Pedro Augusto Carlos Magno Fernandes

Regulação da produção hormonal da glândula pineal
de ratos por moduladores do processo inflamatório.

São Paulo

2009

I. RESUMO

A melatonina produzida pela glândula pineal apresenta diversas ações reguladoras da homeostase dinâmica interna de mamíferos. Suas ações abrangem tanto a regulação de funções endógenas circadianas e sazonais em situações de hígidez quanto durante processos fisiopatológicos. O presente trabalho avalia o efeito dos moduladores de processos inflamatórios corticosterona, TNF e IFN γ sobre o metabolismo da glândula pineal. Os resultados aqui apresentados mostram que: 1- Corticosterona potencia a síntese de noradrenalina *in vivo* e *in vitro* na vigência de estimulação β -adrenérgica, mas inibe a produção induzida por estimulação concomitante α e β -adrenérgica. 2- Este efeito é dependente de ativação de GR e não altera a captação extraneuronal de catecolaminas. 3- Corticosterona aumenta a expressão do transcrito *aa-nat* e a atividade das enzimas AA-NAT e HIOMT. 4 - Corticosterona inibe o acúmulo nuclear de NF- κ B. 5- A inibição farmacológica da via NF- κ B mimetiza o efeito potenciador da corticosterona sobre a produção hormonal da pineal. 6 - IFN- γ inibe a via NF- κ B. 7 - IFN- γ potencia a produção de melatonina pela glândula pineal. 8- TNF ativa a via NF- κ B. 9 - TNF inibe a produção de melatonina pela pineal. 10- TNF inibe transitoriamente a expressão do transcrito *aa-nat* e NAS. 11 - A transitoriedade deste efeito é dependente de neosíntese protéica. O presente trabalho mostra que a glândula pineal está aparelhada para responder a diferentes agentes moduladores de processos inflamatórios além de fortalecer e darem base para a hipótese da existência de um **eixo imune-pineal** central no controle de processos patológicos em mamíferos.

II. INTRODUÇÃO

1. Glândula Pineal

A glândula pineal foi batizada pelo médico e filósofo Cláudio Galeno (131-200) em vista do seu formato de *pineale* que, em latim, quer dizer nó de pinho. O debate da época girava em torno da estrutura que seria responsável pelo fluxo da chamada “psico pneuma” entre os hemisférios cerebrais. Havia uma disputa se esta seria a função da pineal ou de uma estrutura vermiforme, como sugerido por Galeno. Já no século XVII o filósofo e matemático francês René Descartes (1596-1650), em *As Paixões da Alma*, disse que “há uma pequena glândula no cérebro, na qual a alma exerce suas funções mais particularmente do que nas outras partes” (Descartes, 1973; p.238). Ele dizia que esta glândula seria a pineal, que captaria o espírito do animal controlando movimentos corporais, sensações, memória e imaginação. Apesar de Descartes ter estudado as bases anatômicas da pineal, as proposições conceituais de Galeno é que foram comprovadas ao longo dos anos.

Em humanos, esta glândula está localizada na parte rostro-dorsal da base do cérebro na junção entre o encéfalo e o cerebelo. Ela é uma estrutura epitalâmica derivada de células neuroectodérmicas e, a exemplo da retina, desenvolve-se a partir de uma invaginação do teto da parede do terceiro ventrículo (para revisão ver Duvernoy & Risold, 2007). Em roedores, a pineal está dividida em uma porção superficial, localizada entre os hemisférios cerebrais, e outra profunda na base do cérebro conectadas por um longo e fino pedúnculo (Vollrath, 1981).

Em 1898, as observações pioneiras de Otto Heubner (pediatra alemão) sobre a associação entre tumor pineal e puberdade precoce em três meninas levou à sugestão de que esta estrutura produziria um hormônio antigonadotrófico, colocando a glândula pineal como um elo no controle do sistema reprodutor. Na década de cinquenta, pesquisadores estabeleceram a ligação entre esta glândula e a reprodução ao estudarem os efeitos de extratos da pineal sobre útero de ratas (Kitay & Altschule, 1954). Na sequência, no final

da década de cinquenta, Aaron Lerner isolou de pineais de bovinos um fator capaz de agregar melanóforos, a **melatonina** (Lerner *et al.*, 1958), sintetizada a partir da serotonina (Lerner *et al.*, 1959). Na década seguinte foi demonstrado o ritmo diário da síntese de serotonina (Quay, 1963) e melatonina (Quay, 1964) em pineais de ratos.

A variação do fotoperíodo ao longo das estações do ano influencia vários aspectos da fisiologia interna e do comportamento reprodutivo de diversas espécies. Os primeiros trabalhos que mostraram os efeitos diferenciais da pineal sobre a capacidade reprodutiva de roedores usaram como modelo o hamster, cujas alterações sazonais na reprodução eram bem descritas (Hoffman *et al.*, 1965). Quando estes animais são mantidos em fotoperíodo curto (ou cujos globos oculares são removidos) apresentam redução testicular que é revertida por pinealectomia (Hoffman & Reiter, 1965a). Este efeito não é observado em animais mantidos em fotoperíodo longo (Hoffman & Reiter, 1965b). Estes estudos foram pioneiros na demonstração da glândula pineal como controladora de processos fisiológicos temporalmente regulados. Atualmente, diversos trabalhos têm caracterizado esta glândula como um importante transdutor neuroendócrino que recebe a informação luminosa captada pela retina e, integrada nos núcleos supraquiasmáticos (NSQ), a retransmite para o resto do organismo por meio do pico noturno de melatonina (para revisão ver Simonneaux e Ribelayga, 2003).

Estudos sobre a estrutura celular e morfológica da pineal, bem como de seu desenvolvimento e diferenciação celular, possibilitaram a caracterização de diferentes fenótipos celulares desta glândula. Em mamíferos são descritos cinco tipos básicos de células na pineal. O fenótipo celular mais abundante é o pinealócito, célula produtora de hormônio, identificada pela presença das enzimas da via biossintética da melatonina: arilalquilamina-N-acetiltransferase (AA-NAT) e hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) (Pfeffer *et al.*, 1999; Ribelayga *et al.*, 1999). Os outros fenótipos celulares são: células intersticiais que expressam marcadores gliais (Calvo *et al.*, 1988), fagócitos perivasculares que expressam proteínas de membrana características de macrófagos e microglia

(Pedersen *et al.*, 1993; Sato *et al.*, 1996) e neurônios clássicos e peptidérgicos (para revisão ver Møller & Baeres, 2002).

As células pineais organizam-se em grupos que se comunicam eletricamente (Schenda & Vollrath, 1998; Reuss, 1985). O padrão de comunicação entre estas células é alterado por noradrenalina, acetilcolina e concentração de cálcio ($[Ca^{2+}]$) extracelular (Schenda & Vollrath, 1999). Este padrão de organização, semelhante ao que ocorre em músculo liso (para revisão ver Brading, 2006), sugere que a informação neural chega a uma célula e é transmitida para as demais. Uma heterogeneidade entre os pinealócitos também foi constatada ao se estudar a função nitridérgica. Uma subpopulação de células expressa constitutivamente a sintase de óxido nítrico neuronal (nNOS, do inglês, *neuronal nitric oxide synthase*) e produz óxido nítrico (NO) após estimulação de adrenoreceptores (Spessert *et al.*, 1998). Estas células estão geralmente rodeadas de células nNOS negativas mas, que produzem guanosina monofosfato (GMP) cíclico quando estimuladas por NO sugerindo que as diferentes subpopulações celulares estejam trocando informações (Spessert *et al.*, 1998).

A principal inervação da glândula pineal é a simpática (Kapers, 1960), que libera os mediadores clássicos desta via, noradrenalina (Klein, 1985) e adenosina trifosfato (ATP) (Barbosa *et al.*, 2000), e apresenta o peptídeo Y, já caracterizado em outros terminais simpáticos (para revisão ver Simonneaux & Ribelayga, 2003). Esta via será descrita em detalhes mais adiante, focalizando a síntese de melatonina. A glândula pineal também recebe projeções colinérgicas (Phansuwan-Pujito *et al.*, 1999). Além disso, a glândula desnervada em cultura produz acetilcolina (Wessler *et al.*, 1997). A ativação de receptores colinérgicos dos pinealócitos resulta na despolarização da membrana, aumento da $[Ca^{2+}]$ intracelular e secreção de glutamato (Letz *et al.*, 1997; Yamada *et al.*, 1998). A exemplo do que ocorre em outros sistemas (Reno *et al.*, 2004), glutamato promove a liberação de glutamato em células da pineal (Kim *et al.*, 2008). Interessante notar que este aminoácido provavelmente inibe a síntese de melatonina induzida por noradrenalina (Kus *et al.*, 1994).

1.1. CONTROLE DA PRODUÇÃO DE MELATONINA PELA PINEAL

A melatonina é sintetizada a partir do triptofano, proveniente da circulação, que é inicialmente convertido a 5-hidroxitriptofano (5-HTP) sob a ação da triptofano hidroxilase 1 (TPH 1) (Lovenberg *et al.*, 1967). Esta é a enzima limitante da síntese de serotonina (5-HT), sendo sua atividade, em roedores, aumentada duas vezes na fase de escuro (Sugden, 2003). O 5-HTP é descarboxilado, através da enzima 5-HTP descarboxilase, dando origem à serotonina (Snyder & Axelrod, 1964), que é substrato de diferentes rotas metabólicas. A serotonina pode ser acetilada pela ação da enzima AA-NAT originando a N-acetilserotonina (NAS) (Axelrod & Weissbach, 1960; Voisin *et al.*, 1984), que é metilada pela HIOMT formando a melatonina (Axelrod & Weissbach, 1960). A segunda via metabólica, considerada uma via de catabolismo, promove a deaminação oxidativa da serotonina pela monoaminoxidase (MAO) forma o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (para revisão ver Simmoneuax & Ribelayga, 2003).

O neurônio simpático que inerva a glândula pineal (Kapers, 1960) libera noradrenalina (NA) (Klein, 1985) que interage com receptores adrenérgicos α_1 e β_1 localizados nos pinealócitos. A liberação noturna de NA é 100 vezes maior que a diurna (Drijfhout *et al.*, 1996) e o ritmo diário dos adrenoceptores β_1 faz com que a maior densidade seja encontrada na transição claro/escuro (Romero & Axelrod, 1974; Panger *et al.*, 1990). Estes receptores estão acoplados à proteína G estimulatória (G_s) e sua ativação induz a síntese de adenosina monofosfato (AMP) cíclico (Strada *et al.*, 1972) induzindo um aumento de sua concentração de até 10x em relação ao basal (Vanecek *et al.*, 1985). A estimulação simultânea de receptores adrenérgicos α_1 e β_1 promove um aumento adicional deste segundo mensageiro, devido ao *cross-talk* entre as vias inositol trifosfato (IP_3) e AMP cíclico, visto que a atividade da adenilil ciclase (AC) é potenciada ao ser fosforilada por proteína quinase dependente de Ca^{2+} (PKC) (Tzavara *et al.*, 1996). Em condições de hígidez apenas os adrenoceptores β_1 são ativados, visto que o bloqueio dos adrenoceptores α_1 não reduz a produção de melatonina

(Tobin *et al.*, 2002). Já em condições de resposta à injúria, quando o eixo hipotálamo – hipófise – adrenal (HPA) é ativado, há um aumento da quantidade de noradrenalina disponível na fenda sináptica (Sabban *et al.*, 2004; Serova *et al.*, 2008), o que poderia resultar na ativação dos dois subtipos de receptores. Os nervos conários, quando estimulados, também liberam ATP (Barbosa *et al.*, 2000) que, ativando receptores purinérgicos P2Y₁, levam à ativação da via dependente de IP₃ (Ferreira *et al.*, 2003). Estes experimentos foram todos feitos *in vitro* e ainda não há confirmação da relevância destes receptores na atividade regular de glândulas pineais *in vivo*.

O aumento de AMP cíclico após estimulação β_1 -adrenérgica ativa a proteína quinase dependente de AMP cíclico II (PKA II) (Klein *et al.*, 1970). A fosforilação do fator de transcrição CREB (do inglês, *cyclic AMP response element binding*) facilita a sua ligação a elementos responsivos ao AMP cíclico (CRE) presentes nos promotores das enzimas TPH 1 (Besançon *et al.*, 1996 e 1997) e AA-NAT (Baler *et al.*, 1997; Burke *et al.*, 1999) aumentando a formação dos respectivos transcritos (Klein *et al.*, 1997). A fosforilação das enzimas TPH 1 (Gastel *et al.*, 1998) e AA-NAT (Ganguly *et al.*, 2002) aumenta a atividade das mesmas. Portanto, AMP cíclico atua sobre a via biossintética da melatonina induzindo a transcrição dos genes e as atividades das enzimas TPH 1 e AA-NAT. A fosforilação da AA-NAT impede sua degradação por proteassomas levando a um acúmulo citoplasmático desta enzima (Coon *et al.*, 2002). É preciso ressaltar que o aumento sobre TPH 1 é muito menor que o observado para a AA-NAT, que é praticamente indetectável na fase de claro.

O papel da AA-NAT como enzima chave na síntese e liberação de melatonina é conhecido desde a década de oitenta (Klein, 1985). De fato, em todas as espécies estudadas até o momento, a atividade da AA-NAT é baixa durante o dia e bastante elevada na fase de escuro, independente do animal ser de hábito diurno (Reiter *et al.*, 1984) ou noturno (Klein & Weller, 1970). O equilíbrio dinâmico do conteúdo da enzima AA-NAT é determinado pelo controle da síntese do RNAm e da degradação da proteína por dois mecanismos moleculares, dependentes de AMP cíclico e ativação de PKA II.

Como mencionado anteriormente, um mecanismo envolve o controle do conteúdo de RNAm da AA-NAT por meio da regulação da sua transcrição (Klein *et al.*, 1997) e/ou da degradação da mensagem (Guillaumond *et al.*, 2000) e o outro mecanismo envolve a inibição da proteólise desta enzima (Ganguly *et al.*, 2001).

