Sanseray da Silveira Cruz Machado

Caracterização do eixo imune-pineal:

glândula pineal como alvo para lipopolissacarídeo (LPS)

São Paulo

2010

Sanseray da Silveira Cruz Machado

Caracterização do eixo imune-pineal:
glândula pineal como alvo para lipopolissacarídeo (LPS)

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

Orientadora: Regina Pekelmann Markus

São Paulo

2010

Ficha Catalográfica

Cruz Machado, Sanseray da Silveira

Caracterização do eixo imune-pineal : glândula pineal como alvo para lipopolissacarídeo (LPS) / Sanseray da Silveira Cruz Machado ; orientador Regina Pekelmann Markus. – São Paulo, 2010.

140 p., Il

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

1. Glândula Pineal. 2. NFkB. 3. Melatonina. I. Markus, Regina Pekelmann. II. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

COMISSÃO JULGADORA

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a).

Orientador(a)

À Suely da Silveira Cruz Machado,

dedicada mãe.

“O real não está na saída e nem na chegada, ele se dispõe para a gente é no meio da travessia”

João Guimarães Rosa

*“Criar o que ainda não existe deve ser a pretensão de todo o sujeito que está vivo.
Não é no silêncio que os homens se fazem, mas na palavra, no trabalho,
na ação-reflexão”.*

Paulo Freire

Agradecimentos

“Olhe, tenho uma alma muito prolixa e uso poucas palavras.

Sou irritável e firo facilmente.

Também sou muito calmo e perdôo logo.

Não esqueço nunca.

Mas há poucas coisas de que eu me lembre”.

Clarice Lispector

Agradeço a Deus por guiar todos os meus passos.

À minha família, o apoio e o carinho nos momentos fáceis ou difíceis. À minha mãe Suely, pelo exemplo de coragem e determinação que sempre lembrarei como modelo.

Também expresso minha gratidão aos valiosos amigos que estiveram ou permanecem no Laboratório de Cronofarmacologia: Arianne Freitas, Camila Petrilli, Cecília Café, Daiane Gil Franco, Eliana Pereira, Erika Cecon, Kelly Lima, Mara Armelin, Marco Antônio Lapa, Marina Marçola e Renato Moraes. Em especial, Eduardo Tamura e Cláudia Emanuele Carvalho Sousa, amigos exemplares com quem aprendo a cada dia.

À Profa. Luciana Pinato, pelos conselhos e sua enorme generosidade. Sua colaboração inestimável será sempre lembrada. Obrigado pela presteza, por sua simpatia, amizade, e por estar sempre disposta a dedicar seu

(valioso) tempo a este trabalho! Aproveito e agradeço a Leila Campos e Vanderlei Rocha, amigos da Anatomia (ICB-USP) que estiveram sempre disponíveis para ajudar.

Ao Antônio Sérgio Pfleger de Almeida, valioso amigo.

Ao Alex Monteiro, Débora Moura e Sandra Muxel, sempre prestativos.

Ao Prof. Pedro Fernandes, pela oportunidade em estagiar durante o Curso de Inverno 2007, sob sua orientação e pela atenção em todos os momentos.

À Profa. Zulma Ferreira, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pela companhia na bancada e conselhos.

Às Professoras Lucile Floeter-Winter e Maria Christina Avellar, pelos ótimos momentos de discussão.

À orientadora Profa. Regina Pekelmann Markus, pela oportunidade e confiança, pela generosidade em compartilhar sua sabedoria e também, pelo cuidado ao longo destes anos. Serei eternamente grato.

Agradeço, por fim, o essencial apoio financeiro das agências de fomento FAPESP (07/07871-6 e 07/06444-7), CNPq e CAPES.

