

MICHELLE ACCO GOMES

Modulação da produção de melatonina em  
glândulas pineais de ratos por heparan sulfato

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Pekelmann Markus

Versão original

São Paulo  
2016

## RESUMO

Acco M. Modulação da produção de melatonina em glândulas pineais de ratos por ativação de receptores do tipo toll 4 (TLR4) por heparan sulfato. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

A síntese noturna de melatonina pela glândula pineal é inibida por padrões moleculares associados a patógenos ou a danos, como por exemplo lipopolissacarídeo (LPS) ou peptídeo  $\beta$ -amilóide. A interação destas moléculas com receptores toll 4 (TLR4) ativa o eixo imune-pineal, favorecendo a migração de leucócitos para o local da injúria. Heparan sulfato (HS), um glicosaminoglicano da matrix extracelular é amplamente conhecido por ligar-se a proteoglicanos, e a ruptura da matriz extracelular por dano tecidual, inflamação generalizada ou migração de células tumorais para metástases, liberam dissacarídeos que podem ligar a TLR4, levando a formação de uma resposta inflamatória. Como a supressão do pico noturno de melatonina ocorre em diversos modelos de inflamação, tanto em humanos como em roedores, avaliamos se heparan sulfato poderia prejudicar a atividade da melatonina noturna através da interação com receptores toll 4. Heparan sulfato é capaz de inibir a síntese noturna de melatonina, através da supressão da expressão gênica e do conteúdo enzimático de acetilserotonina O-metiltransferase (ASMT). Este efeito é modulado pela interação de heparan sulfato com receptor toll 4, mas não envolve a mesma via ativada por LPS ou peptídeo  $\beta$ -amilóide, que é via translocação nuclear de NF- $\kappa$ B. Estes dados sugerem que um aumento de moléculas de heparan sulfato na matriz da glândula pineal é traduzido a todo o organismo por uma redução no pico noturno de melatonina.

**Palavras-chave:** Melatonina. Glândula pineal. Heparan sulfato. TLR4. Acetilserotonina O-metiltransferase (ASMT).

## *ABSTRACT*

Acco M. Modulation of rat pineal gland melatonin synthesis by heparan sulfate. [Master's thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

The nocturnal synthesis of melatonin by the pineal gland is inhibited by pathogen- or damage- associated molecular patterns, such as lipopolysaccharide (LPS) and beta-amyloid peptide. The interaction of these molecules with TLR4 activates the immune-pineal axis, favoring the migration of leukocytes for the site of lesion. Heparan sulfate (HS), a glycosaminoglycan of the extracellular matrix is currently known to bound to proteoglycans, and the disruption of the matrix by tissue injury, generalized inflammation or migration of tumor cells to metastasize, releases the free disaccharide, which can bind to TLR4 triggering an inflammatory response. As the suppression of nocturnal melatonin peak occurs in several models of inflammation, both in rodents and humans, here we evaluated whether HS could impair nocturnal melatonin activity through interacting with TLR4. Heparan sulphate is capable of inhibit the melatonin synthesis, by the suppression of the gene expression and enzymatic content of acetylserotonin O-methyltransferase (ASMT). This effect is modulate by the interaction of heparan sulphate with toll like receptors 4, but does not involve the same way that LPS or amyloid- $\beta$  peptide, that is via NF- $\kappa$ B nuclear translocation. This data suggest that the increase in free HS in pineal gland matrix is translated to the whole organism by a reduction in the nocturnal melatonin peak.

**Key-words:** Melatonin. Pineal gland. Heparan sulfate. TLR4. Acetylserotonin O-methyltransferase.

# *1 INTRODUÇÃO*

## 1.1 GLÂNDULA PINEAL E MELATONINA

As primeiras descrições da glândula pineal foram feitas pelo anatomista grego Herophilus (335 a.C. – 280 a.C.), cerca de 300 anos a.C. e, baseado nestas descrições, Galeno fez suas considerações sobre a glândula, denominando-a de “*konarium*”, que em grego, significa pineal, devido a sua forma de pinha em humanos. Para Descartes, no século XVII, a glândula pineal significaria a “sede da alma”, e seria nesse ponto que se formaria o “*spiritus animalis*”, o órgão responsável pela comunicação entre o corpo e a alma. Apesar de severamente criticada, esta ideia foi também defendida pelo filósofo Karl Popper (1902 – 1994), considerado por muitos como o mais influente filósofo da ciência do século XX. Porém, foi por volta do ano de 1896 que a glândula pineal ganhou mais atenção científica, frente ao relato de Gutzeit e Heubner de que um tumor na glândula pineal seria responsável por alguns casos de maturidade precoce em garotos.

Foi em 1958 que Aaron B. Lerner relatou o que seria um grande avanço nos estudos relacionados à glândula pineal: observou que extratos obtidos de pineais de bovinos, possuíam uma substância capaz de agregar pigmentos de melanina causando assim alteração na coloração da pele de anfíbios. Com essa observação, a substância foi isolada e analisada, sendo denominada de melatonina (Lerner et al., 1958). Inicialmente a melatonina estava relacionada principalmente com funções rítmicas. Mais recentemente, ficou demonstrado que esta molécula exerce também funções não rítmicas ligadas a processos de defesa (Carrillo-Vico et al., 2005; Markus et al., 2007; Reiter et al., 2000).

Desde então, muitos têm sido os estudos a cerca da glândula pineal e a síntese de melatonina em diferentes tipos de organismos, bem como as vias de metabolismo e a produção rítmica de melatonina pela glândula pineal (Klein, Weller, 1970; Lerner et al., 1958; Quay, 1963, 1964; Reiter, 1993).

### 1.1.1 Características anatômicas da glândula pineal

A glândula pineal, conforme dito anteriormente, possui esta nomeação devido a sua forma de pinha em seres humanos. É um órgão único, situado na região do

epitálamo, entre os dois hemisférios cerebrais, à frente do cerebelo e se encontra fora da área que abrange a barreira hematoencefálica. É originada a partir da evaginação do teto do III ventrículo, cavidade esta que pertence ao diencéfalo (Arendt, 1995).

Nos mamíferos, a glândula pineal pode ser dividida morfológicamente em duas porções sendo uma profunda e uma superficial, que são conectadas por uma porção denominada pedúnculo pineal. Estas porções apresentam localização específica, dependendo da espécie a ser analisada, e geralmente a porção profunda fica localizada próximo ao local de onde se origina e o corpo pineal pode estar na mesma região ou mais superficial. Em se tratando de roedores, a pineal sofreu uma migração dorso-caudal, sendo localizada na superfície cerebral, com uma porção profunda (revisto por Simonneaux, Ribelayga, 2003).

A composição celular da glândula pineal é predominantemente de células neuroendócrinas, denominadas pinealócitos, que são os principais responsáveis pela produção de melatonina na glândula e correspondem a cerca de 80% das células (revisto por Ekström, Meissl, 2003). Também são encontradas na glândula pineal, células da glia, que podem ser astroglias, microglia, oligodendrócitos e células de Schwann (Møller, Baeres, 2002) e neurônios (Schröder et al., 1990), que são responsáveis pela liberação de substâncias capazes de atuar sobre os pinealócitos (Møller, 1997), como por exemplo os neurônios simpáticos, responsáveis pela principal forma de inervação da glândula pineal (Kappers, 1960).

A principal inervação que ocorre na glândula pineal é realizada através de nervos simpáticos que tem origem no gânglio cervical superior (Kappers, 1960) e apresentam vesículas que liberam noradrenalina (Wolfe et al., 1962), o principal neurotransmissor indutor da síntese de melatonina. Pode ser liberado através destas fibras o neuromodulador ATP (adenosina tri-fosfato) (Mortani-Barbosa et al., 2000), que atua via receptores purinérgicos  $P2Y_1$ , potenciando a síntese de melatonina (Ferreira et al., 1994, 2003). Outras sinalizações adrenérgicas ou não-adrenérgicas podem ocorrer na glândula pineal, o que indica que o complexo controle desta glândula tem como efeito um fino controle da produção de melatonina e organização temporal de todo o organismo.

### 1.1.2 Sinalização e controle da síntese de melatonina

A glândula pineal controla a síntese de melatonina através da capacidade de seu sistema em converter sinais externos em sinalizações internas. A principal estrutura responsável pela sinalização temporal é o núcleo supraquiasmático (NSQ), conhecido como “relógio biológico central”, que envia sinais à glândula pineal através de uma via polissináptica que tem início na conversão de sinais fóticos em sinalizações neurais através da retina e são enviados ao NSQ através do nervo óptico, via trato retino-hipotalâmico. Em caso de presença de luz ambiental, estes sinais são projetados aos neurônios autônomos do núcleo paraventricular (PVN), que em caso de luz, liberam GABA, um neurotransmissor inibitório (Kalsbeek et al., 2000), sendo assim, a via de síntese de melatonina encontra-se inibida na fase de claro. Na fase de escuro, não há liberação de GABA e a via prossegue através dos neurônios pré-ganglionares que se projetam ao gânglio cervical superior, de onde partem as fibras simpáticas pós-ganglionares responsáveis pela inervação da glândula pineal (Klein, Moore, 1979) liberando noradrenalina no parênquima da glândula induzindo assim a síntese de melatonina.