Em algumas espécies a alteração na transcrição do gene da AA-NAT ocorre em base circadiana. Em roedores, onde este mecanismo é mais evidente, a diferença no conteúdo de RNAm da AA-NAT entre o dia e a noite chega a ser superior a 100 vezes (Borjigin *et al.*, 1995; Coon *et al.*, 1995). Como foi visto, o CREB fosforilado liga-se ao seu elemento responsivo, localizado na região promotora e no primeiro íntron do gene da AA-NAT, ativando a sua transcrição (Coon *et al.*, 2001). O aumento do conteúdo de RNAm da AA-NAT é seguido pelo aumento nos níveis protéicos e de atividade da enzima (Klein *et al.*, 1997). Recentemente, foi demonstrado que a fosforilação do resíduo 31 (treonina) é uma etapa fundamental para o aumento da atividade da enzima AA-NAT, pois permite a sua ligação com a proteína 14-3-3 formando um complexo proteína/proteína estável que expõem o sítio de ligação da enzima ao seu substrato (Coon *et al.*, 2001; Ganguly *et al.*, 2001, Klein *et al.* 2002). A fosforilação da enzima AA-NAT e sua formação de complexo com a 14-3-3 são os mecanismos que a protegem contra a degradação por proteossomas citosólicos (Gastel *et al.*, 1998; Ganguly *et al.*, 2002). Detalhes sobre a via biossintética da melatonina na figura 1.

A análise molecular da ativação noturna da AA-NAT tem sido realizada em ratos (Borjigin *et al.*, 1995; Roseboom & Klein, 1995; Roseboom *et al.*, 1996; Baler *et al.*, 1997; Gastel *et al.*, 1998; Ganguly *et al.*, 2001) e em outros roedores de hábito noturno, como hamster (Gauer *et al.*, 1999) e camundongos (Foulkes *et al.*, 1986; Roseboom *et al.*, 1998). Em todos os roedores estudados foi observado um controle na transcrição do gene da AA-NAT. Por outro lado, a regulação desta enzima em ungulados e primatas é diferente. Em ovelhas (Coon *et al.*, 1995), bovinos (Craft *et al.*, 1999) e primatas (Klein *et al.*, 1997) não há variação diária da quantidade de RNAm, mas sim do conteúdo da proteína. Neste caso

está em operação apenas o segundo mecanismo regulatório dependente de AMP cíclico, ou seja, a inibição da proteólise de AA-NAT (Gastel *et al.*, 1998). O aumento noturno dos níveis protéicos e da atividade da AA-NAT depende de mecanismos regulatórios pós-transducionais. Assim, em bovinos e humanos a proteína da AA-NAT é sintetizada continuamente a partir do RNAm e destruída por proteólise proteassomal durante o dia. Durante a noite, a produção de AMP cíclico induzida por noradrenalina protege a AA-NAT de proteólise e permite seu acúmulo citoplasmático, ativação e consequente síntese de melatonina (Schomerus *et al.*, 2000).

Considerando estas diferenças na regulação da AA-NAT, foi sugerido que a síntese de melatonina poderia ser controlada de maneira diferente em roedores de hábito noturno ou diurno. Simonneaux e colaboradores testaram esta hipótese analisando as bases genéticas da ativação da AA-NAT e a síntese de melatonina na glândula pineal do roedor de hábito diurno *Arvicanthis ansorgei*. Esta é uma espécie de roedor africano que apresenta atividade diurna também nas condições controladas de laboratório. O gene da AA-NAT nesta espécie mostrou 86% de homologia ao gene clonado do rato Wistar (*Rattus norvegicus*), animal de hábito noturno. O perfil diário do RNAm da AA-NAT, a regulação noradrenérgica da atividade da enzima e a síntese de melatonina foram similares em ambas as espécies de roedores (Garidou *et al.*, 2002). Em outras palavras, os autores mostraram que a estimulação com agonista de adrenoceptor β durante a fase de claro leva a um aumento da produção de melatonina e esta é bloqueada com a administração noturna de propranolol (antagonista β). Além disso, a capacidade da melatonina de atuar sobre o relógio é semelhante nos dois modelos. Em animais mantidos em escuro constante (livre-curso), a infusão diária de melatonina arrasta, por exemplo, o ritmo circadiano de atividade locomotora (Slotten *et al.*, 2002). Portanto, tanto os roedores de hábito noturno quanto os de hábito diurno têm mecanismos semelhantes de produção do hormônio que marca a noite, e este atua sobre o relógio da mesma forma.

Figura 1. Controle noradrenérgico da produção de melatonina pela glândula pineal de ratos. A liberação noturna de NA pelas fibras simpáticas provenientes do gânglio cervical superior ativa receptores adrenérgicos dos subtipos α_1 e β . Os receptores β -adrenérgicos são receptores de sete domínios transmembrânicos acoplados à proteína Gs que, quando ativados, induzem a conversão de ATP em AMP cíclico (AMPc) pela adenilil ciclase (AC). Os receptores do subtipo α_1 -adrenérgico também são de sete domínios transmembrânicos, mas acoplados à proteína Gq que ativa a fosfolipase C (PLC) induzindo a produção de inositol trifosfato (IP_3) que, por sua vez, induz o aumento intracelular de cálcio levando a ativação da PKC. A PKC aumenta a produção de AMP cíclico modulando positivamente a AC. O aumento de AMP cíclico ativa PKA que fosforila o fator de transcrição CREB. Este fator vai ao núcleo e ativa a transcrição do RNA mensageiro da enzima AA-NAT. Uma vez transcrita e traduzida a AA-NAT pode ser degradada por ação proteassomal ou então fosforilada pela PKA. Quando fosforilada ela se liga à proteína 14-3-3 que a protege da degradação e altera sua conformação expondo seu sítio ativo. Uma vez ativada, AA-NAT converte a 5-HT originada do metabolismo do aminoácido triptofano em NAS que, pela ação da enzima HIOMT, forma melatonina. Tanto melatonina quanto NAS são liberadas na corrente sanguínea.

2. Sistema oscilatório endógeno

A glândula pineal e seu principal hormônio, a melatonina, desempenham um papel chave na sincronização de ritmos endógenos do organismo ao ciclo claro-escuro ambiental. A síntese de melatonina é sincronizada pela luz, sendo que este hormônio age tanto sobre o relógio biológico - NSQ - quanto sobre diferentes elementos do sistema biológico, tendo assim uma ação pleiotrópica. A seguir será apresentado como o sistema oscilatório endógeno de mamíferos controla a produção de melatonina pela glândula pineal e a produção de glicocorticóides pelas adrenais, por serem os hormônios relevantes para esta tese.

Os seres vivos, na sua forma mais simples, como os seres unicelulares, até sua forma mais complexa, como os vertebrados, são estruturados no tempo e no espaço. A maioria dos parâmetros bioquímicos, fisiológicos e comportamentais dos organismos apresenta flutuações diárias que persistem sob condições constantes, indicando a incorporação de osciladores endógenos aos sistemas responsivos às variações cíclicas ambientais. A principal função resultante desta característica é a organização do decurso temporal das funções biológicas de modo a antecipar as mudanças cíclicas ambientais de acordo com o hábito de vida do indivíduo (Menaker *et al.*, 1997).

A endogenicidade dos ritmos biológicos é conhecida há muito tempo. Jean Lacques de Mairan, em 1729, constatou que o movimento diário de abertura e fechamento dos folíolos de uma planta da família da Mimosa é mantido mesmo em um ambiente desprovido de variação circadiana de claro e escuro. Contudo, os ritmos endógenos são ajustáveis aos ritmos externos por meio do processo de arrastamento que consiste, resumidamente, na modificação do período e da fase de um oscilador circadiano por ritmos ambientais. Aschoff em 1960 foi quem primeiro cunhou o termo *zeitgeber* (doador de tempo, em alemão) para os ciclos ambientais capazes de promover este arrastamento, sendo o ciclo claro/escuro ambiental o principal *zeitgeber* dos mamíferos (para revisão ver Menaker *et al.*, 1997).

No centro dos sistemas que controlam e regulam os ritmos endógenos dos vertebrados estão três tipos de estruturas funcionais que se interconectam em um sistema oscilatório central. A primeira capta a informação do oscilador externo (*zeitgeber*) e a transmite para um controlador central (relógio biológico central) que ajusta a sua ritmicidade intrínseca ao meio ambiente e regula o funcionamento das estruturas responsáveis pela propagação da informação para o resto do organismo. No caso dos mamíferos, células ganglionares especializadas da retina captam as informações fóticas ambientais por meio do pigmento fotorreceptor melanopsina (Provencio *et al.*, 2000) e as transmite via trato retino-hipotalâmico para os NSQ (Hattar *et al.*, 2002). Os NSQ, por meio de projeções neuronais específicas (que serão mais bem abordadas adiante) modulam a ritmicidade dos osciladores periféricos, dentre eles, a glândula pineal.

Como comentado, os NSQ constituem uma das estruturas anatômicas mais importantes na geração e manutenção de ritmos circadianos em mamíferos. A lesão dos NSQ resulta na perda de vários ritmos circadianos em diferentes funções ou vias metabólicas como, por exemplo, locomoção, ingestão de líquidos (Schwartz *et al.*, 1980), produção de corticosterona pela adrenal de ratos (Moore & Eichler, 1972) e produção de melatonina pela glândula pineal (Moore & Klein, 1974).

Como podemos observar na figura 2, os diversos ritmos endógenos controlados pelos NSQ apresentam períodos e fases próprias em relação ao *zeitgeber* ambiental. Estas diferenças podem ser parcialmente explicadas pelo fato dos NSQ emitirem projeções para diferentes regiões do sistema nervoso central. As projeções que aferentam neurônios endócrinos, neurônios pré-autonômicos e interneurônios são bem descritas (para revisão ver Kalsbeek *et al.*, 2006). Além disso, trabalhos que avaliaram a eletrofisiologia e a biologia molecular revelam a existência de subpopulações neuronais nos NSQ (La Iglesia *et al.*, 1999) que se projetam para regiões diferentes e produzem neurotransmissores específicos e com acrofases próprias (Saeb-Parsy & Dyball, 2003). Pelo menos quatro subdivisões dos NSQ são conhecidas em relação às

suas diferentes acrofases. A primeira subpopulação neuronal apresenta acrofase em ZT 2 (*zeitgeber time*, ZT 0 é definido como sendo o começo da fase de luz), produz vasopressina (VP) e ácido γ -aminobutírico (GABA) e inibe a produção de glicose hepática e corticosterona. A segunda possui acrofase em ZT 6 (acredita-se que de 50 a 60 % dos neurônios dos NSQ façam parte deste grupo), produz GABA e inibe o pico noturno de melatonina. Há ainda mais duas populações de neurônios com acrofases em ZT 10 e ZT 18 cujos neurotransmissores não são conhecidos. A primeira (ZT 10) modula a produção de corticosterona ativando o eixo HPA e a segunda (ZT 18) o pico noturno de melatonina (para revisão ver Kalsbeek *et al.*, 2006).

Os NSQ controlam as produções de melatonina e corticosterona a partir de vias que apresentam congruências e diferenças anatômicas. Com relação à síntese circadiana de melatonina os NSQ enviam projeções para o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN, do inglês, *paraventricular nucleus*) que, por sua vez, projeta-se para a porção intermédia lateral (IML) da medula espinhal. A partir daí, via gânglio cervical superior (GCS), a informação é passada para a glândula pineal induzindo a produção de melatonina. Já a produção rítmica de corticosterona é estimulada pelos NSQ tanto por uma via neuroendócrina, que passa pelo núcleo dorsomedial do hipotálamo (DMH, do inglês, *dorsomedial nucleus of hypothalamus*) (Teclemariam-Mesbah *et al.*, 1999; Buijs & Kalsbeek, 2001; Kalsbeek & Buijs, 2002), quanto por uma via autonômica composta pelo PVN e pela porção IML da medula (Buijs *et al.*, 1999; Ulrich-Lai *et al.*, 2006).

Os neurônios projetados a partir dos NSQ para a divisão autonômica do núcleo paraventricular são VIPérgicos (do inglês, *vasoactive intestinal peptide*), vasopressinérgicos (Buijs *et al.*, 1999) e GABAérgicos (Kalsbeek *et al.*, 1993). A estimulação de receptores GABAérgicos reduz o fluxo simpático na fase de escuro e inibe o aumento noturno de melatonina. Confirmando esta observação, o bloqueio GABAérgico do PVN ou a ablação dos NSQ elevam a concentração do RNAm da AA-NAT na fase de escuro (Kalsbeek *et al.*, 2000). Em resumo, durante o claro, a ativação das fibras GABAérgicas provenientes dos NSQ inibe

o tráfego simpático resultando no bloqueio da produção de melatonina (para revisão ver Simonneaux & Ribelayga, 2003).

Figura 2. Ritmos hormonais de mamíferos de hábito noturno. Esquema baseado em dados apresentados por Kalsbeek e col, (2006) mostrando os diferentes ritmos de produção circadiana dos hormônios corticosterona, hormônio estimulante da tireóide (TSH), hormônio luteinizante (LH), prolactina, leptina e melatonina. Nesta figura podemos observar que, em animais de hábito noturno, o pico de corticosterona, LH, prolactina e leptina ocorrem próximo à transição claro/escuro e o de melatonina está todo localizado na fase de escuro. Por outro lado, também é exemplificado um hormônio, TSH, que tem um ritmo ultradiano apresentando dois picos, um no meio da fase de claro e outro no meio da fase de escuro.

Com relação à produção de corticosterona, o PVN é responsável pelo controle da neuro e adeno-hipófise. As grandes células hipotalâmicas que se localizam ao redor do terceiro ventrículo enviam axônios diretamente para a hipófise posterior onde os terminais liberam ocitocina e vasopressina. Células menores, da mesma área, aferentam os núcleos dorsomediais do hipotálamo e secretam neurotransmissores específicos no sistema porta-hipofisário anterior

(para revisão ver Kalsbeek *et al.*, 2006). Estes fatores induzem a secreção de hormônios da adeno-hipófise, entre eles o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) responsável pela estimulação do córtex da adrenal. Além do controle endócrino os NSQ também controlam a produção de corticosterona por via neural. A projeção do PVN para a porção IML da medula não só alcança o gânglio cervical superior, mas também chega ao córtex da adrenal (Buijs *et al.*, 1999), à glândula tireóide (Kalsbeek *et al.*, 2000) e ao fígado (La Fleurs, 2000) controlando por uma via neural direta, e não pela clássica via neuroendócrina, a secreção de corticosterona.