Sumário

I – INTRODUÇÃO.....	14
1. <i>Glândula pineal</i>	14
1.1 Componentes celulares da glândula pineal	15
1.2 Inervação simpática e vascularização	16
1.3 Controle circadiano da produção de melatonina	17
1.4 Considerações a respeito dos efeitos da melatonina	22
1.5 Eixo imune-pineal	24
2. <i>Fator de transcrição NFκB</i>	28
2.1 Família de proteínas IκB.....	30
2.2 Ativação da via NFκB.....	31
2.3 Desativação da via NFκB	32
3. <i>Lipopolissacarídeo (LPS)</i>	33
3.1 Sinalização intracelular ativada via TLR4	35
3.2 LPS como ativador do fator de transcrição NFκB.....	38
3.3 Considerações finais	41
II. OBJETIVOS	43
III. MATERIAL E MÉTODOS	45
1. <i>Animais</i>	45
2. <i>Drogas e Reagentes</i>	46
3. <i>Preparo de Drogas</i>	47
4. <i>Cultura de glândulas pineais</i>	48
5. <i>Cultura primária de pinealócitos</i>	48
6. <i>Tratamentos in vitro</i>	49
7. <i>Ensaio de imuno-histoquímica</i>	49
8. <i>Ensaio de imunocitoquímica por microscopia confocal</i>	52
9. <i>Extração de proteína nuclear</i>	54
10. <i>Ensaio de eletromobilidade por retardo em gel (EMSA)</i>	54
11. <i>Ensaio de super-shift</i>	57
12. <i>Dosagem de TNF</i>	58
13. <i>Determinação de indolaminas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)</i>	58

14. <i>Análise dos resultados</i>	59
IV. RESULTADOS	61
1. <i>Expressão constitutiva dos receptores TLR4 e CD14 na glândula pineal de ratos</i>	61
2. <i>Expressão constitutiva dos receptores TLR4 e CD14 em pinealócitos de ratos</i>	64
3. <i>LPS ativa a translocação nuclear do NFκB em glândulas pineais de rato em cultura</i>	65
3.1 <i>Decurso temporal da translocação nuclear do NFκB induzido por LPS</i>	65
3.2 <i>Identificação das subunidades de NFκB ativadas por LPS em pineais de rato</i>	67
4. <i>LPS induz a produção da citocina TNF em glândulas pineais de rato em cultura</i>	69
4.1 <i>Decurso temporal da produção de TNF induzido por LPS</i>	69
4.2 <i>Participação do NFκB na produção de TNF induzido por LPS</i>	71
5. <i>LPS modula a expressão do receptor TNFR1 em pinealócitos</i>	72
6. <i>Efeitos do LPS sobre os produtos da via biossintética de melatonina</i>	74
V. DISCUSSÃO	77
<i>Ativação do NFκB</i>	80
<i>Modulação da sinalização TNF/TNFR1</i>	83
<i>Modulação dos produtos da via biossintética de melatonina</i>	85
VI. CONCLUSÕES	91
VII. RESUMO	93
VIII. ABSTRACT	94
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
XX. SÚMULA CURRICULAR	124

Lista de Abreviaturas

5-HT	serotonina
5-HTP	5-hidroxitriptofano
AAAD	enzima descarboxilase de aminoácidos aromáticos
AA-NAT	enzima arilalquilamina N-acetiltransferase
AC	enzima adenilil ciclase
ALLN	N-acetil-leu-leu-norleucinal
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico
AP-1	proteína ativadora 1
ATP	adenosina trifosfato
BCG	Bacilo Calmette-Guerin
CD14	<i>cluster differentiation 14</i>
COX	ciclooxigenase
CRE	elemento responsivo a AMPc
CREB	proteína de ligação ao elemento responsivo a AMPc
DAB	3, 3'-diaminobenzidina
DAMP	<i>danger-associated molecular pattern</i>
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol
EMSA	ensaio de eletromobilidade em gel
GABA	ácido gama-aminobutírico
GCS	gânglio cervical superior
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> , marcador de astrócitos
GR	receptor de glicocorticóide
HIOMT	enzima hidroxindol-O-metiltransferase

HMGB-1	<i>high-mobility group Box 1</i>
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
HSP	<i>heat shock protein</i>
ICAM	<i>intercelular adhesion molecule</i>
IFN-γ	interferon gama
IKB	proteína inibitória <i>kappa</i> B
IKK	proteína quinase de IKB
IL	interleucina
iNOS	sintase de óxido nítrico induzível
IP₃	inositol trifosfato
IRAK	<i>IL-1 receptor-associated kinase</i>
IRF3	<i>interferon regulatory factor 3</i>
LBP	proteína ligante de LPS
LPS	lipopolissacarídeo
MAL	<i>MyD88-adaptor-like</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEL	melatonina
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NA	noradrenalina
NAS	N-acetilserotonina
NEMO	modulador essencial de NFkB
NFkB	fator nuclear <i>kappa</i> B
NSL	sequência de localização celular
NSQ	núcleos supraquiasmáticos
PACAP	peptídeo ativador de adenilil ciclase na pituitária
PAMP	padrões moleculares associados à patógenos
PBS	tampão fosfato-alcalino