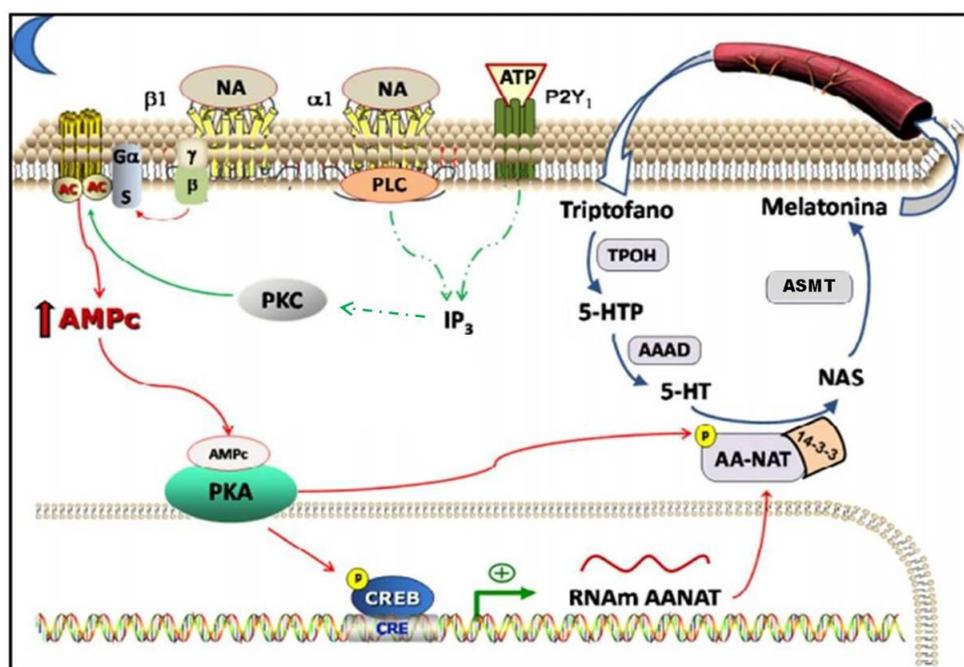
A noradrenalina liberada pelas fibras simpáticas atua sobre os adrenoceptores (Klein et al., 1983), atuando principalmente sobre o subtipo  $\beta_1$ , que é um receptor acoplado à proteína G estimulatória (Gs) que ativa a enzima adenilil ciclase (AC), responsável por converter monofosfato de adenosina (AMP) no segundo mensageiro AMP cíclico (AMPc). Com o aumento plasmático de AMPc, ocorre a ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA).

A síntese de melatonina, também chamada de N-acetil-5-metoxitriptamina, tem início a partir da captação do aminoácido triptofano da corrente sanguínea, que é hidroxilado pela enzima triptofano hidroxilase (TPOH), formando assim o 5-hidroxitriptofano (5-HTP), que é convertido à serotonina através da ação de uma descarboxilase de aminoácidos aromáticos (AAAD). A serotonina formada sofre ação da enzima AA-NAT, sendo convertida a N-acetilserotonina (NAS), que é metilada pela enzima acetilserotonina O-metiltransferase (ASMT), formando a melatonina (revisto por Simonneaux, Ribelayga, 2003; Sugden, 1989) (figura 1).

A ritmicidade diária da síntese de melatonina é atribuída ao ritmo de transcrição do gene (animais de hábito noturno) e da atividade (animais de hábito

diurno e noturno) da enzima AA-NAT (Ackerman et al., 2006, Chatteraj et al., 2009; Simonneaux, Ribelayga, 2003). Em animais de hábito noturno o fator de transcrição CREB (*cyclic AMP response element-binding protein*) fosforilado pela PKA forma homodímeros e liga-se a um co-ativador conhecido como CBP (*CREB-binding protein*), a formação deste complexo torna possível sua ligação à região promotora do gene que codifica a enzima chave na produção de melatonina, a arilalquilamina-N-acetiltransferase (AA-NAT), induzindo sua transcrição (Baler et al., 1997).

A AA-NAT assim que é sintetizada é degradada pelo proteossoma, garantindo que mesmo em animais de hábito diurno não haja síntese de melatonina na fase de claro. A proteção da degradação da AA-NAT pelo proteossoma ocorre devido à sua fosforilação pela PKA. Portanto, o mesmo sinal que em roedores leva à transcrição do RNA mensageiro, em roedores e humanos leva à fosforilação da enzima que converte serotonina em N-acetilserotonina, permitindo a sua interação com a chaperona 14-3-3. Este complexo molecular não tem acesso ao proteossoma – e a enzima AA-NAT fosforilada, então está em sua forma ativa (Simonneaux, Ribelayga, 2003).



**Figura 1 - Vias de sinalização e biossíntese de melatonina em glândulas pineais de ratos.** A noradrenalina liberada no parênquima da glândula pineal no período noturno ativa receptores  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos. Os receptores  $\beta_1$ , acoplados à proteína

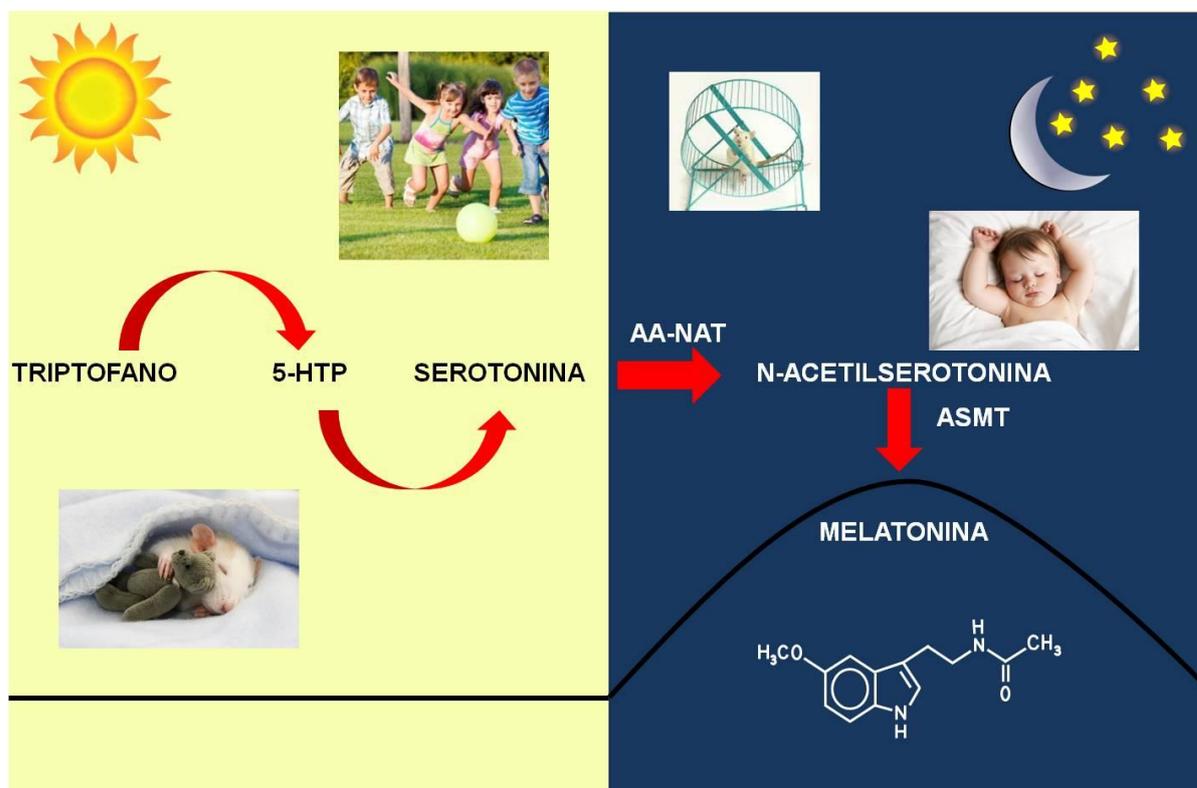
Gs são capazes de ativar a enzima adenilil ciclase (AC) que resulta no aumento dos níveis intracelulares de AMP cíclico (AMPC), responsável por ativar PKA, que por sua vez fosforila CREB e induz a expressão gênica da AA-NAT, via esta, sinalizada pelas setas vermelhas. A ativação de receptores do tipo  $\alpha_1$  adrenérgicos e P2Y<sub>1</sub> induzem uma cascata de sinalização que causa aumento do cálcio intracelular e ativação de PKC, que exerce efeito sobre AC, potenciando a cascata de sinalização exercida pelo receptor  $\beta_1$ , via sinalizada pelas setas verdes. Após a fosforilação da enzima AA-NAT por PKA, ocorre uma ligação à chaperona 14-3-3 para que a mesma se torne estável, protegida de degradação e ativa. A síntese de melatonina encontra-se esquematizada pelas setas azuis, tendo início a partir da captação do aminoácido triptofano da circulação, que é convertido na sequência para 5-HTP, 5-HT, NAS e melatonina, conforme descrito no texto. (PLC - fosfolipase C; IP3 - inositol trifosfato; linhas verdes tracejadas - vias simplificadas). Fonte: adaptado de Cecon, 2010.

A melatonina apresenta uma meia vida curta, cerca de 45 minutos (revisado por Harpsøe et al., 2015) e sua metabolização ocorre principalmente em primeira passagem, com a formação de hidroximelatonina no fígado, por este motivo, a concentração de melatonina no plasma reflete diretamente o ritmo de produção deste hormônio pela pineal. Posteriormente, ocorre a conjugação com sulfato, formando um composto denominado 6-sulfatoximelatonina, que facilita sua excreção através da urina (Arendt, 1995). A melatonina também é liberada diretamente da pineal para o liquor e sua metabolização no tecido cerebral é realizada pela enzima CYP1B1 (Ma et al., 2005).

Como será descrito em detalhes à frente, a síntese de melatonina pela glândula pineal é controlada por mediadores da inflamação. Estes ativam fatores de transcrição que podem inibir ou ativar esta síntese.

### 1.1.3 Funções da melatonina

A melatonina é o hormônio que marca o escuro em todos os animais estudados. Em humanos está ligado a atividades de repouso, enquanto em roedores faz facilitar os processos de atividade (figura 2).



**Figura 2 - Padrão de síntese de melatonina ao longo do dia em humanos e ratos.** Esquema da síntese de melatonina de acordo com o período do dia em animais e ratos, demonstrando que a inibição da síntese no período diurno em humanos é o momento de atividade e em ratos o período de repouso, sendo que no período noturno em que há produção de melatonina, essas condições se encontram invertidas.