Por fim, a administração de oligonucleotídeos antisense para VIP nos NSQ bloqueia temporariamente o ritmo circadiano da secreção de corticosterona, mas não altera os picos de corticosterona relacionados com estresse (Scarbrough *et al.*, 1996). Um pulso de luz durante a fase de escuro reduz os níveis plasmáticos de melatonina e de corticosterona em ratos, sem modificar os níveis plasmáticos de ACTH. Já a ablação dos NSQ, que aumenta *per se* os níveis de corticosterona (Buijs *et al.*, 1993), impede que um pulso de luz na fase de escuro leve a uma redução da corticosterona (Buijs *et al.*, 1999). Se, no mesmo intervalo de tempo, ao invés de ser apresentado ao animal um pico de luz, este for colocado em um ambiente novo (forma de estresse) ocorre um aumento de corticosterona e uma elevação do pico de ACTH. Assim sendo, os NSQ utilizam uma via neural para enviar sua mensagem sobre a iluminação ambiental não somente para a pineal, mas também para a adrenal através de eferências do sistema nervoso autônomo simpático (Fig. 3).

3. Moduladores do processo inflamatório

Assim como a organização temporal dos organismos garante a sobrevivência dos indivíduos em situações de higidez, durante o combate a injúrias, diversos moduladores são produzidos de maneira temporalmente padronizada, de modo a garantir que a montagem e a resolução do quadro ocorram apropriadamente. A resposta imune inata é a primeira linha de defesa do organismo contra agentes injuriantes. Seu objetivo é induzir a migração

leucocitária ao tecido injuriado de forma a eliminar o agente agressor e, quando necessário, recompor o tecido alterado.

Figura 3. Controle da produção circadiana de melatonina e de corticosterona pelo sistema oscilatório endógeno. Esquema baseado no apresentado por Schultz & Kay (2003) sobre a produção de melatonina e corticosterona em roedores de hábito noturno. A informação fótica ambiental captada pela retina chega aos núcleos supraquiasmáticos (NSQ) pelo trato retino-hipotalâmico e é retransmitida para o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). O PVN envia então aferências para a coluna intermédia lateral que, via gânglio cervical posterior (GCS), induz a síntese noturna de melatonina. O PVN controla a produção de corticosterona da adrenal por uma via neuronal direta pela porção IML da medula ou então por uma via neuroendócrina que resulta na produção e liberação sistêmica de ACTH pela hipófise.

Macrófagos residentes são as primeiras células a reagirem produzindo a citocina pró-inflamatória TNF (do inglês, *tumor necrosis factor*; considerações sobre a nomenclatura desta citocina serão descritas adiante) que recruta novas células para o foco inflamatório. Do mesmo modo, as células NK (do inglês, *natural killer*) são linfócitos que matam células infectadas e produzem interferon gama (IFN- γ) que, por sua vez, ativam novos macrófagos (Medzhitov &

Janeway, 2000). Um exemplo disto é que macrófagos estimulados por IFN- γ produzem coestimuladores que aumentam a ativação de células T e a produção de interleucina 12 (IL-12) e esta citocina induz a produção de mais IFN- γ por este tipo celular (para revisão ver Abbas & Lichtman, 2005). As citocinas produzidas nesta fase estimulam a natureza da resposta adaptativa subsequente.

Durante quadros de infecções severas como observadas, por exemplo, na sepsis, a produção excessiva de citocinas circulantes pode causar à morte do hospedeiro (para revisão ver Hack *et al.*, 1997) ficando claro que o controle temporal e da magnitude de suas produções devam ser bem regulados. O contraponto da resposta pró-inflamatória é dado pela ação de moduladores anti-inflamatórios, como os glicocorticóides. Na verdade, a dinâmica de um processo de defesa traz em seu cerne a ativação do eixo HPA. Citocinas como TNF e IFN- γ são capazes de ativar este eixo (para revisão ver Turnbull & Rivier, 1999) integrando o mecanismo de autocontrole exercido pelos glicocorticóides sobre o processo inflamatório. Em roedores inflamados com lipopolissacarídeo de bactérias Gram-negativas (LPS) o pico de produção plasmática de TNF (Wu *et al.*, 2001; Carrillo-Vico *et al.*, 2005) ocorre após duas horas e o de IFN- γ após seis horas da administração do agente agressor (Carrillo-Vico *et al.*, 2005). Já os glicocorticóides atingem seu pico de concentração plasmática três horas após a administração de LPS (Nadeau & Rivest, 2003).

Como será explicado adiante, os glicocorticóides atuam via receptores citoplasmáticos para glicocorticóides (GR, do inglês, *glucocorticoid receptor*); a citocina TNF pela via, dentre outras, do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B, do inglês, *nuclear factor κ B*) e o IFN- γ principalmente pela via das STATs (do inglês, *signal transducer and activator of transcription*; para revisão ver Abbas & Lichtman, 2005). Estas vias, centrais no controle de processos inflamatórios, são capazes de se comunicar entre si, de forma que o *cross-talk* entre elas é mais um mecanismo de regulação da resposta imune inata (para revisão ver De Bosscher *et al.*, 2003). Muitas outras vias e moduladores pró e anti-inflamatórios são importantes no controle de respostas de defesa, contudo serão detalhados a

seguir os mecanismos de ação dos glicocorticóides, TNF e IFN- γ e suas respectivas vias de sinalização por serem os agentes do processo inflamatório relevantes no contexto desta tese.

3.1. GLICOCORTICÓIDES E SEUS RECEPTORES

A produção hormonal de glicocorticóides pelas glândulas adrenais é responsável pelo controle temporal e/ou pontual de processos fisiológicos em situações de higidez ou patológicas. A produção circadiana deste hormônio via controle neuronal direto, está associada com a transição da fase de repouso para a de atividade de mamíferos. Esta regulação envolve, por exemplo, o metabolismo de glicose/lipídios, a deposição de glicogênio no fígado e o controle da pressão sanguínea (para revisão ver Buckingham, 2006). Por outro lado, a via neuro-endócrina regula a produção de glicocorticóides em resposta a diferentes formas de injúrias (inflamatórias ou não).

Os glicocorticóides atuam em diferentes etapas de um processo inflamatório. Estes hormônios controlam, por exemplo, a resposta vascular e a mobilização de células imunocompetentes para o foco inflamatório por regular a produção de prostaglandinas, NO, neuropeptídeos (Cato & Wade, 1996; Reichardt & Schutz, 1998; Moynagh, 2003) e moléculas de adesão (Cavalcanti *et al.*, 2006). Os glicocorticóides inibem os efeitos de citocinas inflamatórias que atuam, por exemplo, pelas vias de sinalização JAK (do inglês, *Janus activated kinase*)-STAT (Rhen & Cidlowski, 2005) e NF- κ B (Reichardt *et al.*, 1998).

Os glicocorticóides interagem com duas classes de receptores intracelulares, os receptores de mineralocorticóides (MR, do inglês, *mineralocorticoids receptors*) e os GR (Krozowski & Funder, 1983). Estes ligantes têm alta afinidade por MR (Reul & De Kloet, 1985), fazendo com que estes receptores estejam ativados tonicamente. A ativação de GR é obtida por altas concentrações de glicocorticóides que são atingidas a partir da estimulação do HPA. A interação do hormônio adrenal com GR localizados no hipotálamo é um dos passos da autorregulação do eixo HPA, visto que leva a uma diminuição da síntese de ACTH e reduz o estímulo sobre a adrenal. O eixo

HPA é ativado em situações de alerta e estresse. Estes receptores são dessensibilizados por alta concentração de ligante, o que pode resultar num aumento da concentração circulante de glicocorticóides (para revisão ver De Kloet *et al.*, 1998).

Os GR pertencem à super família dos receptores de hormônios esteroidais e sua ligação ao hormônio correspondente facilita a transferência do complexo para o núcleo (Kumar & Thompson, 2003). Na ausência do hormônio, GR inativos encontram-se complexados com moléculas chaperonas (sendo as mais importantes as *heat shock proteins* hsp90 e hsp70) e cochaperonas (imunofilinas, hsp40, p60 e p23 dentre outras; Ditmar *et al.*, 1997) que podem modular positivamente ou negativamente a ação deste receptor (De Bosscher *et al.*, 2003). A ativação promove a hiperfosforilação, desligamento das proteínas de choque térmico e uma mudança conformacional que favorece a localização do complexo ligante/receptor no núcleo.

No núcleo, os receptores para glicocorticóides, na forma de homodímeros, ligam-se com o auxílio de proteínas chaperonas (hsp90 e p23) à regiões específicas de genes alvos (para revisão ver De Franco & Csermely, 2000). O GR é uma proteína modular composta por porções funcional e estruturalmente especializadas. Estes receptores possuem um domínio de ligação ao DNA (DBD, é responsável também pela sua dimerização), um domínio que reconhece o ligante e outros dois (AF1 e 2) responsáveis pela atividade transcricional (Schoneveld *et al.*, 2004). O domínio DBD é composto por dois dedos de zinco que se ligam cooperativamente em alvos específicos do DNA, sendo outra função desta porção a discriminação entre diferentes elementos responsivos e a determinação de qual gene específico será ativado (Beato, 1989).

Genes regulados pelos GR possuem em seus promotores, regiões responsivas a glicocorticóides que podem induzir tanto ativação (GRE) quanto inibição (nGRE) da produção dos transcritos (Schoenmakers *et al.*, 2000; De Bosscher *et al.*, 2003). Outra forma de inibição de expressão gênica é pela

associação do GR com outros fatores nucleares de transcrição, como NF- κ B, STAT e CREB, entre outros (para revisão ver De Bosscher *et al.*, 2003).

Com relação ao NF- κ B muitos mecanismos moleculares foram propostos para explicar o antagonismo mútuo existente entre este fator de transcrição e o GR. Uma das primeiras hipóteses levantadas foi a de que os GR inibiam a ação do fator de transcrição NF- κ B por aumentar a síntese da enzima inibitória I κ B (do inglês, *inhibitory κ B protein*), o que induz a retenção do NF- κ B no citoplasma (Scheinman *et al.*, 1995). De fato, trabalhos demonstram que glicocorticóides induzem em roedores a expressão de I κ B e a conseqüente diminuição da ligação do NF- κ B aos promotores dos genes que produzem interleucina 2 (Auphan *et al.*, 1995), iNOS (De Vera *et al.*, 1997) e IL-1 β (Eberhardt *et al.*, 2002). Contudo, este mecanismo de ação requer melhor elucidação uma vez que nenhuma região GRE clássica foi encontrada até agora na porção modulatória do promotor do gene de I κ B.

Atualmente, o modelo que explica o antagonismo mútuo existente entre estes fatores de transcrição leva em consideração à interação proteína/proteína, mediada ou não por cofatores, entre o GR e o NF- κ B. A associação física entre os fatores de transcrição GR e NF- κ B foi demonstrada por diversos estudos *in vitro* (Ray & Prefontaine, 1994; Scheinman *et al.*, 1995) e *in vivo* (Adcock *et al.*, 1999). A maioria dos estudos baseia-se na determinação dos domínios dos fatores de transcrição responsáveis por esta interação. A deleção do domínio LBD (do inglês, *ligand binding domain*) dos receptores para glicocorticóides diminui a transrepressão sobre o NF- κ B (Oro *et al.*, 1988) e a mutação do domínio RHD (do inglês, *rel homology domain*) da subunidade p65 do NF- κ B inibe a repressão sobre a ativação gênica induzida por GR (Wissink *et al.*, 1997). O contexto do promotor e a presença de cofatores também estão envolvidos neste processo. Foi demonstrado (Scheinman *et al.*, 1995) que o CBP (do inglês, *CREB binding protein*) é capaz de potenciar tanto a repressão do GR sobre o NF- κ B quanto a repressão do NF- κ B sobre a transcrição induzida por GR (Fig. 4).

Além do NF- κ B outros fatores de transcrição como o STAT e o AP-1 podem ser modulados pelos receptores para glicocorticóides. A inter-relação existente entre o GR e o AP-1 é similar à encontrada entre o GR e NF- κ B (para revisão ver De Bosscher *et al.*, 2003). Em contrapartida, o resultado do *cross-talk* entre o GR e a via STAT depende do gene em questão e do tecido onde ele ocorre. Um exemplo reside no fato de que, em alguns modelos, enquanto a associação entre GR e STAT3 (ativada por IL-6) ativa promotores com elementos responsivos a glicocorticóides a associação de GR com STAT5 (ativada por IL-2) reprime-os (para revisão ver Necela & Cidlowski, 2004). Esta variabilidade no padrão de interação com outras vias de transcrição confere ao processo especificidade tecidual sem que se perca a coordenação integrada da fase anti-inflamatória de uma resposta inflamatória.

3.2. TNF E ATIVAÇÃO DA VIA NF- κ B

O TNF descrito na década de setenta (Carswell *et al.*, 1975) era anteriormente conhecido por TNF- α mas, a partir de consenso criado recentemente, passou a ser denominado apenas TNF (Tracey, 2008). O TNF é produzido por diversos tipos celulares como células NK, neutrófilos, células endoteliais, células musculares lisas e cardíacas, fibroblastos e osteoclastos (para revisão ver Bradley, 2008). Durante processos de defesa, a principal fonte de TNF são os macrófagos e monócitos ativados (Tracey & Cerami, 1994) sendo funções bem descritas, o recrutamento e a ativação de neutrófilos e monócitos para o foco infeccioso (Tracey & Cerami, 1993). Ou seja, esta é uma citocina pró-inflamatória muito importante na montagem de uma resposta inflamatória.