PDTC	pirrolidinaditiocarbamato
PKA	proteína quinase dependente de AMPc
PKC	proteína quinase dependente de cálcio
PLC	fosfolipase C
pM, nM, μM	picomolar, nanomolar e micromolar, respectivamente
PVN	núcleos paraventriculares
RHD	domínio de homologia <i>Rel</i>
RIP1	<i>receptor-interacting protein 1</i>
SARM	<i>sterile α and HEAT-Armadillo motifs-containing protein</i>
SNC	sistema nervoso central
SP1	<i>specificity protein 1</i>
TACE	<i>TNF alpha converting enzyme</i>
TAD	domínio de transativação
TAK1	<i>transforming growth factor-β-activated kinase</i>
TGF-β	fator de crescimento transformador beta
TIR	domínio <i>Toll-interleukin-1 receptor</i>
TIRAP	<i>TIR domain-containing adaptor protein</i>
TLR4	receptor do tipo <i>toll 4</i>
TNF	fator de necrose tumoral
TNFR	receptor de TNF
TPOH	triptofano hidroxilase
TRAF	<i>TNF receptor-associated factor</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β</i>
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
μm	micrômetro

Introdução

I – INTRODUÇÃO

1. *Glândula pineal*

A glândula pineal foi descrita há mais de 2000 anos por Galeno, baseado nas observações realizadas pelo anatomista Herophilus. Galeno introduziu o termo *conarium*, em latim, para denominar a pineal, pois em humanos o formato desta glândula é semelhante ao de uma pinha. No século XVI, Vesalius realizou uma elaborada descrição topográfica da glândula, que nesta época era denominada *epiphysis cerebri*. No século XVII, Descartes considerou a glândula pineal como a “sede da alma” (revisto por Erlich e Apuzzo, 1985). No final do século XIX e início do século XX, uma série de trabalhos comparativos realizados em répteis (Osborn, 1887a,b; Macloskie, 1887; Turner, 1888) e em mamíferos (Sisson e Finney, 1920; Brown et al., 1925; Cooper, 1932) foram publicados a respeito dos aspectos anatômicos, histológicos e embrionários da glândula pineal.

Em 1958, um avanço importante nos estudos sobre a glândula pineal ocorreu quando Aaron Lerner isolou e caracterizou uma substância presente em extratos de pineais de bovinos capaz de clarear a pele de anfíbios (Lerner et al., 1958) por promover agregação de melanóforos (Lerner et al., 1959). A essa substância, Lerner denominou melatonina, do grego “*melas*” que significa cor preta e “*tosos*” que significa tarefa, função (revisto por Erlich e Apuzzo, 1985). Desde então, estudos sucessivos demonstraram a importância do fotoperíodo ambiental no controle da função da glândula, a

via bioquímica de produção de melatonina e os efeitos pleiotrópicos da pineal no controle das funções e dos ritmos endógenos do organismo.

1.1 Componentes celulares da glândula pineal

A glândula pineal é uma estrutura única que se desenvolve durante o início do segundo mês de vida embrionária (Quay, 1970) e está localizada no plano mediano entre as comissuras habenular e posterior em praticamente todos os mamíferos (revisto por Simonneaux e Ribelayga, 2003). Em roedores, a pineal migrou no sentido dorso-caudal e está dividida morfológicamente em uma porção superficial e outra profunda, conectadas por uma haste denominada *pineal stalk*, ou pedúnculo pineal (Møller e Baeres, 2002; revisto por Simonneaux e Ribelayga, 2003).

Os componentes celulares da pineal em roedores e humanos são semelhantes. No parênquima da glândula são encontrados pinealócitos, células intersticiais compostas pelas células da glia: astrócitos, microglia, oligodendrócitos e células de Schwann (Møller et al., 2002); células endoteliais, fagócitos perivasculares (Reiter, 1981; Pedersen et al., 1993; Sato et al., 1996) e neurônios (Schröder et al., 1990).