Diversas outras funções foram sendo atribuídas à melatonina ao longo do tempo, visto que foi descoberta sua presença em praticamente todos os grupos de seres vivos, de seres unicelulares, passando por plantas (Reiter et al., 2007), fungos e bactérias (Balzer et al., 2000). Conforme descrito no início deste capítulo, a primeira ação da melatonina foi relacionada à mudança de coloração da pele de anfíbios, porém, são relacionadas também ações cronobióticas, antioxidantes, imunomodulatórias e oncostáticas, que podem estar interligadas.

Seu efeito cronobiótico está relacionado a sua síntese noturna, que age sinalizando a duração do período de escuro, bem como as estações do ano devido à duração deste período noturno, que está diretamente relacionado à alterações de reprodução e sistema imunológico e regulação de hibernação de algumas espécies. Todas essas funções corroboram com a sincronia de todo o organismo devido a sua

ação no relógio biológico central, o núcleo supraquiasmático (revisto por Pévet et al., 2002).

A melatonina, bem como a molécula precursora N-acetilserotonina e seus metabólitos N1-acetil-5-metoxi-quinuramina e N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina têm alta capacidade de reagirem com moléculas contendo radicais livres e com isto reduzem moléculas com oxigênio ou nitrogênio altamente reativos (revisto por Tan et al., 2010). Esta ação antioxidante confere à melatonina e derivados um importante papel citoprotetor. No entanto, é preciso ressaltar que a melatonina, por efeito mediado por receptores de membrana também é capaz de induzir a expressão de enzimas que reduzem a presença de moléculas contendo radicais livres, e com isto ter uma ação antioxidante indireta. Há uma diferença importante na concentração de melatonina necessária para exercer os dois efeitos. No primeiro caso ocorre uma reação bi-molecular e, portanto há necessidade de concentrações estequiométricas de melatonina, no geral na faixa de mM. No segundo caso, o efeito é mediado por receptor de membrana acoplado à proteína G.

A melatonina exógena, ou melatonina endógena produzida pela pineal ou por células imuno-competentes modula respostas imunológicas. Células do trato gastrointestinal produzem melatonina de forma constitutiva não rítmica (Slominski et al., 2005) enquanto células do sistema imunológico, tais como células da medula óssea (Conti et al., 2000), linfócitos (Carrilo-Vico et al., 2005b), macrófagos (Muxel et al., 2012), microglias (Santos, 2015), células do colostro humano (Pontes et al., 2006) passam a produzi-la localmente em caso de sinalizações por PAMP's ou DAMP's que inibem a produção pela glândula pineal.

A melatonina modifica o perfil de citocinas produzidos, inibindo TNF e IL-1 $\beta$  (Fernandes et al., 2006) e aumentando a produção de IL-12. Também diminui a expressão de enzimas ligadas à resposta pró-inflamatória, como a sintase induzida de óxido nítrico (iNOS) em diferentes sistemas (Sivakumar et al., 2008; Tamura et al., 2010), o rolamento e adesão de neutrófilos na camada endotelial (Lotufo et al., 2001) e aumenta a capacidade fagocítica de macrófagos (Pires-Lapa et al., 2013; Pontes et al., 2006).

Vários autores demonstram que a melatonina tem efeito oncostático. Os mecanismos de ação sugeridos envolve a inibição de moléculas de adesão, de fatores de crescimento e também o seu efeito anti-oxidante. Como ocorre com a

resposta inflamatória este efeito pode ser parcialmente mediado por receptores ou pelo sequestro de radicais livres (Dai et al., 2008; Hill et al., 2016; Liu et al., 2016; Poeggeler, 2005; Vriend, Reiter, 2015;).

Em suma, além de ser um hormônio sincronizador, porque é liberado apenas no escuro e informa aos organismos que “está escuro”, melatonina é sintetizada quando necessário para resolver um processo inflamatório ou atenuar processos patológicos. Nosso grupo de pesquisa vem demonstrando que existe uma relação formal entre a produção cíclica e temporária de melatonina através de fatores de transcrição que coordenam respostas inflamatórias.

#### **1.1.4 Eixo imune-pineal**

Em 1926, Berman foi o primeiro pesquisador a estabelecer uma relação entre melatonina e resposta imunológica relatando redução das chances de contrair doenças infecciosas em filhotes de gatos alimentados com pineais de bois (revisto por Carrilo-Vico et al., 2005a). Posteriormente, foi observado que pinealectomia induzia redução no tamanho de órgãos relacionados à resposta imunológica, como por exemplo, baço, timo e glândula adrenal (Csaba, Barath, 1975; Jancovic et al., 1994; Vaughan, Reiter, 1971). Devido a estas observações, diversos estudos envolvendo a melatonina e a resposta imunológica foram realizados, mas poucos envolveram a glândula pineal em suas avaliações.

O primeiro estudo sobre o tema realizado em nosso laboratório não visava diretamente avaliar efeitos ritmos ou ações da melatonina sobre a resposta inflamatória. A aluna de iniciação científica, Cristiane Lopes, mediu de forma sistemática o tamanho de patas de camundongos injetados ou não por BCG (Bacilo Calmette-Guerin) durante 90 dias. Os animais foram rigorosamente mantidos em ciclo claro-escuro 12/12 e as medidas foram feitas ao longo das 24 horas. A análise de Fourier detectou um ritmo senoidal com período de 24 horas. O edema era menor na fase de escuro (Lopes et al., 1997). O ritmo do tamanho da pata era perdido em animais pinealectomizados e recuperado quando animais recebiam água apenas a noite, acrescida de melatonina. Com este mesmo modelo experimental foi demonstrado que a remoção das glândulas adrenais abolia tanto o ritmo da lesão

quanto o aumento de melatonina na fase de escuro. Reposição de melatonina por oferecimento de água apenas à noite, contendo melatonina, também restaurava o ritmo da lesão (Lopes et al., 2001). Estes foram experimentos seminais para entender efeitos da melatonina endógena sobre processos inflamatórios crônicos e permitiu iniciar os estudos sobre a modulação da síntese de melatonina por mediadores da inflamação.

A relação entre as glândulas pineal e adrenal foi estabelecida posteriormente por estudos que demonstraram que a corticosterona é capaz de potenciar a síntese de melatonina induzida por noradrenalina em glândulas pineais de ratos em cultura (Ferreira et al., 2005) e quando aplicada por infusão local (Fernandes et al., 2009). Para analisar efeitos de respostas inflamatórias sobre a síntese de melatonina, foram realizados estudos com diversas substâncias inflamatórias e o que foi observado é que TNF, uma citocina pró-inflamatória, é capaz de inibir a síntese de melatonina por gerar uma supressão da expressão gênica da enzima *Aa-nat* em glândulas pineais de ratos em cultura (Fernandes et al., 2006). A capacidade da glândula pineal em perceber estímulos causados por TNF foi comprovado pela presença de receptores de TNF, denominados TNFR, nestas glândulas (Carvalho-Sousa et al., 2011). O efeito de TNF na síntese de melatonina foi avaliado em um modelo *in vivo* baseado no estudo de mulheres que apresentavam uma inflamação não infecciosa causada pela sucção feita pelo bebê, denominada mastite. Estas mulheres não apresentaram ritmo diário de melatonina, em contrapartida, apresentavam altos níveis de TNF circulante, que foi normalizado após a resolução do quadro inflamatório, que culminava também, no retorno dos níveis noturnos de melatonina (Pontes et al., 2006). E, conforme citado em item anterior, a melatonina circulante é capaz de inibir o rolamento e adesão de células imunocompetentes na camada endotelial (Lotufo et al., 2001), o que é considerado um fator importante se pensarmos na necessidade de uma montagem de resposta inflamatória em caso de injúria.

A relação dos dados obtidos entre a glândula pineal e a resposta imunológica demonstra que a glândula pineal é um órgão capaz de receber diretamente as sinalizações advindas de respostas inflamatórias, gerando uma inibição da síntese de melatonina sistêmica, possibilitando a formação de uma resposta inflamatória adequada. De acordo com a análise conjunta de todos os dados do nosso grupo, foi

montado o conceito da existência de um “eixo imune-pineal”. O conceito geral deste eixo leva em consideração que uma injúria induziria a montagem de uma resposta inflamatória local através da inibição da síntese de melatonina pela glândula pineal, possibilitando o recrutamento de células imunocompetentes, que são capazes de produzir melatonina localmente em altas concentrações, estimulando a proliferação celular e atividade fagocitária, com intuito de exterminar o agente causador da inflamação e posteriormente, restaurar as concentrações normais de melatonina circulante (Markus et al., 2007).