O TNF pode ativar dois tipos de receptores descritos até o momento, o TNFR1 e o TNFR2 (para revisão ver Ledgerwood, 1999) sendo a afinidade do TNFR1 pelo TNF solúvel maior que a do TNFR2 (Grell *et al.*, 1998). A partir da ativação destes receptores o TNF pode sinalizar por diversas cascatas intracelulares que culminam na ativação dos fatores de transcrição NF- κ B, AP-1 e da caspase-8 (Wajant *et al.*, 2003). No caso do NF- κ B, a ligação do TNF ao domínio extracelular do receptor TNFR permite a troca da proteína inibitória

SODD (do inglês, *silencer of death domain*) pela proteína adaptadora TRADD (do inglês, *TNFR1-Associated via Death Domain*) no domínio intracelular denominado *death domain* (Chen & Goeddel, 2002). A ativação da via NF- κ B é mediada pela interação da TRADD com as proteínas RIP (do inglês, *receptor-interacting protein*) ou TRAF2 (do inglês, *TNF receptor-associated factor 2*) que ativam o complexo IKK (quinase de I κ B) e, conseqüentemente, liberam o NF- κ B do citoplasma (Wajant *et al.*, 2003).

O fator de transcrição NF- κ B pertence à família dos fatores de transcrição NF- κ B/REL formada por cinco genes (NFKB1, NFKB2, RELA, c-REL e RELB) que dão origem a sete proteínas - p100, p105, p50, p52, RELA (p65), RELB e c-REL (para revisão ver Chen & Greene, 2004). Sua ação pleiotrópica e seu padrão de expressão multimediado possibilitam às células a capacidade de responder de forma precisa a diferentes estímulos e situações externas (Bonizzi & Karin, 2004).

O NF- κ B apresenta-se como homo ou heterodímeros constituídos por duas das subunidades acima mencionadas (Baeuerle & Baltimore, 1996; Siebenlist, 1997) sendo a composição do dímero importante na regulação desta via. Embora todas as subunidades possuam o domínio RHD reponsável pela ligação ao DNA e a outros cofatores (Gosh *et al.*, 1998) apenas as proteínas p65, cREL e RELB possuem domínios de transativação (TAD, do inglês, *transcription activation domain*) na sua porção carboxiterminal (para revisão ver Hayden & Gosh, 2004). Portanto, apenas dímeros que contenham uma cópia destas proteínas podem ativar diretamente a transcrição de genes. Por outro lado, acredita-se que dímeros formados pelas subunidades p50 e/ou p52 sejam repressores da atividade transcricional devido a ausência de domínios do tipo TAD, como representado na figura 4 (para revisão ver Gosh & Hayden, 2008). No entanto, se estes homodímeros estiverem associados à proteína BCL-3, que possui domínio TAD e localiza-se no núcleo, é possível que esses passem a apresentar atividades transcripcionais positivas (Nolan *et al.*, 1993).

O controle da ativação do fator de transcrição NF- κ B, isto é, a sua translocação para o núcleo, é feito através das proteínas I κ B que se associam ao

NF- κ B no citoplasma e impedem a sua translocação para o núcleo (Baeuerle & Baltimore, 1996; Baldwin, 1996). Quando receptores que atuam pela via NF- κ B são estimulados, ocorre a ativação do complexo de I κ B quinase (IKK) que fosforila I κ B sinalizando para a sua ubiquitinação e posterior degradação pelo proteassoma 26S (Palombella *et al.*, 1994; Pickart, 1997). Uma vez desfeito o complexo I κ B/NF- κ B, o dímero de NF- κ B se acumula no núcleo onde poderá se ligar a regiões responsivas presentes nos genes alvos (Gosh *et al.*, 1998).

O NF- κ B modula uma série de respostas e atividades fisiológicas nas células dos eucariotos, sendo sua ação sobre processos inflamatórios e imunes, apoptose, diferenciação celular e tumorigênese os mais bem estudados e entendidos até agora. A ativação de NF- κ B relacionada com a resposta inflamatória leva à transcrição de moléculas de adesão, citocinas pró-inflamatórias, iNOS, COX-2, receptores de bradicinina do subtipo B1 e, numa fase mais tardia, I κ B α , o que resulta na autoinibição do sistema (Cabrini *et al.*, 2001; Medeiros *et al.*, 2001; Gosh & Hayden, 2008).

3.3. IFN- γ E ATIVAÇÃO DA VIA JAK-STAT

O IFN- γ é uma citocina solúvel conhecida como único membro da classe tipo II e foi originalmente chamada de fator ativador de macrófagos (Gray & Goeddel, 1982). Esta é uma citocina pró-inflamatória importante no controle de respostas imunes inatas e adquiridas. No começo de um processo inflamatório, células apresentadoras de antígeno produzem quimiocinas e citocinas como IL-12 e IL-18 (Salazar-Mather *et al.*, 2000) que atraem células do tipo NK para o foco infeccioso e induzem a maturação de células T em células de fenótipo Th-1 (do inglês, *T helper*) produtoras de IFN- γ (Boehm *et al.*, 1997). Macrófagos também respondem ao IFN- γ e passam a produzir mais IL-12 e IL-18, que amplificarão ainda mais a produção de IFN- γ pelas células NK e Th-1 (Yoshida *et al.*, 1994; Murphy *et al.*, 1995). Este padrão de produção e ação do IFN- γ pode ser considerado como um sinal de alerta que o sistema de defesa utiliza no começo de uma resposta inflamatória (para revisão ver Schroder *et al.*, 2004).

Figura 4. Esquema do controle da expressão gênica por GR e NF-κB. GR: receptor para glicocorticóide; GC: glicocorticóide; GRE: elemento responsivo para glicocorticóide; nGRE: elemento responsivo para glicocorticóide negativo; TNF: fator de necrose tumoral; NFκB: elemento responsivo ao fator nuclear κB; IκB: proteína inibitória de NF-κB; IKK: proteína quinase de IκB; CBP: proteína ligadora de CREB; p65 e p50: subunidades do NF-κB.

O IFN-γ liga-se a receptores formados por duas subunidades, IFNR1 e IFNR2 (para revisão ver Platanias, 2005), que interagem, cada uma, com um membro da família das JAKs (para revisão ver Darnell *et al.*, 1994; Ihle, 1995). Ao serem ativadas, essas subunidades se autofosforilam e desencadeiam respostas via cascata de sinalização JAK/STAT (Shuai *et al.*, 1992; Silvennoinen *et al.*, 1993). JAKs ativadas fosforilam principalmente as STATs do tipo 1 (a três também pode ser fosforilada em alguns modelos e tecidos) que formam homodímeros, translocam para o núcleo, ligam-se a elementos GAS (do inglês, *IFN-γ-activated site*) e induzem a expressão gênica (para revisão ver Darnell, 1997; Stark *et al.*, 1998).

No núcleo, a atividade dos dímeros de STAT pode ser modulada por diferentes mecanismos como o grau de acetilação das histonas e a sua associação a cofatores como p300 e CBP (Nusinzon & Horvath, 2003). Além disso, a interação com outros fatores de transcrição como o NF- κ B acrescentam complexidade à sinalização da STAT induzida por IFN- γ . A ativação desta via aumenta a degradação da proteína I κ B e aumenta a translocação do NF- κ B para o núcleo (Held *et al.*, 1999), ou ainda o *priming* de macrófagos por IFN- γ aumenta a quantidade de dímeros p65/p50 em relação aos p50/p50 após estimulação com LPS por um mecanismo ainda desconhecido (de Wit *et al.*, 1996). Por fim, o aumento citoplasmático de STAT não fosforilada (U-STAT, do inglês, *unphosphorylated-STAT*) induzida por ativação da via JAK/STAT pode promover o acúmulo nuclear de NF- κ B, pois a U-STAT compete com a proteína inibitória I κ B (Yang *et al.*, 2007).

4. Melatonina e sistema imune

O papel imunomodulatório da melatonina vem sendo descrito por diferentes laboratórios ao longo das últimas duas décadas. Estes estudos evidenciam a capacidade da melatonina em atuar tanto sobre a resposta imune inata quanto sobre a resposta adquirida.

Camundongos inflamados cronicamente por injeção de BCG (*Bacillus Calmett Guérin*) na pata perdem o ritmo diário da lesão granulomatosa após pinealectomia, sendo este ritmo restabelecido com a administração noturna de melatonina (Lopes *et al.*, 1997). Neste trabalho, mostrou-se que o tamanho do edema inflamatório era maior durante o dia do que durante a noite. O mecanismo de ação da melatonina neste caso poderia ser explicado pela sua capacidade de reduzir o aumento de permeabilidade vascular (Lopes *et al.*, 2001) induzido por moduladores inflamatórios como o leucotrieno B₄, através de uma ação sobre o endotélio (Lotufo *et al.*, 2006), ou ainda inibindo a produção de NO, levando a uma vasoconstrição (Tamura *et al.*, 2006). Outros resultados obtidos em roedores mostram que a inibição de síntese de melatonina inibe respostas imunes celulares e humorais em camundongos

(Maestroni *et al.*, 1986) e que a melatonina também está implicada nas variações sazonais observadas no sistema imune de hamsters (Nelson *et al.*, 1995; Nelson & Demas, 1997). Pode ainda ser mencionada a correlação entre a redução na produção de melatonina pela pineal e o processo de involução tímica observada no envelhecimento. O timo é o órgão onde o repertório de células T tolerantes a antígenos próprios é gerado. Pinealectomia ou envelhecimento aceleram a involução tímica, processo revertido em ambos os casos pela administração de melatonina (Csaba & Richter, 1975; Oner *et al.*, 2004).

Considerando as ações da melatonina sobre células do sistema imune, foi demonstrado que melatonina aumenta a produção de IL-2, IL-6 e IFN- γ em células mononucleares em cultura (Garcia-Maurino *et al.*, 1997), induz a produção de IL-12, aumenta a atividade de células do tipo NK e aumenta a produção de IFN- γ por células do tipo Th-1 (Miller *et al.*, 2006; Garcia-Maurino *et al.*, 1997). Cabe ainda ressaltar que células imunocompetentes além de terem sua atividade modulada pela melatonina também são capazes de produzir este hormônio localmente (Carrillo-Vicco *et al.*, 2003; Pontes *et al.*, 2006). Esta produção é importante para o combate a agentes agressores uma vez que induz a atividade fagocitária de macrófagos (Pontes *et al.*, 2006), controla a produção de óxido nítrico por células endoteliais (Tamura *et al.*, no prelo), inibe a proliferação bacteriana (Tekbas *et al.*, 2008) e diminui os efeitos nocivos de radicais livres por ativar enzimas antioxidantes (Reiter *et al.*, 1997).

Os efeitos da melatonina podem ser mediados por receptores de membrana dos subtipos MT₁ e MT₂ (Carrillo-Vico *et al.*, 2003; para revisão ver Markus & Tamura, 2009) por mecanismos independentes que envolvem a modulação de vias transcripcionais como, por exemplo, a do NF- κ B e do GR. Células imunocompetentes apresentam receptores para melatonina (Carrillo-Vico *et al.*, 2006), sendo o subtipo MT₂ (Dubocovich & Markowska, 2005) alvo importante da melatonina no controle de respostas imunes celulares e humorais (Drazen & Nelson, 2001). Melatonina inibe a translocação nuclear de receptores para glicocorticóides em células tímicas (Sainz *et al.*, 1999; Presman *et al.*, 2006) e

inibe a translocação nuclear do NF- κ B em macrófagos (Gilad *et al.*, 1998) e células endoteliais (Tamura *et al.*, no prelo).

As bases experimentais para o entendimento dos efeitos da melatonina sobre respostas imunes inatas e adquiridas têm sido ampliadas de forma importante. No entanto, pouco é conhecido sobre os efeitos de moduladores da resposta inflamatória sobre a atividade pineal (Skwarlo-Sonta, 1996 e 2002). Recentemente foi constatada a presença de receptores de imonoglobulina E em pinealócitos de rato (Ganguly *et al.*, 2007). Os autores observaram que esta expressão é 100 vezes maior durante a noite do que de dia devido a um mecanismo controlado pela produção de AMP cíclico induzida por noradrenalina (Ganguly *et al.*, 2007), sugerindo então um controle circadiano da expressão deste receptor. Em astrócitos da pineal a noradrenalina também é capaz de induzir a expressão dos RNAm de TGF- β (do inglês, *transforming growth factor-beta*) e IL-6 (Tsai *et al.*, 2001). Este efeito é potenciado por IL-1 β que, por sua vez, é constitutivamente produzida em astrócitos da pineal e tem sua expressão aumentada na presença de noradrenalina ou IFN- γ (Tsai & McNulty, 1999).

Com relação ao efeito de citocinas sobre a produção de melatonina menos ainda é sabido. Neste sentido, foi demonstrado que IFN- γ apresenta um efeito dual sobre a síntese de melatonina, pois ao mesmo tempo em que aumenta a produção de melatonina, inibe a atividade da enzima AA-NAT induzida por estimulação β -adrenérgica. Este efeito poderia ser explicado por um aumento na atividade da HIOMT, mas nenhum efeito sobre esta enzima foi observado, deixando o mecanismo de ação do IFN- γ sobre a síntese de melatonina pela glândula pineal em aberto (Withyachumnarnkul *et al.*, 1990). Como visto, IFN- γ pode atuar por várias vias de transcrição sendo a mais comum e bem descrita a da JAK/STAT (para revisão ver Stark, 2007). É sabido que esta via está ativada na pineal durante processos inflamatórios (Takamiya *et al.*, 2002) e que as vias da STAT e do NF- κ B podem interagir em diversos modelos celulares (Yang *et al.*, 2007). É possível que a interação entre estas vias

possa estar ocorrendo na glândula pineal e controle, de algum modo ainda desconhecido, a produção de melatonina durante processos fisiopatológicos.

4.1. RELAÇÃO ADRENAL-PINEAL

A ativação do eixo HPA com consequente elevação da concentração de glicocorticóides circulantes faz parte do sistema de manutenção do equilíbrio interno em mamíferos (Kalsbeek *et al.*, 2006). Este sistema é ativado por injúrias físicas ou psicológicas e visa compensar ações que o organismo desencadeia para combater agentes injuriantes. No caso de uma inflamação, a circulação de corticosterona (roedores) está elevada na fase anti-inflamatória da mesma (Nadeau & Riviest, 2002). Por outro lado, quando a resposta inflamatória é cronicada, a quantidade de glicocorticóide circulante se mantém elevada.