Os pinealócitos são as células mais abundantes na pineal e encontram-se distribuídos em todo o parênquima na proporção de aproximadamente 90% do total de células (Karasek e Reiter, 1992). Estas células apresentam alta atividade neuroendócrina e são responsáveis por sintetizar melatonina.

A microglia e os astrócitos são as principais células da glia presentes na glândula (Karasek e Reiter, 1992). Os astrócitos foram caracterizados quanto à sua imunorreatividade positiva para GFAP (Møller et al., 1978; Papasozomenos, 1983; Higley et al., 1984; Huang et al., 1984; Pedersen et al., 1997; Kaur et al., 2005) e a microglia quanto à sua imunorreatividade positiva para ED-1 (Pedersen et al., 1997; Tsai e McNulty, 1997; Jiang-Shieh et al., 2003; Jiang-Shieh et al., 2005), OX-42 (Pedersen et al., 1997; Tsai e McNulty, 1997; Jiang-Shieh et al., 2003; Jiang-Shieh et al., 2005; Kaur et al., 2005) e OX-6 (Pedersen et al., 1997; Jiang-Shieh et al., 2003). Estas células apresentam uma localização particular: a microglia está distribuída por todo o parênquima da glândula entre os pinealócitos, enquanto os astrócitos se localizam preferencialmente nas regiões próximas ao pedúnculo pineal (Luo et al., 1984; Jiang-Shieh et al., 2003).

1.2 Inervação simpática e vascularização

A principal inervação da pineal é proveniente de fibras pós-ganglionares simpáticas (Kappers, 1960; Reuss, 1999) que promovem liberação de noradrenalina (Wurtman et al., 1967; Drijfhout et al., 1996) e ATP (Mortani-Barbosa et al., 2000) durante a fase de escuro. Os terminais pré-sinápticos destas fibras estão situados muito próximos aos pinealócitos (Erlich e Apuzzo, 1985) e, deste modo, a liberação de noradrenalina ocorre diretamente sobre as células produtoras de melatonina. Também estão presentes inervações de outras áreas encefálicas e de gânglios periféricos, que liberam PACAP (do inglês, *pituitary adenylate cyclase-activating peptide*),

neuropeptídeo Y, ácido gama-aminobutírico (GABA), peptídeo vasointestinal, peptídeos opióides, acetilcolina e substância P (Møller et al., 1996; revisto por Møller e Baeres, 2002).

Através de pequenas ramificações arteriolares que formam uma rede de capilares fenestrados que permeia para o interior do órgão, a glândula pineal recebe elevado suprimento sanguíneo (Matsushima e Reiter, 1975; Villegas, 2004). Nos espaços perivasculares os astrócitos formam uma extensa rede intersticial de fibras entre o sistema vascular e as células do parênquima da glândula (Papasozomenos, 1983). Neste ponto é importante mencionar que a glândula pineal é um órgão circunventricular e, portanto, situada fora da barreira hematoencefálica (revisto por Reiter, 1981; Møller e Baeres, 2002; Villegas, 2004; Duvernoy e Risold, 2007). Esta posição faz com que a glândula pineal possa ser um órgão sensor de moléculas circulantes.

1.3 Controle circadiano da produção de melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um dos mais bem compreendidos sinais gerados pelo sistema de temporização interna do organismo, que tem como principal controlador o relógio biológico central localizado nos núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo (NSQ), que é sincronizado ao ciclo de claro/escuro ambiental a partir de uma comunicação neural direta com a retina (revisto por Reppert e Weaver, 2002).

O fotopigmento melanopsina presente em células ganglionares retinianas percebe a informação de luminosidade ambiental, converte-a em

sinalização elétrica e a projeta via trato retinohipotalâmico aos NSQ, sincronizando este relógio ao meio externo (Provencio et al., 2000). Durante a fase de claro, os NSQ liberam o neurotransmissor inibitório GABA via projeções diretas aos núcleos paraventriculares do hipotálamo (PVN, do inglês, *paraventricular nucleus*) inibindo esta via neural (Kalsbeek et al., 2000, 2006). Na fase de escuro, o PVN é ativado a partir dos NSQ por uma via glutamatérgica que promove ativação de uma via polineural à coluna intermediolateral da medula espinal (Teclemariam-Mesbah et al., 1999). Do gânglio cervical superior (GCS) são emitidas fibras pós-ganglionares simpáticas que inervam diretamente a glândula pineal, liberando noradrenalina (Wurtman et al., 1967; Drijfhout et al., 1996) e ATP (Mortani-Barbosa et al., 2000) durante a fase de escuro.