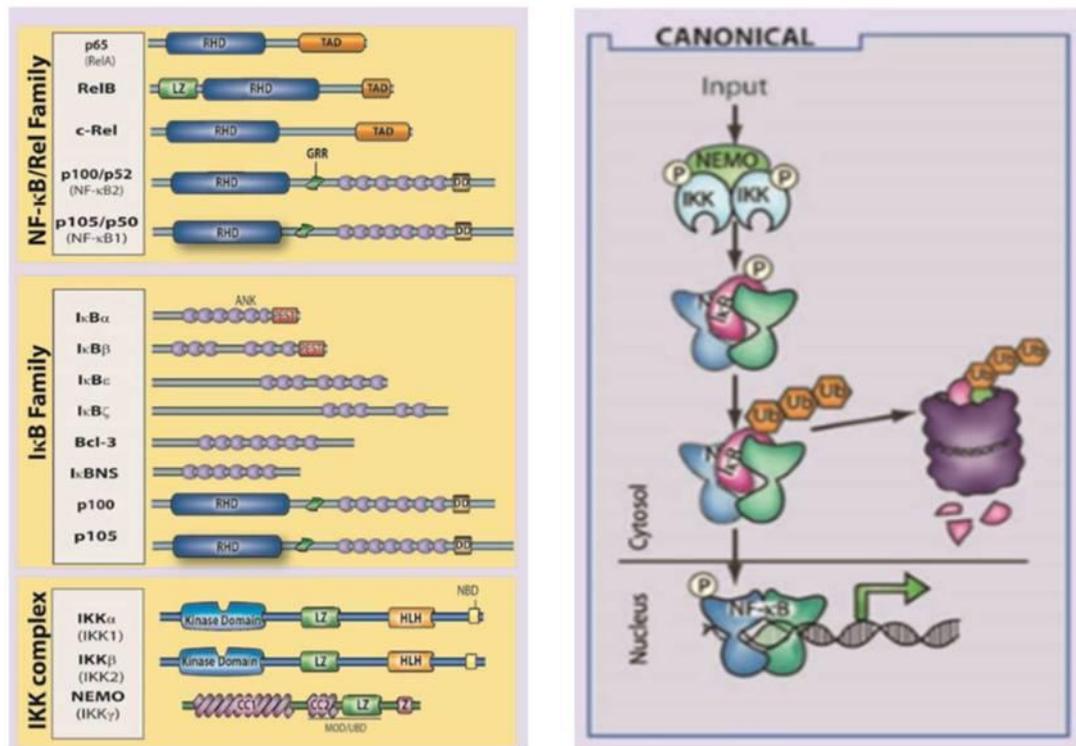
Outros agentes passaram a ser analisados a fim de estabelecer quais seriam os fatores capazes de atuar sobre a glândula pineal e portanto foram analisados os efeitos da incubação de LPS, componente da membrana de bactérias gram negativas, em glândulas pineais de ratos, que foi capaz de inibir a síntese de melatonina através da ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B através da presença de receptores do tipo TLR4 nestas glândulas (Da Silveira Cruz-Machado et al., 2010). Mais recentemente, foi demonstrado que o peptídeo  $\beta$ -amilóide, presente em casos de doença de Alzheimer, também é capaz de inibir a síntese de melatonina através da interação com receptores TLR4, por ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, com conseqüente diminuição da expressão gênica de *Aa-nat* e disponibilidade de pAA-NAT (Cecon et al., 2015). Foi demonstrado também que o zimosan, um constituinte da parede celular de fungos, é uma molécula capaz de induzir a síntese de melatonina em células imunocompetentes de colostro humano através da interação com receptores TLR2/TLR6 (Pires-Lapa et al., 2013). Estes dados mais recentes corroboram com a ideia da existência um eixo imune-pineal.

#### 1.1.4.1 Fator Nuclear Kappa B – NF- $\kappa$ B

O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição ubíquo, formado por um conjunto de proteínas que regula as respostas imunológicas inata e adaptativa, de grande relevância em processos de proliferação e morte celular (Bonizzi, Karin, 2004). O primeiro destes fatores de transcrição foi descrito por David Baltimore, que destacou sua interação com uma sequencia de 11 pares de bases no “enhancer” da cadeia leve (kappa) da imunoglobulina de linfócitos B (Sen, Baltimore, 1986). David

Baltimore, nesta ocasião nominou o fator de transcrição de kappa B, acreditando ser exclusivo de linfócitos B, porém, hoje se sabe que é um fator presente em diversos tipos celulares.

Conforme apresentado na figura 3, este conjunto de proteínas é formado por homodímeros ou heterodímeros dos monômeros p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50 e p52 (Ghosh, Hayden, 2008). Os três primeiros monômeros possuem sequências capazes de ativar domínios de transcrição (TAD, do inglês *transactivating domain*). Dessa forma dímeros que contenham um ou dois destes monômeros levam à transcrição gênica, enquanto os que contêm apenas p50 ou p52 inibem a transcrição gênica. Estes dímeros encontram-se sequestrados no citoplasma ligados à proteína inibitória I $\kappa$ B ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) (revisto por Hayden, Ghosh, 2008). A fosforilação desta proteína, induzida pela interação de PAMP's (padrões moleculares associados à patógenos) ou DAMP's (padrões moleculares associados à dano) com receptores TLR's, ocorre pela ativação de um complexo específico de quinases (IKK) que promove a degradação de I $\kappa$ B pelo proteassoma. O dímero livre transloca-se para o núcleo e liga-se a elementos  $\kappa$ B de DNAs alvo, controlando a transcrição dos mesmos. Entre os alvos primários estão genes que codificam proteínas envolvidas na resposta pró-inflamatória e posteriormente proteínas envolvidas na resolução desta resposta (revisto por Hayden, Gosh, 2008). Desta forma o gene que codifica I $\kappa$ B também é ativado, resultando na tradução do inibidor, e na redução da concentração de dímeros NF- $\kappa$ B no núcleo. (Nelson et al., 2004). A via canônica simplificada de ativação de NF- $\kappa$ B encontra-se esquematizada na figura 3.



**Figura 3 - Composição das famílias de NF-κB, IκB e IKK e ativação da via canônica de NF-κB.** Demonstração da composição de cada monômero pertencente às famílias de NF-κB (superior), IκB (ao meio) e IKK (inferior). Todos os membros da família NF-κB apresentam um domínio de homologia REL (RHD) e os que apresentam domínio TAD (p65, c-Rel e RelB) são capazes de ativar a transcrição gênica, enquanto os que não apresentam (p52 e p50), inibem a transcrição gênica (A); Um estímulo inicial (*input*), que pode indicar a presença de um PAMP ou DAMP, sinaliza ao complexo formado por IKK para que realize a fosforilação da subunidade de IκB presente no dímero de NF-κB, que após a fosforilação é ubiquitinado e segue para degradação no proteassoma. O dímero de NF-κB livre migra do citoplasma para o núcleo e realiza a inibição ou indução gênica, dependendo do dímero presente (B).  
 Fonte: Hayden, Gosh, 2011.

### 1.1.4.2 Família de receptores do tipo TOLL

A família dos receptores do tipo *toll em mamíferos* é composta por 13 proteínas de membrana (Kumar et al., 2009) responsáveis por ativar a resposta imune inata no organismo através da sinalização via NF-κB ou fator regulatório de IFN, conhecido como IRF3 (Akira et al., 2006). Os receptores TLR's são moléculas bastante conservadas filogeneticamente e foram inicialmente identificadas em

vertebrados e sua nomenclatura se derivou devido a sua homologia com Toll, uma molécula conhecida por estimular a produção de proteínas antimicrobianas em *Drosophila melanogaster* (revisto por Lemaitre, 2004; Medzhitov et al., 1997).

Os membros da família TLR são receptores de reconhecimento de padrões, também conhecidos como PRR's (do inglês, pattern-recognition receptors), capazes de reconhecer estruturas como lipídios, carboidratos, peptídeos e ácidos nucleicos que são expressos por diferentes grupos de microorganismos (revisto por Trinchieri, Sher, 2007). Inicialmente, os receptores TLR foram descritos como reconhecedores apenas de PAMP'S (revisto por Janeway, Medzhitov, 1998), posteriormente foi descoberta sua capacidade em reconhecer também moléculas advindas do próprio organismo em caso de dano, ou seja, DAMP's (revisto por Bianchi, 2007).

Os tipos de proteínas que constituem a família TLR podem ser divididos em dois subgrupos, considerando-se a sua localização celular, sendo que podem ser receptores encontrados na superfície celular, que engloba os tipos TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10 (revisto por Kawai, Akira, 2010) ou intracelulares que ficam localizados em vesículas que podem ser encontradas em endossomos e incluem os tipos TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 e TLR13 (Celhar et al., 2012). Estes tipos de receptores apresentam capacidade de formar homodímeros ou heterodímeros entre si, sendo que os dímeros mais comumente formados são TLR1/TLR2, TLR2/TLR6 e TLR6/TLR6 (revisto por Beutler, 2009).

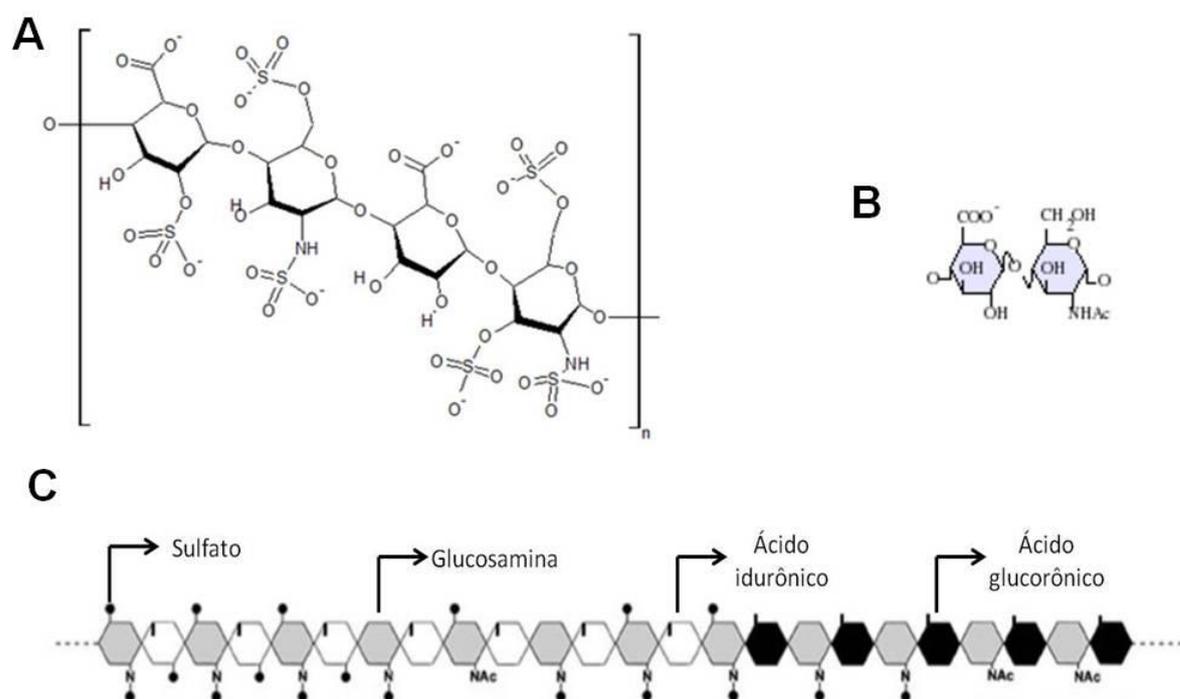
É interessante salientar que um mesmo subtipo de TLR ativado por diferentes patógenos desencadeia vias de transdução específicas (Guan et al., 2010). Esta seletividade é determinada pela proteína adaptadora que promove a interação do PAMP ou DAMP com a proteína receptora (Figura 4). São conhecidos cinco tipos de proteínas adaptadoras que são capazes de interagir com os receptores TLR: MyD88 (do inglês, myeloid differentiation primary response gene 88), SARM (do inglês, Sterile and Heat-Armadillo motifs containing adaptor protein), TIRAP (do inglês, TIR domain-containing adaptor protein), TRAM (do inglês, TRIF related adaptor molecule), TRIF (do inglês, TIR domain-containing adaptor inducing IFN). Entre todas as proteínas que compõe a família TLR, o único receptor conhecido por utilizar todas estas proteínas é o TLR4 (revisto por O'Neil, Bowie, 2007).