Na década de 1970 foram apresentados os primeiros trabalhos que buscaram estabelecer um eixo adreno-pineal. O modelo estudado na época era a ativação da adrenal por estresse em animais controle ou pinealectomizados e a observação das alterações na quantidade de corticosterona circulante. Os resultados eram controversos, visto que na dependência do protocolo experimental era obtida uma fotografia estática desta complexa interação. Neste período a melatonina era considerada uma inibidora do eixo HPA e, portanto, um agente inibidor da resposta de estresse. Como exemplo desta fase podemos citar um trabalho em que foram medidos os níveis de corticosterona no início da manhã em ratos adultos normais ou pinealectomizados mantidos em iluminação constante. Claro constante, uma situação sabidamente estressante, não alterou a concentração de corticosterona circulante. No entanto, houve um aumento quando animais controle, mantidos em escuro constante, foram comparados com animais pinealectomizados (Nir *et al.*, 1970). A conclusão destes dados, de acordo com os autores, reforçava o conceito de que a ativação pineal produzia um efeito inibidor sobre o eixo HPA. Este conceito foi reforçado por estudos *in vitro* que demonstraram que a produção de corticosterona por células da adrenal estimuladas *in vitro* com ACTH pode ser reduzida por extratos de glândulas pineais (Porter & Heiman, 1977). No

entanto, melatonina não mimetizava o efeito do extrato de pineal, deixando em dúvida uma ação direta da melatonina sobre a produção de corticosterona. A literatura atual não acrescenta novos fatos a estes trabalhos pioneiros, ficando evidente a complexidade do tema.

Mais recentemente, foi sugerido que corticosterona poderia ter uma ação direta sobre a glândula pineal, modulando a produção de melatonina, visto que a adrenalectomia de camundongos cronicamente inflamados com BCG abolia o ritmo diário de excreção de 6-sulfatoximelatonina (Lopes *et al.*, 2001). Alterações hormonais mais intensas, como as induzidas por orquiectomia, resultam em aumento inicial dos níveis de corticosterona (enquanto a melatonina fica inalterada) e um aumento retardado da melatonina circulante (quando os níveis de corticosterona já foram normalizados). Mais ainda, estresse moderado causado por contenção apresenta correlação positiva entre o aumento da concentração plasmática do precursor da melatonina NAS e o aumento dos níveis de corticosterona em ratos (Couto-Moraes *et al.*, no prelo). Por outro lado, a administração de altas concentrações de glicocorticóides inibe a produção de melatonina pela glândula pineal estimulada com concentrações elevadas de noradrenalina *in vitro* (Troiani *et al.*, 1988; Yuwiller, 1989; Zhao & Touitou, 1993) e a administração de glicocorticóides *in vivo* reduz a concentração plasmática de melatonina (Beck-Friis *et al.*, 1983; Demisch *et al.*, 1988). Desta forma, a corticosterona poderia atuar de duas maneiras opostas, quer potenciando, quer inibindo a produção noturna de melatonina dependendo da condição testada.

Os trabalhos de Cristiane Lopes (Lopes *et al.*, 1997 e 2001) mencionados acima foram a base para a realização desta pesquisa, pois sugeriam que o hormônio da córtex da adrenal poderia agir diretamente sobre a pineal. Na presente tese foi avaliado o mecanismo de ação pelo qual a corticosterona atua sobre pineais e este conhecimento levou ao estudo do efeito de citocinas pró-inflamatórias (TNF e IFN- γ) sobre esta glândula.

III. CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstra o efeito de agentes moduladores de processos inflamatórios sobre a função pineal. Esta ideia surgiu a partir de trabalhos que indicavam uma possível modulação positiva da corticosterona (Lopes *et al.*, 2001) e do IFN- γ (Withyachumnarnkul *et al.*, 1990) sobre a produção de melatonina.

Corticosterona modula a produção de melatonina em pineais em cultura e *in vivo*. Os dados apresentados revelam que o efeito da corticosterona sobre a produção de melatonina é dependente da estimulação noradrenérgica aplicada. Em situações em que os receptores do subtipo β -adrenérgicos estão ativados, corticosterona potencia, mas inibe na vigência de estimulação β e α_1 -adrenérgica. Quando o efeito da corticosterona é positivo ocorre o aumento da expressão do transcrito *aa-nat* bem como da atividade das enzimas AA-NAT e HIOMT da via biossintética da melatonina. Além da corticosterona, foi demonstrado que as citocinas pró-inflamatórias TNF e IFN- γ também são capazes de alterar a produção de melatonina em pineais em cultura, sendo que TNF inibe e IFN- γ potencia a produção hormonal da pineal.

Um ponto importante deste trabalho foi a demonstração da presença e funcionalidade das vias dos fatores de transcrição GR e NF- κ B. Na glândula pineal, a ativação da via do GR potencia enquanto que a ativação da via NF- κ B inibe a síntese de melatonina. Esta é a primeira vez que se demonstrou que a maquinaria molecular classicamente imunomoduladora é capaz de controlar a síntese de melatonina pela glândula pineal.

Os dados inéditos aqui apresentados permitem concluir que a glândula pineal de roedores está aparelhada para responder a diferentes moduladores produzidos durante um quadro fisiopatológico. Os estudos sugerem que esta glândula possui um importante papel, não apenas no controle da ritmicidade interna do organismo em situações de higidez, mas também em sua capacidade de responder apropriadamente a condições injuriantes.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K. & LICHTMAN, A.H. (2005). Cellular and molecular immunology. updated Edition. Ed. ABBAS, A.K. & LICHTMAN A.H. *Philadelphia:Elsevier Saunders*.
- ADCOCK, I.M., NASUHARA, Y., STEVENS, D.A. & BARNES, P.J. (1999). Ligand-induced differentiation of glucocorticoid receptor (GR) trans-repression and transactivation: preferential targetting of NF-kappaB and lack of I-kappaB involvement. *Br J Pharmacol*, **127**, 1003-1011.
- ALMAWI, W.Y., & MELEMEDJIAN, O.K. (2002). Negative regulation of nuclear factor-kappaB activation and function by glucocorticoids. *J Mol Endocrinol*, **28**, 69-78.
- ASCHOFF, J. (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **25**, 11-28.
- AUPHAN, N., DIDONATO, J.A., ROSETTE, C., HELMBERG, A. & KARIN, M. (1995). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science*, **270**, 286-290.
- AVELLAR, M.C. & MARKUS, R.P. (1988). Age-related changes in neuronal uptake of catecholamines. *Braz J Med Biol Res*, **21**, 553-555.
- AVELLAR, M.C., KOBASHI, Y.L. & MARKUS, R.P. (1990). Age-related changes in neuronal uptake of noradrenaline. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **341**, 295-300.
- AXEROLD, J. & WEISSBACH, H. (1960). Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science*, **131**, 1312.
- BAEUEERLE, P.A & BALTIMORE, D. (1996). NF-kappa B: ten years after. *Cell*, **87**, 13-20.
- BALDWIN, A.S. JR. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*, **14**, 649-683.
- BALER, R., COVINGTON, S. & KLEIN, D.C. (1997). The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter. cAMP activation via a cAMP-responsive element-CCAAT complex. *J Biol Chem*, **272**, 6979-6985.
- BALLARD, P.L., BAXTER, J.D., HIGGINS, S.J., ROUSSEAU, G.G. & TOMKINS, G.M. (1974). General presence of glucocorticoid receptors in mammalian tissues. *Endocrinology*, **94**, 998-1002.
- BARASSIN, S., SABOUREAU, M., KALSBECK, A., BOTHOREL, B., VIVIEN-ROELS, B., MALAN, A., BUIJS, R.M., GUARDIOLA-LEMAITRE, B. & PÉVET, P. (1999).

- Interindividual differences in the pattern of melatonin secretion of the Wistar rat. *J Pineal Res*, **27**, 193-201.
- BARBOSA, E.J.M., FERRIERA, Z.S. & MARKUS, R.P. (2000). Purinergic and noradrenergic cotransmission in the rat pineal gland. *Eur J Pharmacol*, **401**, 59-62.
- BEATO, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, **56**, 335-344.
- BECK-FRIIS, J., HANSEN, T., KJELLMAN, B.F., LJUNGGREN, J.G., UNDEN, F. & WETTERBERG, L. (1983). Serum melatonin and cortisol in human subjects after administration of dexamethasone and propranolol. *Psychopharmacol Bull*, **19**, 646-648.
- BESANÇON, R., REBOUL, A., CLAUSTRAT, B., JOUVET, A., BELIN, M.F. & FEVRE-MONTANGE, M. (1997). Tryptophan hydroxylase mRNAs analysis by RT-PCR: preliminary report on the effect of noradrenaline in the neonatal rat pineal gland. *J Neurosci Res*, **49**, 750-758.
- BESANÇON, R., SIMONNEAUX, V., JOUVET, A., BELIN, M.F. & FEVRE-MONTANGE, M. (1996). Nycthemeral expression of tryptophan hydroxylase mRNAs in the rat pineal gland. *Brain Res Mol Brain Res*, **40**, 136-138.
- BLALOCK, J.E. & SMITH, E.M. (2007). Conceptual development of the immune system as a sixth sense. *Brain Behav Immun*, **21**, 23-33.
- BOEHM, U., KLAMP, T., GROOT, M. & HOWARD, J.C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*, **15**, 749-795.
- BONIZZI, G. & KARIN, M. (2004). The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*, **25**, 280-288.
- BORJIGIN, J., WANG, M.M. & SNYDER, S.H. (1995). Diurnal variation in mRNA encoding serotonin n-acetyltransferase in pineal gland. *Nature*, **378**, 783-785.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- BRADING, A.F. (2006). Smooth muscle research: from Edith Bülbring onwards. *Trends Pharmacol Sci*, **27**, 158-165.
- BRADLEY, J.R. (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol*, **214**, 149-160.
- BUCKINGHAM, J.C. (2006). Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *Br J Pharmacol*, **147**, 258-268.
- BUIJS, R.M. & KALSBECK, A. (2001). Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 521-526.

- BUIJS, R.M., KALSBECK, A., VAN DER WOUDE, T.P., VAN HEERIKHUIZE, J.J. & SHINN, S. (1993). Suprachiasmatic nucleus lesion increases corticosterone secretion. *Am J Physiol*, **264**, 1186–1192.
- BUIJS, R.M., WORTEL, J., VAN HEERIKHUIZE, J.J., FEENSTRA, M.G., TER HORST, G.J., ROMIJN, H.J. & KALSBECK, A. (1999). Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur J Neurosci*, **11**, 1535–1544.
- BUNDSCHUH, D.S., BARSIG, J., HARTUNG, T., RANDOW, F., DÖCKE, W.D., VOLK, H.D. & WENDEL, A. (1997). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN-gamma restore the systemic TNF-alpha response to endotoxin in lipopolysaccharide-desensitized mice. *J Immunol*, **158**, 2862–2871.
- BURKE, Z., WELLS, T., CARTER, D., KLEIN, D. & BALER, R. (1999). Genetic targeting: the serotonin N-acetyltransferase promoter imparts circadian expression selectively in the pineal gland and retina of transgenic rats. *J Neurochem*, **73**, 1343–1349.
- CABRINI, D.A., CAMPOS, M.M., TRATSK, K.S., MERINO, V.F., SILVA, J.A. J.R., SOUZA, G.E., AVELLAR, M.C., PESQUERO, J.B. & CALIXTO, J.B. (2001). Molecular and pharmacological evidence for modulation of kinin b(1) receptor expression by endogenous glucocorticoids hormones in rats. *Br J Pharmacol*, **132**, 567–577.
- CALVO, J., BOYA, J., BORREGON, A. & GARCIA-MAURIÑO, J.E. (1988). Presence of glial cells in the rat pineal gland: a light and electron microscopic immunohistochemical study. *Anat Rec*, **220**, 424–428.
- CARRILLO-VICO, A., GARCÍA-MAURIÑO, S., CALVO, J.R. & GUERRERO, J.M. (2003). Melatonin counteracts the inhibitory effect of PGE2 on IL-2 production in human lymphocytes via its mt1 membrane receptor. *FASEB J*, **17**, 755–757.
- 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.
- CARRILLO-VICO, A., REITER, R.J., LARDONE, P.J., HERRERA, J.L., FERNÁNDEZ-MONTESINOS, R., GUERRERO, J.M. & POZO, D. (2006). The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. *Curr Opin Investig Drugs*, **7**, 423–431.

- CARSWELL, E.A., OLD, L.J., KASSEL, R.L., GREEN, S., FIORE, N. & WILLIAMSON, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **72**, 3666-3670.
- CATO, A.C. & WADE, E. (1996) Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Bioassays*, **18**, 371-378.
- CAVALCANTI, D.M., LOTUFO, C.M., BORELLI, P., FERREIRA, Z.S., MARKUS, R.P. & FARSKY, S.H. (2007). Endogenous glucocorticoids control neutrophil mobilization from bone marrow to blood and tissues in non-inflammatory conditions. *Br J Pharmacol*, **152**, 1291-1300.
- CAVALCANTI, D.M., LOTUFO, C.M., BORELLI, P., TAVASSI, A.M., PEREIRA, A.L., MARKUS, R.P. & FARSKY, S.H. (2006). Adrenal deficiency alters mechanisms of neutrophil mobilization. *Mol Cell Endocrinol*, **249**, 32-39.
- CHEN, G. & GOEDDEL, D.V. (2002). TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway. *Science*, **296**, 1634.
- CHEN, L.F. & GREENE, W.C. (2004). Shapping the nuclear action of NF- κ B. *Mol Cell Biol*, **5**, 392-401.
- CIARANELLO, R.D. (1978). Regulation of phenylethanolamine N-methyltransferase synthesis and degradation. Regulation by rat adrenal glucocorticoids. *Mol Pharmacol*, **14**, 478-489.
- COLE, T.J., BLENDY, J.A., MONAGHAN, A.P., SCHMID, W., AGUZZI, A. & SCHÜTZ, G. (1995). Molecular genetic analysis of glucocorticoid signaling during mouse development. *Steroids*, **60**, 93-96.
- COON, S.L., DEL, OLMO, E., YOUNG, W.S. 3rd. & KLEIN, D.C. (2002). Melatonin synthesis enzymes in *Macaca mulatta*: focus on arylalkylamine N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87). *J Clin Endocrinol Metab*, **87**, 4699-4706.
- COON, S.L., ROSEBOOM, P.H., BALER, R., WELLER, J.L., NAMBOODIRI, M.A.A., KOONIN, E.V. & KLEIN, D.C. (1995). Pineal serotonin n-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. *Science*, **270**, 1681-1683.
- COON, S.L., WELLER, J.L., KORF, H.W., NAMBOODIRI, M.A., ROLLAG, M. & KLEIN, D.C. (2001). cAmp regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT, EC 2.3.1.87): a new cell line (1E7) provides evidence of intracellular AANAT activation. *J Biol Chem*, **276**, 24097-24107.