A noradrenalina atua em receptores β_1 -adrenérgicos presentes na membrana de pinealócitos. Estes receptores são expressos em alta densidade na glândula pineal (Harmouch et al., 1994) e apresentam variação rítmica ao longo das 24 horas do dia, com maior expressão durante a fase de escuro (revisto por Pangerl et al., 1990).

Na figura 1, está ilustrada a via de síntese de melatonina e poderá ser acompanhada com a descrição no texto a seguir.

Fig. 1. Via de síntese de melatonina: A noradrenalina (NA) liberada na fase de escuro pelas fibras pós-ganglionares simpáticas interage com receptores de sete domínios transmembrânicos do tipo $\beta 1$ -adrenérgicos. Estes receptores são acoplados à proteína Gs e ativam a adenilil ciclase (AC) promovendo aumento do segundo mensageiro AMPc que, por sua vez, ativa a quinase PKA. A PKA atua fosforilando o fator CREB, permitindo a transcrição da enzima AA-NAT. A PKA ainda fosforila a AA-NAT permitindo sua ligação à chaperona 14-3-3, o que a protege de degradação. NA atuando em receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos, ou ATP atuando em receptores purinérgicos P2Y1 potenciam a transcrição da AA-NAT via PKC ativada pelo aumento intracelular de Ca^{2+} . A cascata de síntese de melatonina se inicia com o metabolismo de triptofano para formar 5-HT que é substrato para ação direta da enzima AA-NAT para formar NAS, que por sua vez é metilada em melatonina pela enzima HIOMT. A melatonina é liberada na circulação e no líquido cefalorraquidiano rapidamente, à medida que é sintetizada (Baseado em Ganguly et al., 2002; Simonneaux e Ribelayga, 2003).

A resposta da ativação dos receptores β_1 -adrenérgicos é transduzida através da ativação da proteína G estimulatória (Gs), ativação da enzima adenilil ciclase (AC) e formação do segundo mensageiro monofosfato de adenosina cíclico (AMPC). Estudos *in vitro* demonstraram que a atuação de noradrenalina em adrenoceptores α_1 (Klein et al., 1983) e de ATP em receptores purinérgicos P2Y1 (Ferreira et al., 1994; Mortani-Barbosa et al., 2000; Ferreira e Markus, 2001) potenciam a formação de melatonina devido uma comunicação cruzada entre as vias, pois promovem aumento adicional do segundo mensageiro AMPC via ativação da proteína quinase dependente de Ca^{2+} (PKC), decorrente do aumento intracelular de Ca^{2+} via inositol trifosfato (IP_3) (Sugden et al., 1987; Ho et al., 1988; White e Klein, 1993; Ferreira et al., 2003).

A síntese de melatonina se inicia com a captação ativa do aminoácido triptofano da circulação (Reiter, 1991). Este precursor é então hidroxilado e depois descarboxilado para formar serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) pelas enzimas triptofano hidroxilase 1 (Sugden, 2003) e pela descarboxilase de aminoácido aromático (AAAD), respectivamente (Axelrod et al., 1969). O conteúdo de 5-HT na glândula pineal é encontrado em altas concentrações durante a fase de claro, enquanto baixas ou em alguns casos concentrações não detectáveis de melatonina são encontradas nesta fase (King et al., 1984; Míguez et al., 1998). Na fase de escuro observa-se o inverso, ou seja, queda do conteúdo de 5-HT e aumento do conteúdo de melatonina (Mefford et al., 1983).