## 1.2 HEPARAN SULFATO

### 1.2.1 Características estruturais e funções fisiológicas

O heparan sulfato é um polissacarídeo complexo, pertencente ao grupo dos glicosaminoglicanos que está presente na superfície celular de praticamente todas as células de seres vertebrados e invertebrados (Cássaro, Dietrich, 1977). Sua formação química ocorre por polímeros lineares polidispersos, compostos por unidades alternadas de  $\alpha$ -D-glucosamina (GlcN) e ácido urônico, ou ácido  $\beta$ -D-glucurônico (GlcA) ou ácido  $\alpha$ -L-idurônico (IdoA), unidas por ligações glicosídicas. A figura 5 mostra a fórmula estrutural de uma subunidade de heparan sulfato e uma cadeia hipotética de HS. O heparan sulfato contém grande número de cadeias  $\alpha$ -D-glucosamina N-acetiladas e está localizado na matriz extracelular e na membrana celular de virtualmente todas as células das espécies de vertebrados e invertebrados (Cassaro, Dietrich, 1977; Dietrich et al., 1977, 1980; revisto por Dreyfuss, et al., 2009; Nader et al., 1984).



**Figura 5 - Fórmula estrutural de heparan sulfato.** (A) Esquema da formação de uma subunidade de heparan sulfato. (B) A unidade mais comum de dissacarídeo formada, é composta por ácido glucurônico (GlcA) ligado a uma N-acetilglucosamina (GlcNAc). (C) Cadeia hipotética de heparan sulfato, composta por unidades

alternadas de glucosamina e ácido idurônico ou glucosamina e ácido glucorônico, com a possibilidade de glucosamina N-sulfatada ou N-acetilada.

Fonte: [https://en.wikipedia.org/wiki/Heparan\\_sulfate](https://en.wikipedia.org/wiki/Heparan_sulfate); Dreyfuss et al., 2009.

Heparan sulfato é uma molécula estruturalmente semelhante à molécula de heparina, sendo sua principal diferença quanto à sulfatação (Kjellen, Lindahl, 1991). A heparina inibe a quebra de heparan sulfato por heparanases, enzima ativada no caso de dano tecidual (Ihrke et al., 1998). As funções biológicas da heparina e do heparan sulfato são distintas. Heparan sulfato, mas não heparina induz maturação de células dendríticas (Ihrke et al., 1998; Johnson et al., 2002).

As cadeias de heparan sulfato encontram-se ligadas a proteínas na membrana celular ou na matriz extracelular, e a essas estruturas formadas por heparan sulfato e proteína dá-se o nome de proteoglicanos de heparan sulfato (HSPG's). Estas proteínas incluem proteínas transmembranares, sindecanas (Bellin et al., 2002; Oh, Couchman, 2004; Sanderson, Yang, 2008), proteínas ligadas à membrana através de uma âncora glicosilfosfatidilinositol, glicicanas (Huber et al., 1998; Filmus et al., 2002, 2008; Fransson et al., 2004; Stigliano et al., 2009; Veugelers et al., 1997, 1999) e proteínas menos seletivas como a CD44 (transmembrana) (Henke et al., 1996) e betaglicanas (Miyazono et al., 1997). Quando da ligação de heparan sulfato em proteínas da matriz extracelular, estas podem ocorrer por ligação à perlecanas (Farach-Carson, Carson, 2007), agrinas (Bezakova, Ruegg, 2003), colágeno do tipo XVIII (Iozzo, 2005) e testicanas (Alliel et al., 1993; Nakada et al., 2003; Schnepf et al., 2005).

Os proteoglicanos formados são responsáveis por diferentes processos biológicos de acordo com a proteína de interação, sendo que entre suas funções estão diferenciação, reconhecimento, proliferação, adesão e migração de células, sobrevivência celular, montagem da matriz extracelular, angiogênese, mecanismos de defesa, homeostase e inflamação (revisado por Dreyfuss et al., 2009). Heparan sulfato é rapidamente separado das proteínas da superfície celular e da membrana basal quando há injúria tecidual (Kato et al., 1998; Subramanian et al., 1997), inflamação generalizada (Ihrcke et al., 1998; Platt et al., 1991) ou quando células tumorais estão em migração para formar metástases (Nakajima et al., 1988). Desta forma, esta molécula sinaliza dano celular, funcionando como um DAMP.

A separação das moléculas de heparan sulfato da proteína ocorrem por ação da enzima heparanase que é uma endo- $\beta$ -glucuronidase responsável por clivar as cadeias laterais de HS dos HSPG's, liberando oligossacarídeos com peso entre 4 e 7 kDa, ou seja, cerca de 10 a 20 subunidades de açúcares (Pikas et al., 1998). Foi demonstrado que a clivagem destes HSPG's ocorre quando há uma desestabilização do estado fisiológico do organismo. Estudos demonstraram aumento na expressão de heparanase em quadros de inflamação (Ihrke et al., 1998), dano tecidual (Ihrke, Platt, 1996), cânceres (Ilan et al., 2006; Vlodavsky et al., 2012) e isquemia cerebral, quando avaliada a expressão da enzima em células endoteliais e astrócitos em cérebros de ratos (Zhang et al., 2012) e camundongos (Takahashi et al., 2007). O aumento da expressão de heparanase detectado em tumores cerebrais sugere que esta enzima exerça um papel fundamental no controle da proliferação celular e invasão tumoral (Hong et al., 2010).

Diversos estudos com doença de Alzheimer, demonstraram a capacidade de HS em interagir com peptídeo  $\beta$ -amilóide (Bame et al., 1997; Buée et al., 1993; Leveugle et al., 1994) através de um domínio HHQK situado no sítio N-terminal do peptídeo A $\beta$  e esta sequência demonstrou capacidade em se ligar a microglia, sugerindo portanto que a interação entre A $\beta$  e microglia, ocorre por mediação de heparan sulfato (Giulian et al., 1998).

### 1.2.2 Heparan sulfato e TLR4

Moléculas livres de heparan sulfato, isto é, não ligadas a proteoglicanas, ativam receptores TLR4 em células isoladas (Akbarshahi et al., 2011; Johnson et al., 2002; Tsan, Gao, 2004) e em modelos animais *in vivo* (Johnson et al., 2004). Desde a década de 1990 tem-se conhecimento que heparan sulfato induz a translocação nuclear de dímeros de NF- $\kappa$ B em macrófagos (Wrenshall et al., 1995) e, posteriormente foi mostrado que o mesmo ocorre com outros tipos celulares (Ausseil, 2008; Johnson et al., 2002; O'Callaghan et al., 2015).

Na dependência do modelo estudado heparan sulfato pode ativar a via clássica ou a via alternativa de transdução desencadeada por TLR4. Em inflamação pancreática foram observadas respostas mediadas por IRF3 via ativação de

TRAM/TRIF (Akbarshahi et al., 2011). Em macrófagos (Wrenshall et al., 1995) células dendríticas (Johnson et al., 2002) e microglias (Ausseil, 2008; O'Callaghan et al., 2015) heparan sulfato ativa a via clássica que utiliza como proteína adaptadora o Myd88.

Corroborando a ideia de que o heparan sulfato é capaz de ativar os receptores TLR4, foi visto que em células HEK293 que apresentavam sua matriz extracelular intacta apresentavam uma inibição na ativação de TLR4 e em caso de desestruturação desta matriz, citocinas inflamatórias teriam maior facilidade em ativar a via de NF- $\kappa$ B (Brunn et al., 2005). Em esplenócitos de ratos selvagens ou *knockout* para receptor TLR4, foi observada uma ausência da capacidade de expressão de citocinas inflamatórias em animais que não apresentam o receptor, quando tratadas com heparanase, enzima responsável pela clivagem e liberação de moléculas de heparan sulfato (Goodall et al., 2014), demonstrando novamente a capacidade desta molécula em ativar o receptor citado.

### 1.2.3 Heparan sulfato e glândula pineal

Conforme citado anteriormente, o receptor TLR4 é a única proteína da família TLR que apresenta as cinco proteínas adaptadoras e desta forma, possui a capacidade de desencadear diferentes vias da resposta imunológica de acordo com o ligante que dispara a sinalização. Nosso grupo demonstrou a presença de receptores do tipo TLR4 na glândula pineal e a ativação deste receptor por LPS foi capaz de inibir a via de síntese de melatonina através da ativação de NF- $\kappa$ B, via esta que inibe a expressão gênica e conseqüente diminuição do conteúdo enzimático da enzima AA-NAT (da Silveira Cruz-Machado et al., 2010).