- COUTO-MORAES, R., PALERMO-NETO, J. & MARKUS, R.P. The Immune-Pineal Axis: Stress as a modulator of pineal gland function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, no prelo.
- CRAFT, C.M., MURAGE, J., BROWN, B. & ZHAN-POE, X. (1999). Bovine arylalkylamine N-acetyltransferase activity correlated with mRNA expression in pineal and retina. *Mol Brain Res*, **65**, 44-51.
- CSABA, G. & RICHTER, T. (1975). Collaboration of serotonin and melatonin in the control of thyroid function. *Acta Biol Med Ger*, **34**, 1097-1100.
- DARNELL, J.E. Jr. (1997) STATs and gene regulation. *Science*, **277**, 1630-1635.
- DARNELL, J.E. Jr., KERR, I.M. & STARK, G.R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, **264**, 1415-1421.
- De BOSSCHER, K., BERGHE, W. V. & HAEGEMAN, G. (2003). The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor- κ B or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev*, **24**, 488-522.
- De FRANCO, D.B. & CSERMELY, P. (2000). Steroid receptor and molecular chaperone encounters in the nucleus. *Sci STKE*, **42**, PE1.
- De KLOET, E.R., VREUGDENHIL, E., OITZL, M.S. & JOËLS, M. (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev*, **19**, 269-301.
- De VERA, M.E., TAYLOR, B.S., WANG, Q., SHAPIRO, R.A., BILLIAR, T.R. & GELLER, D.A. (1997). Dexamethasone suppresses iNOS gene expression by upregulating I-kappa B alpha and inhibiting NF-kappa B. *Am J Physiol*, **273**, 1290-1296.
- De WIT, H., HOOGSTRATEN, D., HALIE, R.M. & VELLENGA, E. (1996). Interferon-gamma modulates the lipopolysaccharide-induced expression of AP-1 and NF-kappa B at the mRNA and protein level in human monocytes. *Exp Hematol*, **24**, 228-235.
- DEMISCH, L., DEMISH, K. & NICKELSEN, T. (1988). Influence of dexamethasone on nocturnal melatonin production in healthy adult subjects. *J Pineal Res*, **5**, 317-321.
- DESCARTES, R. (1973). As Paixões da Alma. In Os Pensadores. Ed. Civita, V. São Paulo: Abril Cultural e Industrial, 1ª ed, **15**.
- DITTMAR, K.D., DEMADY, D.R., STANCATO, L.F., KRISHINA, P. & PRATT, W.T. (1997). Folding of the glucocorticoid receptor by the heat shock protein (hsp) 90-based chaperone machinery. The role of p23 is to stabilize receptor. hsp90 heterocomplexes formed by hsp90. p60. hsp70. *J Biol Chem*, **272**, 21213-21220.

- DRAZEN, D.L. & NELSON, R.J. (2001) Melatonin receptor subtype MT2 (Mel 1b) and not mt1 (Mel 1a) is associated with melatonin-induced enhancement of cell-mediated and humoral immunity. *Neuroendocrinology*, **74**, 178-184.
- DRIJFHOUT, W. J., GROL, C. J. & WESTERINK, B. H. C. (1996). Parasympathetic inhibition of pineal indole metabolism by prejunctional modulation of noradrenaline release. *Eur J Pharamcol*, **20**, 24-32.
- DUBOCOVICH, M.L. & MARKOWSKA, M. (2005). Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*, **27**, 101-110.
- DUVERNOY, H.M. & RISOLD, P.Y. (2007). The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain Res Rev*, **56**, 119-147.
- EBERHARDT, W., SCHULZE, M., ENGELS, C., KLASMEIER, E. & PFEILSCHIFTER, J. (2002). Glucocorticoid-mediated suppression of cytokine-induced matrix metalloproteinase-9 expression in rat mesangial cells: involvement of nuclear factor-kappaB and Ets transcription factors. *Mol Endocrinol*, **16**, 1752-1766.
- FERREIRA, Z.S. & MARKUS, R.P. (2001). Characterisation of P2Y(1)-like receptor in cultured rat pineal glands. *Eur J Pharmacol*, **415**, 151-156.
- FERREIRA, Z.S., CIPOLLA-NETO, J. & MARKUS, R.P. (1994). Presence of P₂-purinoceptors in the rat pineal gland. *Brit J Pharmacol*, **112**, 107-110.
- FERREIRA, Z.S., FERNANDES, P.A.C.M., DUMA, D., ASSREUY, J., AVELLAR, M.C.W. & MARKUS, R.P. (2005). Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappaB. *J Pineal Res*, **38**, 182-188.
- FERREIRA, Z.S., GARCIA, C.R., SPRAY, D.C. & MARKUS, R.P. (2003). P2Y(1) receptor activation enhances the rate of rat pinealocyte-induced extracellular acidification via a calcium-dependent mechanism. *Pharmacology*, **69**, 33-37.
- FOULKES, N.S., BORJIGIN, J., SNYDER, H. & SASSONE-CORSI, P. (1986). Transcriptional control of circadian hormone synthesis via the CREM feedback loop. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 14140-14145.
- GANGULY, S., COON, S. L. & KLEIN, D. C. (2002). Control of melatonin synthesis in mammalian pineal gland; the critical role of serotonin acetylation. *Cell Tissue Res*, **309**, 127-137.
- GANGULY, S., GRODZKI, C., SUGDEN, D., MØLLER, M., ODOM, S., GAILDRAT, P., GERY, I., SIRAGANIAN, R.P., RIVERA, J. & KLEIN, D.C. (2007). Neural adrenergic/cyclic AMP regulation of the immunoglobulin E receptor alpha-

- subunit expression in the mammalian pinealocyte: a neuroendocrine/immune response link? *J Biol Chem*, **282**, 32758-32764.
- GANGULY, S.; GASTEL, J.A.; WELLWE, J.L.; SCHAWARTZ, C., JAFFE, H., NAMBOODIRI, M.A., COON, S.L., HICHMAN, B., ROLLAG, M., OBSIL, T., BEAUVERGER, P., FERRY, G., BOUTIN, J.A. & KLEIN, D.C. (2001). Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 8083-8088.
- GARCIA-MAURIÑO, S., GONZALEZ-HABA, M.G., CALVO, J.R., RAFII-EL-IDRISSI, M., SANCHEZ-MARGALET, V., GOBERNA, R. & GUERRERO JM. (1997). Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol*, **159**, 574-581.
- GARIDOU, M.L., GAUER, F., VIVIEN-ROELS, B., SICARD, B., PÉVET, P. & SIMONNEAUX, V. (2002). Pineal arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression is highly stimulated at night in the diurnal rodent, *Arvicanthis ansorgei*. *Eur J Neurosci*, **15**, 1632-1640.
- GASTEL, J.A., ROSEBOOM, P.H., RINALDI, P.A., WELLER, J.L. & KLEIN, D.C. (1998). Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin n-acetyltransferase regulation. *Science*, **279**, 1358-1360.
- GAUER, F., POIREL, V.J., GARIDOU, M.L., SIMONNEAUX, V. & PÉVET, P. (1999). Molecular cloning of the arylalkylamine-N-acetyltransferase and daily variations of its mRNA expression in the Syrian hamster pineal gland. *Mol Brain Res*, **71**, 87-95.
- GHOSH, S. & HAYDEN, M.S. (2008). New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol*, **11**, 837-848.
- GHOSH, S., MARY, M.J. & KOPP, E.B. (1998). NF-kB and Rel proteins: evolutionarily conserved mediations of immune responses. *Annu Rev Immunol*, **16**, 225-260.
- 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.
- GIORDANO, A., AVELLINO, R., FERRARO, P., ROMANO, S., CORCIONE, N. & ROMANO, M.F. (2006). Rapamycin antagonizes NF-kappaB nuclear translocation

- activated by TNF-alpha in primary vascular smooth muscle cells and enhances apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **290**, 2459-2465.
- GRAY, P.W. & GOEDDEL, D.V. (1982). Structure of the human immune interferon gene. *Nature*, **298**, 859-863.
- GRELL, M., WAJANT, H., ZIMMERMANN, G. & SCHEURICH, P. (1998). The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 570-575.
- GUILLAUMOND, F., SAGE, D., DEPREZ, P., BOSLER, O., BECQUET, D. & FRANCOIS-BELLAN, A M. (2000). Circadian binding activity of ap-1, a regulator of the arylalkylamine n-acetyltransferase gene in the rat pineal gland, depends on circadian fra-2, c-jun, and jun-d expression and is regulated by the clock's zeitgebers. *J Neurochem*, **75**, 1398-1407.
- HACK, C.E., AARDEN, L.A. & THIJS, L.G. (1997). Role of cytokines in sepsis. *Adv Immunol*, **66**, 101-195.
- HATTAR, S., LIAO, H.W., TAKAO, M., BERSON, D.M. & YAU, K.W. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science*, **295**, 1065-1070.
- HAYDEN, M.S. & GHOSH, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*, **18**, 2195-2224.
- HEISSMEYER, V., KRAPPMANN, D., WULCZYN, F.G. & SCHEIDEREIT, C. (1999). NF-kappaB p105 is a target of IkappaB kinases and controls signal induction of Bcl-3-p50 complexes. *EMBO J*, **18**, 4766-4778.
- HELD, T.K., WEIHUA, X., YUAN, L., KALVAKOLANU, D.V. & CROSS, A.S. (1999). Gamma interferon augments macrophage activation by lipopolysaccharide by two distinct mechanisms, at the signal transduction level and via an autocrine mechanism involving tumor necrosis factor alpha and interleukin-1. *Infect Immun*, **67**, 206-212.
- HOFFMAN, R.A. & REITER, R.J. (1965a). Pineal gland: influence on gonads of male hamsters. *Science*, **148**, 1609-1611.
- HOFFMAN, R.A. & REITER, R.J. (1965b). Influence of compensatory mechanisms and the pineal gland on dark-induced gonadal atrophy in male hamsters. *Nature*, **207**, 658-659.

- HOFFMAN, R.A., HESTER, R.J. & TOWNS, C. (1965). Effect of light and temperature on the endocrine system of the golden hamster (*Mesocricetus auratus* Waterhouse). *Comp Biochem Physiol*, **15**, 525-533.
- HOFFMANN, A., LEVCHENKO, A., SCOTT, M.L. & BALTIMORE, D. (2002). The I κ B-NF- κ B Signaling Module: Temporal Control and Selective Gene Activation. *Science*, **298**, 1241-1245.
- IHLE, J.N. (1995). The Janus protein tyrosine kinase family and its role in cytokine signaling. *Adv Immunol*, **60**, 1-35.
- JURKOVICH, G.J., MILESKE, W.J., MAIER, R.V., WINN, R.K., & RICE, C.L. (1991). Interferon gamma increases sensitivity to endotoxin. *J Surg Res*, **51**, 197-203.
- KALSBECK, A. & BUIJS, R.M. (2002). Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res*, **309**, 109-118.
- KALSBECK, A., GARIDOU, M.L., PALM, I.F., VAN DER VLIET, J., SIMONNEAUX, V., PÉVET, P. & BUIJS, R.M. (2000) Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *Eur J Neurosci*, **12**, 3146-3154.
- KALSBECK, A., PERREAU-LENZ, S. & BUIJS, R.M. (2006). A network of (autonomic) clock outputs. *Chronobiol Int*, **23**, 521-535.
- KALSBECK, A., RIKKERS, M., VIVIEN-ROELS, B. & PÉVET, P. (1993). Vasopressin and vasoactive intestinal peptide infused in the paraventricular nucleus of the hypothalamus elevate plasma melatonin levels. *J Pineal Res*, **15**, 46-52.
- KAPPERS, J.A. (1960). The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. *Zeitschrift fur Zellforschung*, **52**, 163-215.
- KARIN, M. & CHANG, L. (2001). AP-1-glucocorticoid receptor cross-talk taken to a higher level. *J Endocrinol*, **169**, 447-451.
- KIM, M.H., UEHARA, S., MUROYAMA, A., HILLE, B., MORIYAMA, Y. & KOH, D.S. (2008). Glutamate transporter-mediated glutamate secretion in the mammalian pineal gland. *J Neurosci*, **28**, 10852-10863.
- KITAY, J.I. & ALTSCHULE, M.D. (1954). Effects of pineal extract administration on ovary weight in rats. *Endocrinology*, **65**, 782-784.
- KLEIN, D. C. & WELLER, J. L. (1970). Indole Metabolism in the Pineal Gland: A Circadian Rhythm in N-Acetyltransferase. *Science*, **169**, 1093-1095.