A relação recíproca entre os ritmos de 5-HT e melatonina foram provenientes da observação de que 5-HT é um precursor que sofre ação

enzimática direta da arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT) para formar N-acetilserotonina (NAS). Em ratos, a disponibilidade protéica da enzima AA-NAT apresenta ritmo circadiano evidente devido ao aumento em cerca de 100 a 150 vezes dos níveis de RNAm na fase de escuro (Klein et al., 1970; Roseboom et al., 1996; Ribelayga et al., 1998; Klein, 1999). Deste modo, a enzima AA-NAT é considerada como chave no processo de síntese de melatonina, que tem como enzima limitante, a hidróxi-indol-O-metiltransferase (HIOMT), que atua metilando o precursor NAS para formar melatonina (revisto por Simonneaux e Ribelayga, 2003). Em relação à expressão circadiana dessa enzima, estudos apresentam resultados divergentes, demonstrando discreto aumento durante o escuro, ou mesmo ausência de ritmo circadiano (Gauer e Craft, 1996; Ribelayga et al., 1997, 1998).

Em mamíferos, a regulação da síntese de melatonina pode ser realizada em níveis transcricional ou traducional, dependendo da espécie. Em roedores, esta regulação ocorre com a ativação da transcrição da enzima AA-NAT durante a fase de escuro (Maronde et al., 1999; Stehle et al., 2001) devido ao aumento nos níveis de AMPc (Deguchi e Axelrod, 1972; Parfitt et al., 1976; Roseboom et al., 1996) que promove a ativação da proteína quinase A (PKA) do tipo II (Maronde et al., 1999) que tem duas funções: fosforilar o fator de transcrição CREB (do inglês, *cAMP responsive element binding protein*) e fosforilar a enzima AA-NAT. A interação de pCREB diretamente ao sítio CRE (do inglês, *cAMP-responsive element*) no promotor do gene da enzima AA-NAT inicia sua transcrição (Roseboom et al., 1996; Baler et al., 1997; Koch et al., 2003; Schomerus et al., 2003), enquanto que a

fosforilação da AA-NAT favorece sua ligação com a chaperona 14-3-3, impedindo sua degradação por proteassoma (Gastel et al., 1998; Ganguly et al., 2001, 2002; Terriff et al., 2005).

Em humanos e ungulados (ovinos e bovinos), o RNAm da AA-NAT é transcrito de maneira constitutiva (Coon et al., 1995, Schomerus et al., 2000; Johnston et al., 2004) e a ativação adrenérgica atua protegendo a enzima AA-NAT de degradação pelo mecanismo descrito acima (Coon et al., 2002).

A melatonina é uma molécula altamente lipofílica e difunde para fora do pinealócito à medida que é sintetizada. No plasma é encontrada na faixa de 100 pM na fase de escuro (Reiter, 1991). A circulação sanguínea e o líquido cefalorraquidiano são as principais vias de liberação deste hormônio, uma vez que, a glândula é altamente vascularizada (Matsushima e Reiter, 1975) e está em contato com o terceiro ventrículo (Tricoire et al., 2003).

1.4 Considerações a respeito dos efeitos da melatonina

Desde sua descoberta, a melatonina vem sendo descrita como um agente regulador dos processos relacionados à ritmicidade circadiana (Carrilo-Vico et al., 2005a; Markus et al., 2007, 2010; Reiter et al., 2010). Não faz parte do escopo desta dissertação aprofundar nos efeitos da melatonina em condições fisiológicas ou fisiopatológicas do organismo. No entanto, algumas considerações merecem espaço.

A melatonina atua em receptores próprios acoplados à proteína G localizados na membrana celular (revisto por Pandi-Perumal et al., 2008;

Dubocovich et al., 2010) ou por mecanismos independentes de receptores. Seu papel chave na sincronização dos eventos rítmicos do organismo ao ciclo claro/escuro ambiental compõe um de seus efeitos mais estudados (revisto por Pandi-Perumal et al., 2006; Touitou e Bogdan, 2007; Reiter et al., 2007; Reiter et al., 2009; Arendt, 2009; Zawilska et al., 2009; Srinivasan et al., 2010). Neste ponto, é preciso mencionar que os efeitos cronobióticos da melatonina ocorrem na faixa de concentração correspondente ao encontrado no plasma e no líquido cefalorraquidiano durante a fase de escuro (pM a nM).