A glândula pineal de rato apresenta ritmo diário da enzima 3-O-sulfotransferase, que é a primeira enzima biosintética presente em diversas isoformas, responsável por realizar uma modificação específica em 3-O (Shworak et al., 1999) sendo que o pico da enzima ocorre durante o dia (Borjigin et al., 2003). As isoformas 3-OST2 e 3-OST4 são exclusiva e amplamente encontradas em diversas áreas do cérebro, porém, não há conhecimento sobre suas funções até o momento (Kuberan et al., 2004). A ativação de adrenoceptores beta, que ocorre durante a

noite suprime a expressão desta enzima. Estes estudos apesar de apresentarem dados interessantes, não conseguiram fazer correlações fisiológicas ou fisiopatológicas da regulação da sulfatação de heparan sulfatos, ou da própria presença deste glicosaminoglicano com a função pineal.

### 1.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em trabalhos anteriores realizados em nosso grupo de pesquisa foi verificado que padrões moleculares associados a patógenos, a perigo e a dano tecidual ativam o eixo imune-pineal, resultando em uma inibição da síntese de melatonina pela glândula pineal e uma indução da síntese desta indolamina por células imuno-competentes, tais como macrófagos (Muxel et al., 2012). Esta alternância da síntese de melatonina, como hormônio do escuro e molécula moduladora da fase de recuperação de uma resposta inflamatória, é orquestrada pelo fator de transcrição NF- $\kappa$ B. A translocação nuclear do dímero p50/p50 em pinealócitos promove a inibição da síntese de melatonina, enquanto em macrófagos ocorre o inverso devido à translocação do dímero p50/RelA. Moléculas como LPS (da Silveira Cruz-Machado et al., 2010) e o peptídeo  $\beta$ -amilóide (Cecon et al., 2015) levam à ativação do eixo imune-pineal através da atuação sobre receptores toll 4, que também é ativado por moléculas de heparan sulfato. Estas informações foram as bases para a elaboração dos objetivos desta dissertação.

# *6 CONCLUSÃO*

- 1) Heparan sulfato inibe a síntese de melatonina e n-acetilserotonina em glândulas pineais de rato em cultura, por interação com receptores do tipo *tol* 4;
- 3) A via de sinalização ativada pela interação de heparan sulfato com TLR4 na glândula pineal não ocorre obrigatoriamente via NF- $\kappa$ B, sendo esta via ativada somente em doses maiores que 10  $\mu$ g/mL;
- 4) Heparan sulfato inibe a transcrição gênica de *ASMT* e conseqüentemente o conteúdo enzimático também é diminuído;
- 5) Heparan sulfato não induz a produção de melatonina por células imunocompetentes, não podendo ser considerada uma molécula ativadora do eixo imune-pineal.

Este projeto abre novas possibilidades de estudo quanto à forma de atuação de heparan sulfato, principalmente sobre a glândula pineal, visto que poucos artigos tratam sobre sua ativação de TLR4 via sinalização de TRIF, induzindo conseqüentemente a translocação nuclear de IRF3 e ativação da produção de IFN do tipo 1.

# *REFERÊNCIAS*

Ackermann K, Bux R, Rüb U, Korf HW, Kauert G, Stehle JH. Characterization of human melatonin synthesis using autoptic pineal tissue. *Endocrinology*. 2006;147(7):3235-42.

Akbarshahi H, Axelsson JBF, Said K, Malmström A, Fischer H, Andersson R. TLR4 dependent heparan sulphate-induced pancreatic inflammatory response is IRF3-mediated. *Journal of Translational Medicine*. 2011;9:219-26.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783–801.

Alliel PM, Perin JP, Jolles P, Bonnet FJ. Testican, a multidomain testicular proteoglycan resembling modulators of cell social behaviour. *Eur J Biochem*. 1993;214:347-50.

Aravalli RN, Peterson PK, Lokensgard JR. Toll-like receptors in defense and damage of the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2007;2:297-312.

Arendt J. In: *Melatonin and the mammalian pineal gland*. Londres. Ed. Chapman & Hall, 1995. p. 1-35.

Ausseil J, Desmaris N, Bigou S, Attali R, Corbineau S, Vitry S, Parent M, Cheillan D, Fuller M, Maire I, Vanier MT, Heard JM. Early neurodegeneration progresses independently of microglial activation by heparan sulfate in the brain of mucopolysaccharidosis IIIB mice. *PLoS One*. 2008;28;3(5):e2296.doi: 10.1371.

Axelsson J, Xu D, Kang BN, Nussbacher JK, Handel TM, Ley K, Sriramarao P, Esko JD. Inactivation of heparan sulfate 2-O-sulfotransferase accentuates neutrophil infiltration during acute inflammation in mice. *Blood*. 2012;23;120(8):1742-51.

Baler R, Covington S, Klein DC. The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter: cAMP-responsive-element-CCAAT complex. *J Biol Chem*. 1997;272:6979-85.

Balzer I, Höcker B, Kapp H, Bartolomaues B. Occurrence and comparative physiology of melatonin in evolutionary diverse organisms. In: Vanden Driessche T, Guisset JL, Petieau-de Vries GM. *The redox state and circadian rhythms*. Dordrecht; 2000. p. 95-119.

Bame KJ, Danda J, Hassall A, Tumova S. A(1-40) prevents heparanase-catalyzed degradation of heparan sulfate glycosaminoglycans and proteoglycans in vitro. A role for heparan sulfate proteoglycan turnover in Alzheimer's disease, *J of Biol Chem*. 1997;272(27):17005-11.

---

\* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet] Uniform requirements for manuscripts

submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org>

Bellin R, Capila I, Lincecum J, Park PW, Reizes O, Bernfield MR. Unlocking the secrets of syndecans: transgenic organisms as a potential key. *Glycoconj J* 2002;19:295-304.

Beutler B. Microbe sensing, positive feedback loops, and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Immunol Rev*. 2009;227:248-63.

Bezakova G, Ruegg MA. New insights into the roles of agrin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:295–308.

Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc. Biol*. 2007;81:1–5.

Bode L, Salvestrini C, Park PW, Li JP, Esko JD, Yamaguchi Y, Murch S, Freeze HH. Heparan sulfate and syndecan-1 are essential in maintaining murine and human intestinal epithelial barrier function. *J Clin Invest*. 2006;118(1):229-38.

Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.*, 2004;25:280-8.

Borjigin J, Deng J, Sun X, De Jesus M, Liu T, Wang MM. Diurnal pineal 3-O-sulphotransferase 2 expression controlled by beta-adrenergic repression. *J Biol Chem*. 2003;278(18):16315-9.

Brunn GJ, Bungum MK, Johnson GB, Platt JL. Conditional signaling by Toll-like receptor 4. *FASEB J*. 2005;19(7):872-4.

Buée L, Ding W, Anderson JP, Narindrasorasak S, Kisilevsky R, Boyle NJ, Robakis NK, Delacourte A, Greenberg B, Fillit HM. Binding of vascular heparan sulfate proteoglycan to Alzheimer's amyloid precursor protein is mediated in part by the N-terminal region of A4 peptide. *Brain Research*. 1993;627(2):199-204.

Carpentier PA, Duncan DS, Miller SD. Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. *Brain Behav Immun*. 2008;22:140-7.

Carrilo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine*. 2005a;27:189-200.

Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Naji L, Fernandez-Santos JM, Martin-Lacave I, Guerrero JM, Calvo JR. Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/antiinflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. *J Pineal Res*. 2005b;39:400-8.

Carvalho-Sousa CE, Da Silveira Cruz-Machado S, Tamura EK, Fernandes PACM, Pinato L, Muxel SM, Cecon E, Markus RP. Molecular basis for defining

the pineal gland and pinealocytes as targets for tumor necrosis factor. *Frontiers Endocrinol.* 2011;2(10):1-11.

Cássaro CM, Dietrich CP. Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. *J Biol Chem.* 1977;252: 2254-61.

Cecon, Erika. Fator de transcrição NF- $\kappa$ B em glândulas pineais de ratos. Dissertação, Programa de Fisiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Cecon E, Chen M, Marçola M, Fernandes PAC, Jockers R, Markus RP. Amyloid b peptide directly impairs pineal gland melatonin synthesis and melatonin receptor signaling through the ERK pathway. *The FASEB Journal.* 2015; 29.0892-6638/15/0029-0001.

Celhar T, Magalhães R, Fairhurst AM. TLR7 e TLR9 in SLE: when sensing self goes wrong. *Immunol Res.* 2012;53:58-77.

Chattoraj A, Liu T, Zhang LS, Huang Z, Borjigin J. Melatonin formation in mammals: in vivo perspectives. *Rev Endocr Metab Disord.* 2009;10(4):237-43.

Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni JM. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res.* 2000;28(4):193-202.

Csaba G, Baráth P. Morphological changes of thymus and the thyroid gland after postnatal extirpation of pineal body. *Endocrinol Exp.* 1975;9(1):59-67.

Da Silveira Cruz-Machado S, Carvalho-Sousa CE, Tamura EK, Pinato L, Cecon E, Fernandes PACM, Avellar MCW, Ferreira ZS, Markus RP. TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NF $\kappa$ B pathway. *J Pineal Res.* 2010;49:183-92.

Da Silveira Cruz-Machado S, Pinato L, Tamura EK, Carvalho-Sousa CE, Markus RP. Glia-Pinealocyte Network: The Paracrine Modulation of Melatonin Synthesis by Tumor Necrosis Factor (TNF). *Plos One.* 2012;7:e40142.

Dai M, Cui P, Yu M, Han J, Li H, Xiu R. Melatonin modulates the expression of VEGF and HIF-1  $\alpha$  induced by CoCl<sub>2</sub> in cultured cancer cells. *J Pineal Res.* 2008;44(2):121-6.

Dietrich CP, Mcduffie NM, Sampaio LO. Identification of acidic mucopolysaccharides by agarose gel electrophoresis. *J Chromatogr.* 1977;130:299-304.