- 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*. Pittman Press, London, pp. 38-56.
- KLEIN, D.C., COON, S.L.; ROSEBOOM, P.H., Weller, J.L., BERNARD, M., GASTEL, J.A., ZATZ, M., IUVONE, M., RODRIGUEZ, I.R., BÉGAY, V., FLCON, J., CAHILL, G.M., COSSONE, V.M. & BALER, R. (1997). The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin n-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Progress in Hormone Res*, **52**, 307-358.
- KLEIN, D.C., GANGULY, S., COON, S., WELLER, J.L., OBSIL, T., HICKMAN, A. & DYDA, F. (2002). 14-3-3 Proteins and photoneuroendocrine transduction: role in controlling the daily rhythm in melatonin. *Biochem Soc Trans*, **30**, 365-73.
- KROZOWSKI, Z.S. & FUNDER, J.W. (1983). Renal mineralocorticoid receptors and hippocampal corticosterone-binding species have identical intrinsic steroid specificity. *Proc Natl Acad Sci USA*, **80**, 6056-6060.
- KUMAR, R. & THOMPSON, E.B. (2003). Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Mol Endocrinol*, **17**, 1-10.
- KUS, L., HANDA, R.J. & MCNULTY, J.A. (1994). Glutamate inhibition of the adrenergic-stimulated production of melatonin in rat pineal gland *in vitro*. *J Neurochem*, **62**, 2241-2245.
- La FLEUR, S.E., KALSBECK, A., WORTEL, J. & BUIJS, R.M. (2000). Polysynaptic neural pathways between the hypothalamus, including the suprachiasmatic nucleus, and the liver. *Brain Res*, **871**, 50-56.
- La IGLESIA, H.O., BLAUSTEIN, J.D. & BITTMAN, E.L. (1999). Oestrogen receptor-alpha-immunoreactive neurones project to the suprachiasmatic nucleus of the female Syrian hamster. *J Neuroendocrinol*, **11**, 481-490.
- LEDGERWOOD, E.C., POBER, J.S. & BRADLEY, J.R. (1999). Recent advances in the molecular basis of TNF signal transduction. *Lab Invest*, **79**, 1041-1050.
- LERNER, A.B., CASE, J.D. & HEINZELMAN, R.V. (1959). Structure of melatonin. *J Am Chem Soc*, **81**, 6084.
- LERNER, A.B., CASE, J.O., TAKAHASHI, Y., LEE, T.H. & MORI, W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc*, **80**, 2587.

- LETZ, B., SCHOMERUS, C., MARONDE, E., KORF, H.W. & KORBMACHER, C. (1997). Stimulation of a nicotinic ACh receptor causes depolarization and activation of L-type Ca²⁺ channels in rat pinealocytes. *J Physiol*, **499**, 329-340.
- LISSONI, P., ROVELLI, F., BRIVIO, F., BRIVIO, O. & FUMAGALLI, L. (1998). Circadian secretions of IL-2, IL-12, IL-6 and IL-10 in relation to the light/dark rhythm of the pineal hormone melatonin in healthy humans. *Nat Immun*, **16**, 1-5.
- LOPES, C., DELYRA, J.L., MARKUS, R.P. & MARIANO, M. (1997). Circadian rhythm in experimental chronic inflammation is modulated by melatonin. *J Pineal Res*, **23**, 72-78.
- LOPES, C., MARIANO, M. & MARKUS, R.P. (2001). Interaction between the adrenal and the pineal gland in chronic experimental inflammation induced by BCG in mice. *Inflammation Res*, **50**, 6-11.
- 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.
- LOTUFO, C.M.C., LOPES, C., DUBOCOVICH, M.L., FARSKY, S.H.P. & MARKUS, R.P. (2001). Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leucocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur J Pharmacol*, **430**, 351-357.
- LOVENBERG, W., JEQUIER, E. & SJOERDSMA, A. (1967). Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor. *Science*, **155**, 217-219.
- MAESTRONI, G.J., CONTI, A. & PIERPAOLI, W. (1986). Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. *J Neuroimmunol*, **13**, 19-30.
- MALEK, Z.S., DARDENTE, H., PÉVET, P. & RAISON, S. (2005). Tissue-specific expression of tryptophan hydroxylase mRNAs in the rat midbrain: anatomical evidence and daily profiles. *Eur J Neurosci*, **22**, 895-901.
- MALEK, Z.S., PÉVET, P. & RAISON, S. (2004). Circadian change in tryptophan hydroxylase protein levels within the rat intergeniculate leaflets and raphe nuclei. *Neuroscience*, **125**, 749-758.
- MALEK, Z.S., SAGE, D., PÉVET, P. & RAISON, S. (2007). Daily rhythm of tryptophan hydroxylase-2 messenger ribonucleic acid within raphe neurons is induced by

- corticoid daily surge and modulated by enhanced locomotor activity. *Endocrinology*, **148**, 5165-5172.
- MARKUS, R.P. & TAMURA, E.K. (2009). G protein-coupled receptors and others mechanisms that translate melatonin effects. In G Protein-coupled receptors in vertebrates: Comparative Perspectives. Ed. Magalhães, M.F. & Yamanouye, Norma. Research Signpost.
- MARKUS, R.P., FERREIRA, Z.S., FERNANDES, P.A.C.M. & CECON, E. (2007). The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *Neuroimmunomodulation*, **14**, 126-133.
- MEDEIROS, R., CABRINI, D.A. & CALIXTO, J.B. (2001). The "in vivo" and "ex vivo" roles of cyclooxygenase-2, nuclear factor-kappaB and protein kinases pathways in the up-regulation of B1 receptor-mediated contraction of the rabbit aorta. *Regul Pept*, **97**, 121-130.
- MEDZHITOV, R. & JANEWAY, C. JR. (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*, **173**, 89-97.
- MENAKER, M., MOREIRA, L.F., TOSINI, G. (1997). Evolution of circadian organization in vertebrates. *Braz J Med Biol Res*, **30**, 305-313.
- MERAZ, M.A., WHITE, J.M., SHEEHAN, K.C., BACH, E.A., RODIG, S.J., DIGHE, A.S., KAPLAN, D.H., RILEY, J.K., GREENLUND, A.C., CAMPBELL, D., CARVER-MOORE, K., DUBOIS, R.N., CLARK, R., AGUET, M. & SCHREIBER, R.D. (1996). Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell*, **84**, 431-442.
- MILLER, R., WEN, X., DUNFORD, B., WANG, X. & SUZUKI, Y. (2006). Cytokine production of CD8+ immune T cells but not of CD4+ T cells from Toxoplasma gondii-infected mice is polarized to a type 1 response following stimulation with tachyzoite-infected macrophages. *J Interferon Cytokine Res*, **26**, 787-792.
- MØLLER, M. & BAERES, F.M. (2002). The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res*, **309**, 139-150.
- MOORE, R.Y. & EICHLER, V.B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res*, **42**, 210-216.
- 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.

- MOYNAGH, P.N. (2003). Toll-like receptor signalling pathways as key targets for mediating the anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids. *J Endocrinol*, **179**, 139-144.
- MURPHY, T.L., CLEVELAND, M.G., KULESZA, P., MAGRAM, J. & MURPHY, K.M. (1995). Regulation of interleukin 12 p40 expression through a NF-kappa B half-site. *Mol Cell Biol*, **15**, 5258-5267.
- NADEAU, S. & RIVEST, S. (2002). Endotoxemia prevents the cerebral inflammatory wave induced by intraparenchymal lipopolysaccharide injection: role of glucocorticoids and CD14. *J Immunol*, **169**, 3370-3381.
- NADEAU, S. & RIVEST, S. (2003) Glucocorticoids play a fundamental role in protecting the brain during innate immune response. *J Neurosci*, **23**, 5536-5544.
- NECELA, B.M. & CIDLOWSKI, J.A. (2004). Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells. *Proc Am Thorac Soc*, **1**, 239-246.
- NELSON, R.J., DEMAS, G.E. (1997). Role of melatonin in mediating seasonal energetic and immunologic adaptations. *Brain Res Bull*, **44**, 423-430.
- NELSON, R.J., DEMAS, G.E., KLEIN, S.L. & KRIEGSFELD, L.J. (1995). The influence of season, photoperiod, and pineal melatonin on immune function. *J Pineal Res*, **19**, 149-165.
- NIR, I., KAISER, N., HIRSCHMANN, N. & SULMAN, F.G. (1970). The effect of 17 beta-estradiol on pineal metabolism. *Life Sci*, **9**, 851-858.
- NOLAN, G.P., FUJITA, T., BHATIA, K., HUPPI, C., LIOU, H.C., SCOTT, M.L. & BALTIMORE, D. (1993). The bcl-3 proto-oncogene encodes a nuclear I kappa B-like molecule that preferentially interacts with NF-kappaB p50 and p52 in a phosphorylation-dependent manner. *Mol Cell Biol*, **13**, 3557-3566.
- NUSINZON, I. & HORVATH, C.M. (2003). Interferon-stimulated transcription and innate antiviral immunity require deacetylase activity and histone deacetylase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 14742-14747.
- ONER, H., KUS, I., ONER, J., OGETÜRK, M., OZAN, E. & AYAR, A. (2004). Possible effects of melatonin on thymus gland after pinealectomy in rats. *Neuro Endocrinol Lett*, **25**, 115-118.
- ORO, A.E., HOLLENBERG, S.M. & EVANS, R.M. (1988). Transcriptional inhibition by a glucocorticoid receptor-beta-galactosidase fusion protein. *Cell*, **55**, 1109-1114.

- PALOMBELLA, V.J., RANDO, O.J., GOLDBERG, A.L. & MANIATIS, T. (1994). The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappaB1 precursor protein and the activation of NF-kappaB. *Cell*, **78**, 773-785.
- PANGER, B., PANGER, A. & REITER, R. J. (1990). Circadian variations of adrenergic receptors in the mammalian pineal gland: a review. *J Neural Transm*, **81**, 17-29.
- PARFITT, A., WELLER, J.L. & KLEIN, D.C. (1976). Beta-adrenergic blockers decrease adrenergically stimulated n-acetyltransferase activity in pineal glands in organ culture. *Neuropharmacology*, **15**, 353-358.
- PAXINOS, G. & WATSON, C. (1982). In: Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. New York: Academic Press Inc.
- PEDERSEN, E.B., FOX, L.M., CASTRO, A.J. & McNULTY, J.A. (1993). Immunocytochemical and electron-microscopic characterization of macrophage/microglia cells and expression of class II major histocompatibility complex in the pineal gland of the rat. *Cell Tissue Res*, **272**, 257-265.
- PERREAU-LENZ, S., KALSBECK, A., GARIDOU, M.L., WORTEL, J., VAN DER VLIET, J., VAN HEIJNINGEN, C., SIMONNEAUX, V., PÉVET, P. & BUIJS R.M. (2003). Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms. *Eur J Neurosci*, **17**, 221-228.
- PFEFFER, M., MARONDE, E., MOLINA, C.A., KORF, H.W. & STEHLE, J.H. (1999). Inducible cyclic AMP early repressor protein in rat pinealocytes: a highly sensitive natural reporter for regulated gene transcription. *Mol Pharmacol*, **56**, 279-289.
- PHANSUWAN-PUJITO, P., MØLLER, M. & GOVITRAPONG, P. (1999). Cholinergic innervation and function in the mammalian pineal gland. *Microsc Res Tech*, **46**, 281-295.
- PICKART, C.M. (1997). Targeting of substrates to the 26S proteasome. *FASEB J*, **11**, 1055-1066.
- PLATANIAS, L.C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol*, **5**, 375-386.
- 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-alpha increase

- after cesarean section suppress nocturnal melatonin production. *J Pineal Res*, **43**, 365- 371.
- PORTER, J.R. & HEIMAN, M. (1977). The effects of pineal indoles and a crude aqueous pineal extract on ACTH mediated corticosterone release by isolated adrenal cells. *Life Sci*, **20**, 1363-1372.
- PRESMAN, D.M., HOIJMAN, E., CEBALLOS, N.R., GALIGNIANA, M.D. & PECCI, A. (2006). Melatonin inhibits glucocorticoid receptor nuclear translocation in mouse thymocytes. *Endocrinology*, **147**, 5452-5459.
- PROVENCIO, I., RODRIGUEZ, I.R., JIANG, G., HAYES, W.P., MOREIRA, E.F. & ROLLAG, M.D. (2000). A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci*, **20**, 600-605.
- QUAN, N., HE, L., LAI, W., SHEN, T. & HERKENHAM, M. (2000). Induction of IkB α mRNA Expression in the Brain by Glucocorticoids: A Negative Feedback Mechanism for Immune-to-Brain Signaling. *The Journal of Neuroscience*, **20**, 6473-6477.
- QUAY, W.B. (1963). Circadian rhythm in rat pineal serotonin and its modifications by estrous cycle and photoperiod. *Gen Comp Endocrinol*, **14**, 473-479.
- QUAY, W.B. (1964). Circadian and estrous rhythms in pineal melatonin and 5-hydroxy indole-3-acetic acid. *Proc Soc Exp Biol Med*, **115**, 710-713.
- RAY, A. & PREFONTAINE, K.E. (1994). Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 752-756.
- REICHARDT, H.M. & SCHÜTZ, G. (1998). Glucocorticoid signalling-multiple variations of a common theme. *Mol Cell Endocrinol*, **146**, 1-6.
- REICHARDT, H.M., KAESTNER, K.H., WESSELY, O., GASS, P., SCHMID, W. & SCHÜTZ, G. (1998). Analysis of glucocorticoid signalling by gene targeting. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **65**, 111-115.
- REITER, R., TANG, L., GARCIA, J.J. & MUÑOZ-HOYOS, A. (1997). Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci*, **60**, 2255-2271.
- REITER, R.J., HURLBUT, E.C., ESQUIFINO, A.I., CHAMPNEY, T.H. & STEGER, R.W. (1984). Changes in serotonin levels, N-acetyltransferase activity, hydroxyindole-O-methyltransferase activity, and melatonin levels in the pineal gland of the Richardson's ground squirrel in relation to the light-dark cycle. *Neuroendocrinology*, **4**, 356-360.