Por outro lado, a melatonina pode ainda interferir em mecanismos celulares como: redução do estresse oxidativo (Beni et al., 2003; Tamura et al., 2006; Silva et al., 2007; revisto por Tan et al., 2007; revisto por Kaur e Ling, 2008; revisto por Reiter et al., 2008, 2009), modulação da interação Ca^{2+} -calmodulina (Benitez-King et al., 1993), inibição da translocação nuclear de fatores de transcrição (Gilad et al., 1998; Beni et al., 2003; Huang et al., 2008; Tamura et al., 2009; Li et al., 2009; Cecon et al., 2010), entre outros. Estes efeitos são observados na faixa de μM a mM e, inicialmente, foram considerados como efeitos farmacológicos da melatonina. No entanto, diversos trabalhos vêm demonstrando que esta indolamina pode ser produzida localmente nesta faixa de concentração (revisto por Markus et al., 2007), como no trato gastrointestinal (Bubenik, 2002; Konturek et al., 2007), retina (Zmijewski et al., 2009), pele (Slominski et al., 1996, 2002), células imunocompetentes (Carrilo-Vico et al., 2004; Lardone et al., 2006; Pontes et al., 2006, 2007; Gómez-Corvera et al., 2009; Maldonado et al., 2010), cérebro (Jimenez-Jorge et al., 2007) e em outros órgãos (Stefulj et al., 2001;

Naranjo et al., 2007; Sanchez-Hidalgo et al., 2009). Essa produção extra-pineal de melatonina pode ser classificada como constitutiva (retina, trato gastrointestinal) ou induzida (células imunocompetentes). No caso da produção constitutiva, esta ainda pode ser rítmica (retina) ou não (trato gastrointestinal). No entanto, a variação rítmica de melatonina na circulação é proveniente apenas da produção pineal, visto que esta não ocorre após pinealectomia (revisto por Reiter et al., 1973).

1.5 Eixo imune-pineal

O eixo imune-pineal é uma proposta que surge como uma nova abordagem da interação entre o sistema imunológico e a organização temporal interna, propondo que os dois sistemas são capazes de uma comunicação recíproca. A supressão da produção de melatonina na glândula pineal mediada por moléculas que sinalizam, ou que promovem a montagem da resposta inflamatória, seria um fator facilitador da migração de leucócitos. Após migrarem, estas células passariam a produzir melatonina no local do processo inflamatório. Uma vez que a síntese extra-pineal de melatonina pode atingir altas concentrações nos locais de produção, esta indolamina seria capaz de exercer seus efeitos antioxidantes/anti-inflamatórios, contribuindo com a fase de recuperação da resposta inflamatória. Além disso, o aumento de glicocorticóides circulantes após a fase de recuperação seria um sinal positivo que contribuiria para o retorno da síntese de melatonina pela glândula pineal (Markus et al., 2007). Os

dados da literatura que possibilitaram a elaboração desta hipótese serão apresentados a seguir.

Inicialmente, foi demonstrado que a melatonina produzida pela glândula pineal impunha um ritmo no tamanho da lesão granulomatosa induzida pelo Bacilo Calmette-Guerin (BCG) injetado em patas de camundongos. O ritmo da lesão (menor à noite e maior durante o dia) era perdido após pinealectomia e restaurado por administração noturna de melatonina (Lopes et al., 1997). Neste trabalho também foi realizada adrenalectomia química e cirúrgica com o intuito de verificar o efeito do glicocorticóide endógeno (Lopes et al., 2001). A falta de glicocorticóide levava à perda do ritmo da lesão granulomatosa, que era restaurado após a administração noturna de melatonina (Lopes et al., 2001). Na mesma oportunidade ficou demonstrado que a excreção rítmica do principal metabólito da melatonina, 6-sulfatoximelatonina, era perdida após adrenalectomia (Lopes et al., 2001). Estes dados abriram a possibilidade do entendimento de uma interação entre as glândulas adrenal e pineal. Nos anos seguintes, esta hipótese foi confirmada com a demonstração de que a glândula pineal expressa receptores para glicocorticóides (GR) e que corticosterona potencia a produção de melatonina *in vitro* (Ferreira et al., 2005) e *in vivo* (Fernandes et al., 2009).