Dietrich CP, Sampaio LO, Montes De Oca H, Nader HB. Role of sulfated mucopolysaccharides in cell recognition and neoplastic transformation. *An Acad Bras Cienc.* 1980;52(1):179-86.

Dreyfuss JL, Regatieri CV, Jarrouge TR, Cavalheiro RP, Sampaio LO, Nader HB. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. *An Acad Bras Cienc.* 2009;81: 409-29.

Ekström P, Meissl H. Evolution of photosensory pineal organs in new light: the fate of neuroendocrine photoreceptors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003;358(1438):1679-700.

Farach-Carson MC, Carson DD. Perlecan –a multifunctional extracellular proteoglycan scaffold. *Glycobiology.* 2007;17:897-905.

Fassbender K, Walter S, Landmann R. The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease. *FASEB J.* 2003;8:203-5.

Fernandes PA, Bothorel B, Clesse D, Monteiro AW, Calgari C, Raison S, Simonneaux V, Markus RP. Local corticosterone infusion enhances nocturnal pineal melatonin production in vivo. *J Neuroendocrinol.* 2009;21:90-7.

Fernandes PA, Cecon E, Markus RP, Ferreira ZS. 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.* 2006;41:344-50.

Ferreira Zs, Cipolla-Neto J, Markus Rp. Presence of P2 purinoceptors in the rat pineal gland. *Br J Pharmacol.* 1994;112:107-10.

Ferreira ZS, Fernandes PACM, Duma D, Assreuy J, Avellar MCW, Markus RP. Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. *J Pineal Res.* 2005;38:182-8.

Ferreira ZS, Garcia CR, Spray DC, Markus RP. P2Y(1) receptor activation enhances the rate of rat pinealocytes-induced extracellular acidification via calcium-dependent mechanism. *Pharmacology.* 2003;69:33-7.

Filmus J. The contribution of in vivo manipulation of gene expression to the understanding of the function of glypicans. *Glycoconj J.* 2002;19:319-23.

Filmus J, Capurro M, Rast J. Glypicans. *Genome Biol.* 2008;9:224-36.

Fransson LA, Beltin GM, Cheng F, Jonsson M, Mani K, Sandgren S. Novel aspects of glypican glycobiochemistry. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61:1016–24.

Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NK-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:837-48.

Giulian D, Haverkamp LJ, Yu J, Karshin W, Tom D, Li J, Kazanskaia A, Kirkpatrick J, Roher AE. The HHQK domain of beta-amyloid provides a structural basis for the immunopathology of Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 1998;273(45):29719-26.

Goodall KJ, Poon IKH, Phipps S, Hulett DH. Soluble Heparan Sulfate Fragments Generated by Heparanase Trigger the Release of Pro-Inflammatory Cytokines through TLR-4. *Plos one*. 2014;9(10):e109596.

Gotte M. Syndecans in inflammation. *FASEB J*. 2003;17(6):575-91.

Haller O, Kochs G, Weber F. Interferon, Mx, and viral countermeasures. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007;18(5-6):425-33.

Harpsøe NG, Andersen LP, Gögenur I, Rosenberg J. Clinical pharmacokinetics of melatonin: a systematic review. *Eur J Clin Pharmacol*. 2015;71(8):901-9.

Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 2008;8;132(3):344-62.

Hayden MS, Ghosh S. NF-κB in immunobiology. *Cell Res*. 2011;21(2):223-44

Henke CA, Roongta U, Mickelson DJ, Knutson JR, Mccarthy JB. CD44-related chondroitin sulfate proteoglycan, a cell surface receptor implicated with tumor cell invasion, mediates endothelial cell migration on fibrinogen and invasion into a fibrinmatrix. *J Clin Invest*. 1996;97:2541-52.

Hill SM, Belancio VP, Dauchy RT, Xiang S, Brimer S, Mao L, Hauch A, Lundberg PW, Summers W, Yuan L, Frasch T, Blask D.E. Melatonin: an inhibitor of breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2016;22(3):183-204.

Hong X, Nelson KK, De Carvalho AC, Kalkanis SN. Heparanase expression of glioma in human and animal models: laboratory investigation. *J of Neurosurgery*. 2010;113(2):261-9.

Huber R, Mazzarella R, Chen CN, Chen E, Ireland M, Lindsay S, Pilia G, Crisponi L. Glypican 3 and glypican 4 are juxtaposed in Xq26.1. *Gene*. 1998;225:9–16.

Ihrcke NS, Platt JL. Shedding of heparan sulfate proteoglycan by stimulated endothelial cells: evidence for proteolysis of cell surface molecules. *J Cell Physiol*. 1996;168(3):625-37.

Ihrcke NS, Parker W, Reissner KJ, Platt JL. Regulation of platelet heparanase during inflammation: role of pH and proteinases. *J Cell Physiol*. 1998;175(3):255-67.

Ilan N, Elkin M, Vlodaysky I. Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *Intern J Biochem and Cell Biol*. 2006;38(12):2018-39.

Iozzo RV. Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6:646-56.

Jancovic BD, Knezevic Z, Kojic L, Nikolic V. Pineal gland and immune system. Immune functions in the chick embryo pinealectomized at 96 hours of incubation. *Ann NY Acad Sci.* 1994;719:398-409.

Janeway CA, Medzhitov R. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol.* 1998;10:349-50.

Johnson GB, Brunn GJ, Kodaira Y, Platt JL. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by toll like receptor 4. *J Immunol.* 2002;168:5233-9.

Johnson GB, Brunn GJ, Platt JL. An endogenous pathway to systemic inflammatory response syndrome (SIRS)-like responses through toll-like receptor 4. *J Immunol.* 2004;172:20-4.

Kalsbeek A, Garidou ML, Palm IF, Van Der Vliet J, Simonneaux V, Pévet P, Buijs RM. Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *Eur J Neurosci.* 2000;12:3146-54.

Kappers JA. The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1960;52:163-215.

Kato M, Wang H, Kainulainen V, Fitzgerald ML, Ledbetter S, Ornitz DM, Bernfield M. Physiological degradation converts the soluble syndecan-1 ectodomain from an inhibitor to a potent activator of FGF-2. *Nat Med.* 1998;4(6):691-7.

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11:373-84.

Kawamoto T, Li M, Kitazaki T, Iizawa Y, Kimura H. TAK-242 selectively suppresses Toll-like receptor 4-signaling mediated by the intracellular domain. *Eur J Pharmacol.* 2008;584:40-8.

Kjellen L, Lindahl U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem.* 1991;60:443-75.

Klein DC, Moore RY. Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 1979;174:245-62.

Klein DC, Sugden D, Weller JL. Postsynaptic alpha-adrenergic receptors potentiate the beta-adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983;80:599-603.

Klein DC, Weller JL. Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science.* 1970;169(950):1093-5.

Kuberan B, Lech M, Borjigin J, Rosenberg RD. Light-induced 3-O-sulfotransferase expression alters pineal heparan sulfate fine structure. A surprising link to circadian rhythm. *J Biol Chem*. 2004;13;279(7):5053-4.

Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;388:621-5.

Lemaitre B. The road to Toll. *Nature Rev Immunol*. 2004;4:521-7.

Lerner AB., Case JD, Takahashi Y. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc*. 1958;80:2587-94.

Leveugle B, Scanameo A, Ding W, Fillit H. Binding of heparan sulfate glycosaminoglycan to  $\beta$ -amyloid peptide: inhibition by potentially therapeutic polysulfated compounds. *Neuro Report*. 1994;5(11):1389-92.

Liu J, Clough SJ, Hutchinson AJ, Adamah-Biassi EB, Popovska-Gorevski M, Dubocovich ML. MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2016;6;56:361-83.

Lopes C, Delyra JL, Markus RP, Mariano M. Circadian rhythm in experimental granulomatous inflammation is modulated by melatonin. *J Pineal Res*. 1997;23(2):72-8.

Lopes C, Mariano M, Markus RP. Interaction between the adrenal and the pineal gland in chronic experimental inflammation induced by BCG in mice. *Inflamm Res*. 2001;50(1):6-11.

Lotufo CM, Lopes C, Dubocovich ML, Farsky SH, Markus RP. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leucocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur J Pharmacol*. 2001;430(2-3):351-7.

Lucas K, Maes M. Role of the Toll Like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway. *Mol Neurobiol*. 2013;48(1):190-204.

Ma X, Idle JR, Krausz KW, Gonzalez FJ. Metabolism of melatonin by human cytochromes p450. *Drug Metab Dispos*. 2005;33(4):489-94.

Marçola M, da Silveira Cruz-Machado S, Fernandes PACM, Monteiro AWA, Markus RP, Tamura EK. Endothelial cell adhesiveness is a function of environmental lighting and melatonin level. *J Pineal Res*. 2013;54:162-9.

Marçola M, Lopes-Ramos CM, Pereira EP, Cecon E, Fernandes PA, Tamura EK, Camargo AA, Parmigiani RB, Markus RP. Light/Dark Environmental Cycle Imposes a Daily Profile in the Expression of microRNAs in Rat CD133<sup>+</sup> Cells. *J Cell Physiol*. 2016;9999:1–11.

Markus RP, Cecon E, Pires-Lapa MA. Immune-pineal axis: nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) mediates the shift in the melatonin source from pinealocytes to immune competent cells. *Int J Mol Sci.* 2013;24;14(6):10979-97.

Markus RP, Ferreira ZS, Fernandes PA, Cecon E. The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *Neuroimmunomodulation*, 2007;14:126-33.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CAJ. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997;388:394-7.

Miyazono K. TGF-beta receptors and signal transduction. *Int J Hematol.* 1997;65:97-104.

Møller M. Peptidergic cells in the mammalian pineal gland: Morphological indications for a paracrine regulation of the pinealocyte. *Biol Cell.* 1997;89(9):561-7.

Møller M, Baeres FM. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res.* 2002;309:139-50.

Mortani-Barbosa EJ, Ferreira ZS, Markus RP. Purinergic and noradrenergic cotransmission in the rat pineal gland. *Eur J Pharmacol.* 2000;401:59-62.