- RENO, L.A. ZAGO, W. & MARKUS, R.P. (2004). Release of [(3)H]-L-glutamate by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in rat cerebellar slices. *Neuroscience*, **124**, 647-653.
- REUL, J.M. & DE KLOET, E.R. (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, **117**, 2505-2511.
- REUSS, S., SEMM, P. & VOLLRATH, L. (1985). Changes in the electrical activity of the rat pineal gland following stimulation of the cervical sympathetic ganglia. *J Auton Nerv Syst*, **12**, 281-288.
- RHEN, T. & CIDLOWSKI, J.A. (2005). Antiinflammatory action of glucocorticoids-new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med*, **353**, 1711-1723.
- RIBELAYGA, C., GAUER, F., CALGARI, C., PÉVET, P. & SIMONNEAUX, V. (1999). Photoneural regulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) messenger ribonucleic acid expression: an analysis of its complex relationship with HIOMT activity. *Endocrinology*, **140**, 1375-1384.
- ROMERO, J.A. & AXELROD, J. (1974). Pineal beta-adrenergic receptor: diurnal variation in sensitivity. *Science*, **184**, 1091-1092.
- ROSEBOOM, P.H. & KLEIN, D.C. (1995). Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: primary role of a beta-adrenergic receptor/cyclic AMP mechanism. *Mol Pharmacol*, **47**, 439-449.
- ROSEBOOM, P.H., COON, S.L., BALER, R., McCUNE, S.K., WELLER, J.L., KLEIN, D.C. (1996). Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology*, **137**, 3033-3045.
- ROSEBOOM, P.H., NAMBOODIRI, M.A., ZIMONJIC, D.B., POPESCU, N.C., RODRIGUEZ, I.R., GASTEL, J.A. & KLEIN, D.C. (1998). Natural melatonin 'knockdown' in C57BL/6J mice: rare mechanism truncates serotonin N-acetyltransferase. *Brain Res Mol Brain Res*, **63**, 189-197.
- 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.
- SAEB-PARSY, K. & DYBALL, R.E. (2003). Defined cell groups in the rat suprachiasmatic nucleus have different day/night rhythms of single-unit activity in vivo. *J Biol Rhythms*, **18**, 26-42.

- SAINZ, R.M., MAYO, J.C., REITER, R.J., ANTOLIN, I., ESTEBAN, M.M. & RODRIGUEZ, C. (1999). Melatonin regulates glucocorticoid receptor: an answer to its antiapoptotic action in thymus. *FASEB J*, **13**, 1547-1556.
- SALAZAR-MATHER, T.P., HAMILTON, T.A. & BIRON, C.A. (2000). A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense. A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense. *J Clin Invest*, **105**, 985-993.
- SANDROCK, A.W. JR., LEBLANC, G/G., WONG, D.L. & CIARANELLO, R.D. (1980). Regulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase: evidence of S-adenosylmethionine-mediated glucocorticoid control. *J Neurochem*, **35**, 536-543.
- SATO, T., KANEKO, M., HAMA, A., KUSAKARI, T. & FUJIEDA, H. (1996). Expression of class II MHC molecules in the rat pineal gland during development and effects of treatment with carbon tetrachloride. *Cell Tissue Res*, **284**, 65-76.
- SCARBROUGH, K., HARNEY, J.P., ROSEWELL, K.L. & WISE, P.M. (1996). Acute effects of antisense antagonism of a single peptide neurotransmitter in the circadian clock. *Am J Physiol*, **270**, 283-288.
- SCHEINMAN, R.I., COGSWELL, P.C., LOFQUIST, A.K. & BALDWIN, A.S. JR. (1995). Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science*, **270**, 283-286.
- SCHENDA, J. & VOLLRATH, L. (1998). Modulatory role of acetylcholine in the rat pineal gland. *Neurosci Lett*, **254**, 13-16.
- SCHENDA, J. & VOLLRATH, L. (1999). An intrinsic neuronal-like network in the rat pineal gland. *Brain Res*, **823**, 231-233.
- SCHOENMAKERS, E., VERRIJDT, G., PEETERS, B., VERHOEVEN, G., ROMBAUTS, W. & CLAESSENS, F. (2000). Differences in DNA binding characteristics of the androgen and glucocorticoid receptors can determine hormone-specific responses. *J Biol Chem*, **275**, 12290-12297.
- SCHOMERUS, C., KORF, H.W., LAEDTKE, E., WELLER, J.L. & KLEIN, D.C. (2000). Selective adrenergic/cyclic amp-dependent switch-off of proteasomal proteolysis alone switches on neural signal transduction: an example from the pineal gland. *J Neurochem*, **75**, 2123-2132.
- SCHONEVELD, O.J.L.M., GAEMES, I.C. & LAMERS, W.H. (2004). Mechanisms of glucocorticoid signaling. *Bioch Bioph Acta*, **1680**, 114-128.

- SCHRODER, K., HERTZOG, P.J., RAVASI, T. & HUME, D.A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*, **75**, 163-89.
- SCHULTZ, T.F. & KAY, S.A. (2003). Circadian clocks in daily and seasonal control of development. *Science*, **301**, 326-328.
- SCHWARTZ, W. J., DAVIDSON, L.C. & SMITH, C.B. (1980). In vivo metabolic activity of a putative circadian oscillator, the rat suprachiasmatic nucleus. *Comp Neurol*, **189**, 157-168.
- SCOTT, M.L., FUJITA, T., LIOU, H.C., NOLAN, G.P. & BALTIMORE, D. (1993). The p65 subunit of NF-kappa B regulates I kappa B by two distinct mechanisms. *Genes Dev*, **7**, 1266-1276.
- 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.
- SHUAI, K., SCHINDLER, C., PREZIOSO, V.R. & DARNELL, J.E. Jr. (1992). Activation of transcription by IFN-gamma: tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. *Science*, **258**, 1808-1812.
- SIEBENLIST, U. (1997). NF kappa B/I kappa B proteins. Their role in cell growth, differentiation and development. *Biochim Biophys Acta*, **1332**, 7-13.
- SILVENNOINEN, O., IHLE, J.N., SCHLESSINGER, J. & LEVY, D.E. (1993). Interferon-induced nuclear signalling by Jak protein tyrosine kinases. *Nature*, **366**, 583-585.
- 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.
- SKWARŁO-SOŃTA, K. (1996). Functional connections between the pineal gland and immune system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, **56**, 341-357.
- SKWARŁO-SOŃTA, K. (2002). Melatonin in immunity: comparative aspects. *Neuro Endocrinol Lett*, **1**, 61-66.
- SLOTTEN, H.A., KREKLING, S., SICARD, B. & PÉVET, P. (2002). Daily infusion of melatonin entrains circadian activity rhythms in the diurnal rodent *Arvicanthis ansorgei*. *Behavioural Brain Res*, **133**, 11-19.

- SNYDER, S.H. & AXELROD, J. (1964). A sensitive assay for 5-hydroxytryptophan decarboxylase. *Biochem Pharmacol*, **13**, 805-806.
- SPESSERT, R., LAYES, E., HILL, G. & VOLLRATH, L. (1998). Nitric oxide is formed in a subpopulation of rat pineal cells and acts as an intercellular messenger. *Neuroendocrinology*, **68**, 57-63.
- SRINIVASAN, V., SPENCE, D.W., TRAKHT, I., PANDI-PERUMAL, S.R., CARDINALI, D.P. & MAESTRONI, G.J. (2008). Immunomodulation by melatonin: its significance for seasonally occurring diseases. *Neuroimmunomodulation*, **15**, 93-101.
- STARK, G.R. (2007). How cells respond to interferons revisited: from early history to current complexity. *Cytokine Growth Factor Rev*, **18**, 419-423.
- STARK, G.R., KERR, I.M., WILLIAMS, B.R., SILVERMAN, R.H. & SCHREIBER, R.D. (1998). How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, **67**, 227-264.
- STRADA, S.J., KLEIN, D.C., WELLER, J. & WEISS, B. (1972). Effect of norepinephrine on the concentration of adenosine 3',5'-monophosphate of rat pineal gland in organ culture. *Endocrinology*, **90**, 1470-1475.
- SUGDEN, D. (2003). Comparison of circadian expression of tryptophan hydroxylase isoform mRNAs in the rat pineal gland using real-time PCR. *J Neurochem*, **86**, 1308-1311.
- TAKAMIYA, A., TAKEDA, M., YOSHIDA, A. & KIYAMA, H. (2002). Inflammation induces serine protease inhibitor 3 expression in the rat pineal gland. *Neuroscience*, **113**, 387-394.
- TAMURA, E.K., CECON, E., MONTEIRO, A.W.A., SILVA, C.L.M. & MARKUS, R.P. Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells, *J Pineal Res*, no prelo.
- TAMURA, E.K., SILVA, C.L. & MARKUS, R.P. (2006). Melatonin inhibits endothelial nitric oxide production in vitro. *J Pineal Res*, **41**, 267-274.
- TECLEMARIAM-MESBAH, R., TER HORST, G.J., POSTEMA, F., WORTEL, J. & BUIJS, R.M. (1999) Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway. *J Comp Neurol*, **406**, 171-182.
- TEKBAS, O.F., OGUR, R., KORKMAZ, A., KILIC, A. & REITER, R.J. (2008). Melatonin as an antibiotic: new insights into the actions of this ubiquitous molecule. *J Pineal Res*, **44**, 222-226.

- 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.
- TRACEY K.J. & CERAMI, A. (1993). Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu. Rev. Cell Biol*, **9**, 317-343.
- TRACEY, D., KLARESKOG, L., SASSO, E.H., SALFELD, J.G. & TAK, P.P. (2008). Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther*, **117**, 244-279.
- TRACEY, K.J. & CERAMI, A. (1994). Tumor Necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu. Rev. Med*, **45**, 491-503.
- TRENDELENBURG, U. (1978). Extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines as a site of loss. *Life Sci*, **22**, 1217-1222.
- TROIANI, M.E., OAKNIN, S., REITER, R.J., VAUGHAN, M.K. & COZZI, B. (1987). Depression in rat pineal N-acetyltransferase activity and melatonin content produced by a hind leg saline injection is time and darkness dependent. *J Pineal Res*, **2**, 185-195.
- TROIANI, M.E., REITER, R.J., VAUGHAN, M.K., GONZALEZ-BRITO, A. & HERBERT, D.C. (1988). The depression in rat pineal melatonin production after saline injection at night may be elicited by corticosterone. *Brain Res*, **450**, 18-24.
- TSAI S, Y. & MCNULTY, J.A. (1999). Interleukin-1beta expression in the pineal gland of the rat. *J Pineal Res*, **27**, 42-48.
- TSAI, S.Y., SCHLUNS, K.S., LE, P.T. & MCNULTY, J.A. (2001). TGF-beta1 and IL-6 expression in rat pineal gland is regulated by norepinephrine and interleukin-1beta. *Histol Histopathol*, **16**, 1135-1141.
- TURNBULL, A.V. & RIVIER, C.L. (1999). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev*, **79**, 1-71.
- TZAVARA, E.T., POUILLE, Y., DEFER, N. & HANOUNE, J. (1996). Diurnal variation of the adenylyl cyclase type 1 in the rat pineal gland. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 11208-11212.
- ULRICH-LAI, Y.M., ARNHOLD, M.M. & ENGELAND, W.C. (2006). Adrenal splanchnic innervation contributes to the diurnal rhythm of plasma corticosterone in rats by modulating adrenal sensitivity to ACTH. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **290**, 1128-1135.

- VANECEK, J., SUGDEN, D., WELLER, J. & KLEIN, D.C. (1985). Atypical synergistic $\alpha 1$ and β -adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinology*, **116**, 2167-2173.
- VOISIN, P., NAMBOODIRI, M. A. A. & KLEIN, D. C. (1984). Arylamine N-acetyltransferase and aryl-alkylamine N-acetyltransferase in the mammalian pineal gland. *J Biol Chem*, **259**, 10913-10918.
- VOLLRATH, L. (1981). The pineal organ. In Handbuch der mikroskopischen anatomie des menschen. Ed A. Oksche and L. Vollrath, *Springer Verlag*, Berlin, **6**.
- WAJANT, H., PFIZENMAIER, K. & SCHEURICH, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death and Differentiation*, **10**, 45-65.
- WALTHER, D.J., PETER, J.U., BASHAMMAKH, S., HÖRTNAGL, H., VOITS, M., FINK, H. & BADER, M. (2003). Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*, **299**, 76.
- WESSLER, I., REINHEIMER, T., BITTINGER, F., KIRKPATRICK, C.J., SCHENDA, J. & VOLLRATH, L. (1997). Day-night rhythm of acetylcholine in the rat pineal gland. *Neurosci Lett*, **224**, 173-176.
- WISSINK, S., VAN HEERDE, E.C., SCHMITZ, M.L., KALKHOVEN, E., VAN DER BURG, B. BAEUERLE, P.A. & VAN DER SAAG, P.T. (1997). Distinct domains of the RelA NF-kappaB subunit are required for negative cross-talk and direct interaction with the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*, **272**, 22278-22284.
- WITHYACHUMNARNKUL, B., NONAKA, K.O., ATTIA, A.M. & REITER, R.J. (1990). Changes in indole metabolism in organ cultured rat pineal glands induced by interferon-gamma. *J Pineal Res*, **8**, 313-322.
- WONG, D.L., HAYASHI, R.J. & CIARANELLO, R.D. (1985). Regulation of biogenic amine methyltransferases by glucocorticoids via S-adenosylmethionine and its metabolizing enzymes, methionine adenosyltransferase and S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Brain Res*, **330**, 209-216.
- WU, C.C., CHIAO, C.W., HSIAO, G., CHEN, A., YEN, M.H. (2001). Melatonin prevents endotoxin-induced circulatory failure in rats. *J Pineal Res*, **30**, 147-156.
- YAMADA, H., OGURA, A., KOIZUMI, S., YAMAGUCHI, A. & MORIYAMA, Y. (1998). Acetylcholine triggers L-glutamate exocytosis via nicotinic receptors and inhibits melatonin synthesis in rat pinealocytes. *J Neurosci*, **18**, 4946-4952.

- YANG, J., LIAO, X., AGARWA, L.M.K., BARNES, L., AURON, P.E. & STARK, G.R. (2007). Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activatestranscription by binding to NFkappaB. *Genes Dev*, **21**, 1396-1408.
- YOSHIDA, A., KOIDE, Y., UCHIJIMA, M. & YOSHIDA, T.O. (1994). IFN-gamma induces IL-12 mRNA expression by a murine macrophage cell line, J774. *Biochem Biophys Res Commun*, **198**, 857-861.
- YUWILER, A. (1989). Effects of steroids on serotonin-N-acetyltransferase activity of pineals in organ culture. *J Neurochem*, **52**, 46-53.
- ZHAO, Z.Y. & TOUITOU, Y. (1993). Kinetic changes of melatonin release in rat pineal perfusion at different circadian stages. Effect of corticosteroids. *Acta Endocrinol Copenh*, **129**, 81-88.