLER, S.C. (2005). Melatonin, immune function and aging. *Immun Ageing*, **2**: 17.
- STEFULJ, J., HÖRTNER, M., GHOSH, M., SCHAUENSTEIN, K., RINNER, I., WÖFLER, A., SEMMLER, J. & LIEBMANN, P.M. (2001). Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res*, **30**: 243-247.
- TAJES ORDUÑA, M., PELEGRÍ GABALDA, C., VILAPLANA HORTENSI, J., PALLÀS LLIBERIA, M. & CAMINS ESPUNY, A. (2009). An evaluation of the neuroprotective effects of melatonin in an in vitro experimental model of age-induced neuronal apoptosis. *J Pineal Res*, **46**: 262-267.
- TAKAHASHI, Y. & OKADA, T. (2011). Involvement of the nitric oxide cascade in melatonin-induced inhibition of long-term potentiation at hippocampal CA1 synapses. *Neurosci Res*, **69**: 1-7.
- TAMURA, E.K., CECON, E., MONTEIRO, A.W., SILVA, C.L. & MARKUS, R.P. (2009). Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells. *J Pineal Res*, **46**: 268-274.
- TAMURA, E.K., SILVA, C.L. & MARKUS, R.P. (2006). Melatonin inhibits endothelial nitric oxide production in vitro. *J Pineal Res*, **41**: 267-274.
- TAN, D.X., MANCHESTER, L.C., SANCHEZ-BARCELO, E., MEDIAVILLA, M.D. & REITER, R.J. (2010). Significance of high levels of endogenous melatonin in Mammalian cerebrospinal fluid and in the central nervous system. *Curr Neuropharmacol*, **8**: 162-167.

TOBIN, V.A., MCCANCE, I., COLEMAN, H.A. & PARKINGTON, H.C. (2002). How important is stimulation of alpha-adrenoceptors for melatonin production in rat pineal glands? *J Pineal Res*, **32**: 219-224.

TOGASHI, H., SASAKI, M., FROHMAN, E., TAIRA, E., RATAN, R.R., DAWSON, T.M. & DAWSON, V.L. (1997). Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor kappaB activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**: 2676-2680.

TOMÁS-ZAPICO, C. & COTO-MONTES, A. (2005). A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res*, **39**: 99-104.

TOSINI, G., BABA, K., HWANG, C.K. & IUVONE, P.M. (2012a). Melatonin: an underappreciated player in retinal physiology and pathophysiology. *Exp Eye Res*. **103**: 82-89.

TOSINI, G., YE, K. & IUVONE, P.M. (2012b). N-acetylserotonin: neuroprotection, neurogenesis, and the sleepy brain. *Neuroscientist*, **18**: 645-653.

TRICOIRE, H., LOCATELLI, A., CHEMINEAU, P. & MALPAUX, B. (2002). Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology*, **143**: 84-90.

TRIPATHI, D.N. & JENA, G.B. (2010). Effect of melatonin on the expression of Nrf2 and NF-kappaB during cyclophosphamide-induced urinary bladder injury in rat. *J Pineal Res*, **48**: 324-331.

TSIEN, R.W. (1983). Calcium channel in excitable cell membrane. *Ane. Re. Physiol*, **42**: 341 - 381.

TURNER, D.A., PASZEK, P., WOODCOCK, D.J., NELSON, D.E., HORTON, C.A., WANG, Y., SPILLER, D.G., RAND, D.A., WHITE, M.R. & HARPER, C.V. (2010). Physiological levels of TNFalpha stimulation induce stochastic dynamics of NF-kappaB responses in single living cells. *J Cell Sci*, **123**: 2834-2843.

UZ, T., QU, T., SUGAYA, K. & MANEV, H. (2002). Neuronal expression of arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) mRNA in the rat brain. *Neurosci Res*, **42**: 309-316.

WANG, L.M., SUTHANA, N.A., CHAUDHURY, D., WEAVER, D.R. & COLWELL, C.S. (2005). Melatonin inhibits hippocampal long-term potentiation. *Eur J Neurosci*, **22**: 2231-2237.

- WANG, Z., WU, L., YOU, W., JI, C. & CHEN, G. (2013). Melatonin alleviates secondary brain damage and neurobehavioral dysfunction after experimental subarachnoid hemorrhage: possible involvement of TLR4-mediated inflammatory pathway. *J Pineal Res*, **55**: 399-408.
- WEISSBACH, H., REDFIELD, B.G. & AXELROD, J. (1960). Biosynthesis of melatonin: enzymic conversion of serotonin to N-acetylserotonin. *Biochim Biophys Acta*, **43**: 352-353.
- WIECHMANN, A.F. & O'STEEN, W.K. (1992). Melatonin increases photoreceptor susceptibility to light-induced damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **33**: 1894-1902.
- WITT-ENDERBY, P. A., BENNETT, J., JARZYNKA, M. J., FIRESTINE, S. & MELAN, M.A. (2003). Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life. Sci.* **72**: 2183-2198.
- XIAO, W. (2004). Advances in NF- κ B signaling transduction and transcription. *Cellular & Molecular Immunology*, **1**: 425-433.
- YALCIN, A., KANIT, L., & SOZMEN, E.Y. (2004). Altered gene expressions in rat hippocampus after kainate injection with or without melatonin pre-treatment. *Neurosci. Lett.* **359**: 65-68.
- ZLOTOS, D.P., JOCKERS, R., CECON, E., RIVARA, S. & WITT-ENDERBY, P.A. (2013). MT(1) and MT(2) Melatonin Receptors: Ligands, Models, Oligomers, and Therapeutic Potential. *J Med Chem*, *in press*.

ANEXO I



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

OF. CEA/IB/020/2010
Ref. 2010.1.431.41.0

São Paulo, 22 de abril de 2010.

Prezada Senhora

Dirijo-me a V. Sa. para informar que a Comissão de Ética em Uso de Animais Vertebrados em Experimentação do IB, em reunião realizada no dia 20/04/2010, **APROVOU** o Projeto "Eixo Imuno-Pineal: efeito modulador da melatonina sobre a ativação da via NFkB em culturas de células cerebelares" – **Protocolo 110/2010**, de sua responsabilidade (Colaboradora: Daiane Gil Franco).

Atenciosamente.

Prof.ª Dra. Eleonora Trigano

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

Ilma. Sra.

Prof.ª Dra. REGINA PEKELMANN MARKUS

Departamento de Fisiologia do IBUSP.

Rua do Matão - Travessa 14 nº 321 - CEP 05508-090 - Cidade Universitária
São Paulo - Brasil - <http://www.ib.usp.br>