Muxel SM, Pires-Lapa MA, Monteiro AWA, Cecon E, Tamura EK, Floeter-Winter LM, Markus RP. NF- $\kappa$ B Drives the Synthesis of Melatonin in RAW 264.7 Macrophages by Inducing the Transcription of the Arylalkylamine-N-Acetyltransferase (AA-NAT) Gene. *Plos One.* 2012;7:e52010.

Nader HB, Ferreira TM, Paiva JF, Medeiros MG, Jerônimo SM, Paiva VM, Dietrich CP. Isolation and structural studies of heparan sulfates and chondroitin sulfates from three species of molluscs. *J Biol Chem.* 1984;259(3):1431-5.

Nakada M, Miyamori H, Yamashita J, Sato H. Testican 2 abrogates inhibition of membrane-type matrix metalloproteinases by other testican family proteins. *Cancer Res.* 2003;63:3364-9.

Nakajima M, Irimura T, Nicolson GL. Heparanases and tumor metastasis. *J Cell Biochem.* 1988;36(2):157-67.

Nelson DE, Ihekwaba AE, Elliott M, Johnson JR, Gibney CA, Foreman BE, Nelson G, See V, Horton CA, Spiller DG, Edwards SW, Mcdowell HP, Unitt JF, Sullivan E, Grimley R, Benson N, Broomhead D, Kell DB, White MR. Oscillations in NF- $\kappa$ B signaling control the dynamics of gene expression. *Science.* 2004;306(5696):704-8.

O'Callaghan P, Li JP, Lannfelt L, Lindahl U, Zhang X. Microglial Heparan Sulfate Proteoglycans Facilitate the Cluster-of-Differentiation 14 (CD14)/Toll-like

Receptor 4 (TLR4)-Dependent Inflammatory Response. *J Biol Chem.* 2015;12;290(24):14904-14.

Oh ES, Couchman JR. Syndecans-2 and -4: close cousins, but not identical twins. *Mol Cells.* 2004;17:181-7.

O'Neil LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain containing adaptors in Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:353-64.

Parish CR. The role of heparan sulphate in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(9):633-43.

Pévet P, Bothorel B, Slotten H, Saboreau M. The chronobiotic properties of melatonin. *Cell Tissue Res.* 2002;309(1):183-91.

Pikas DS, Li J, Vlodavsky I, Lindahl U. Substrate specificity of heparanases from human hepatoma and platelets. *J Biol Chem.* 1998;273(30):18770-7.

Pires-Lapa MA, Tamura EK, Salustiano EMA, Markus RP. Melatonin synthesis in human colostrum mononuclear cells enhances dectin-1-mediated phagocytosis by mononuclear cells. *J Pineal Res.* 2013;5:240-6.

Plank LD, Hill GL. Sequential metabolic changes following induction of systemic inflammatory response in patients with severe sepsis or major blunt trauma. *World J Surg.* 2000;24:630-43.

Platt JL, Dalmaso AP, Lindman BJ, Ihrcke NS, Bach FH. The role of C5a and antibody in the release of heparan sulfate from endothelial cells. *Eur J Immunol.* 1991;21(11):2887-90.

Poeggeler B. Melatonin, aging and age-related diseases: perspectives for prevention, intervention and therapy. *Endocrine.* 2005;27(2):201-12.

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.* 2006;41:136-41.

Quay WB. Circadian rhythm in rat pineal serotonin and its modifications by estrous cycle and photoperiod. *Gen Comp Endocrinol.* 1963;14:473-9.

Quay WB. Circadian and estrous rhythms in pineal melatonin and 5-hydroxy indole-3-acetic acid. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1964; 115:710-13.

Reiter RJ. The melatonin rhythm both a clock and a calendar. *Experientia.* 1993;49(8):654-64.

Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann NY Acad. Science.* 2000;917:376-86.

Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Simopoulos AP, Maldonado MD, Flores LJ, Terron MP. Melatonin in edible plants (phytomelatonin): identification, concentrations, bioavailability and proposed functions. *World Rev Nut Diet.* 2007;97: 211-30.

Ribelayga C, Pévet P, Simonneaux V. HIOMT drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the Siberian hamster. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;278(5):1339-45.

Sanderson R, Yang Y. Syndecan-1: a dynamic regulator of the myeloma microenvironment. *Clin Exp Metastasis.* 2008;25:149-59.

Santos, AA. Melatonina sintetizada por microglias de cerebelo em cultura regula o processo de fagocitose. Dissertação, Programa de Fisiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Schnepp A, Komp Lindgren P, Hulsmann H, Kroger S, Paulsson M, Hartmann U. Mouse testican-2. Expression, glycosylation, and effects on neurite outgrowth. *J Biol Chem.* 2005;280:11274-80.

Schröder H, Bendig A, Dahl D, Gröschel-Stewart U, Vollrath L. Neuronal markers in the rodent pineal gland – an immunohistochemical investigation. *Histochemistry.* 1990;94:309-14.

Sen R, Baltimore D. "Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences". *Cell.* 1986;46 (5):705-16.

Shworak NW, Liu J, Petros LM, Zhang L, Kobayashi M, Copeland NG, Jenkins NA, Rosenberg RD. Multiple isoforms of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase. Isolation, characterization, and expression of human cdnas and identification of distinct genomic loci. *J Biol Chem.* 1999;19;274(8):5170-84.

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. *Pharmacol Rev.* 2003;55:325-95.

Sivakumar V, Lu J, Ling EA, Kaur C. Vascular endothelial growth factor and nitric oxide production in response to hypoxia in the choroid plexus in neonatal brain. *Brain Pathol.* 2008;18(1):71-85.

Slominski A, Fischer TW, Zmijewski MA, Wortsman J, Semak I, Zbytek B, Slominski RM., Tobin D.J. On the role of melatonin in skin physiology and pathology. *Endocrine.* 2005;27(2):137-48.

Souza-Teodoro LH, Dargenio-Garcia L, Petrilli-Lapa CL, Souza ES, Fernandes PACM, Markus RP, Ferreira ZS. Adenosine triphosphate (ATP) inhibits melatonin synthesis in the rat pineal gland. *J Pineal Res.* 2016; doi: 10.1111/jpi.12309.

Stigliano I, Puricelli L, Filmus J, Sogayar MC, Bal Dekier Joffe E, Peters MG. Glypican-3 regulates migration, adhesion and actincytoskeleton organization in mammary tumor cells through Wnt signaling modulation. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;114(2):251-62.

Subramanian SV, Fitzgerald ML, Bernfield M. Regulated shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation. *J Biol Chem.* 1997;6;272(23):14713-20.

Sugden D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia.* 1989;45(10):922-32.

Takahashi H, Matsumoto H, Kumon Y, Ohnishi T, Freeman C, Imai Y, Tanaka J. Expression of heparanase in nestin-positive reactive astrocytes in ischemic lesions of rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Neuroscience Letters.* 2007;417(3):250-4.

Tamura EK, Fernandes PA, Marçola M, Da Silveira Cruz-Machado S, Markus RP. Long-lasting priming of endothelial cells by plasma melatonin levels. *PLoS One.* 2010;12;5(11):13958 doi: 10.1371.

Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Paredes SD, Korkmaz A, Sainz RM, Mayo JC, Fuentes-Broto L, Reiter RJ. The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol Rev.* 2010;85:607-23.

Taylor KR, Gallo RL. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J.* 2006;20(1):9-22.

Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature Reviews Immunology.* 2007;7:179-90.

Tsan MF, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol.* 2004;76:514-9.

Vaughan MK, Reiter RJ. Transient hypertrophy of the ventral prostate and coagulating glands and accelerated thymic involution following pinealectomy in the mouse. *Tex Rep Biol Med.* 1971;29(4):579-86.

Veugelers M, Vermeesch J, Reekman SG, Steinfeld R, Marynen P, David G. Characterization of glypican-5 and chromosomal localization of human GPC5, a new member of the glypican gene family. *Genomics.* 1997;40:24-30.

Veugelers M, De Cat B, Ceulemans H, Bruystens AM, Cooman SC, Durr J, Vermeesch J, Marynen P, David G. Glypican-6, a new member of the glypican family of cell surface heparin sulfate proteoglycans. *J Biol Chem.* 1999;274:26968-77.

Vlodavsky I, Beckhove P, Lerner I, Pisano C, Meirovitz A, Ilan N, Elkin M. Significance of heparanase in cancer and inflammation. *Cancer Microenvironment.* 2012;5(2):115-32.

Vriend J, Reiter RJ. Breast cancer cells: Modulation by melatonin and the ubiquitin-proteasome system - A review. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;5;417:1-9.

Wang L, Fuster M, Sriramarao P, Esko JD. Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses. *Nat Immunol.* 2005;6(9):902-10.

Wolfe DE, Potter LT, Richardson KC, Axelrod J. Localizing tritiated norepinephrine in sympathetic axons by electron microscopic autoradiography. *Science.* 1962;138:440-2.

Wrenshall LE, Cerra FB, Singh RK, Platt JL. Heparan Sulfate Initiates Signals in Murine Macrophages Leading to Divergent Biologic Outcomes. *The Journal of Immunology.* 1995;154:871-80.

Wu M, Wang H, Shi J, Sun J, Duan Z, Li Y, Li J, Hu N, Wei Y, Chen Y, Hu Y. Gene expression profiles identify both MyD88-independent and MyD88-dependent pathways involved in the maturation of dendritic cells mediated by heparan sulfate: a novel adjuvant. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(12):3711-21.

Zhang X, Wang B, O'Callaghan P, Hjertström E, Jia J, Gong F, Zcharia E, Nilsson LN, Lannfelt L, Vlodaysky I, Lindahl U, Li JP. Heparanase overexpression impairs inflammatory response and macrophage-mediated clearance of amyloid- $\beta$  in murine brain. *Acta Neuropathol.* 2012;124(4):465-78.