A melatonina em concentrações compatíveis com as encontradas no plasma durante a fase de escuro também possui efeito inibitório sobre a transmigração de leucócitos à camada endotelial, reduzindo em cerca de 50% o rolamento e a aderência destas células (Lotufo et al., 2001). Ao considerarmos que a vigilância do combate às infecções é realizada por estas

células, não seria interessante a presença de melatonina circulante e o consequente impedimento de sua migração quando houvesse a necessidade de se montar uma resposta inflamatória. Os resultados obtidos neste trabalho permitiram sugerir que a glândula pineal, além de reconhecer glicocorticóides, deveria ser sinalizada por moléculas que participam da montagem da resposta inflamatória.

De fato, experimentos *in vitro* demonstraram que a citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral (TNF), uma das primeiras citocinas a serem produzidas na montagem do processo inflamatório, inibe a produção de NAS induzida por noradrenalina devido a supressão da transcrição do gene da enzima AA-NAT (Fernandes et al., 2006). Estudos em humanos demonstraram que puérperas com mastite (uma inflamação não infecciosa da glândula mamária) apresentam baixos níveis de melatonina e altos níveis de TNF no colostro. Em contrapartida, puérperas saudáveis que não apresentam TNF possuíam o ritmo circadiano característico de melatonina (Pontes et al., 2006, 2007).

Além do TNF, outras citocinas já foram descritas como moduladoras da função da glândula pineal. Em estudos *in vitro*, foi observado que interferon-gama (IFN- γ) tem efeito dual sobre a produção de melatonina, potenciando ou inibindo a síntese desta indolamina na dependência das concentrações utilizadas (Withyachumnarnkul et al., 1990; 1991). Foi evidenciado ainda que o RNAm de interleucina 1-beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e do fator de crescimento transformador beta (TGF- β) são transcritos constitutivamente na glândula pineal de ratos, com maior transcrição durante a fase de claro e predominantemente em astrócitos e microglia (Tsai

e McNulty, 1999; Tsai et al., 2001a). Estes autores também observaram que estas citocinas modulam a produção de 5-HT na glândula por atuação direta sobre os pinealócitos ou microglia (Tsai et al., 2001b).

Dados da literatura demonstram ainda, anormalidades na produção rítmica de melatonina em pacientes com infecção local ou sistêmica (Mundigler et al., 2002; Olofsson et al., 2004; Perras et al., 2006). Em estudo *in vivo*, Jiang-Shieh e colaboradores (2005) avaliaram os efeitos do lipopolissacarídeo (LPS) administrado via intravenosa sobre a glândula pineal de ratos e observaram que esta endotoxina atravessa a camada endotelial da glândula e se acumula em todas as células promovendo ativação das células da glia. Com relação aos efeitos sobre os pinealócitos, estes autores sugeriram que LPS aumenta a produção de 5-HT. No entanto, propuseram os possíveis mecanismos de ação do LPS sobre a glândula. Esses estudos permitiram sugerir que a glândula pineal também deveria reconhecer componentes bacterianos. Na presente dissertação, temos como principal objetivo avaliar se a produção de melatonina é modulada por LPS, bem como os possíveis mecanismos que promovem esta inibição.

O mecanismo pelo qual TNF e corticosterona modulam a produção de melatonina na glândula pineal envolve a participação do fator de transcrição NF κ B. A ativação desta via por TNF bloqueia, enquanto que a inibição desta via por corticosterona potencia a síntese de melatonina induzida por noradrenalina em cultura de glândulas pineais de rato (Ferreira et al., 2005; Fernandes et al., 2006; Fernandes, 2009). O fator de transcrição NF κ B está constitutivamente presente no núcleo de células da glândula pineal na forma de homodímeros p50/p50, e apresenta variação circadiana, com máximo

acúmulo nuclear no final da fase de claro, e rápida redução após o apagar das luzes (Cecon et al., 2010). Mais detalhes a respeito deste fator de transcrição serão apresentados a seguir.

2. Fator de transcrição NFκB

O fator de transcrição NFκB é um importante regulador de processos fisiológicos e fisiopatológicos (Kaltschmidt e Kaltschmidt 2000; revisto por Kumar et al., 2004; revisto por Kaltschmidt et al., 2005; Wong e Tergaonkar, 2009) como as respostas imunes inata e adquirida, os processos de proliferação celular (Bhakar et al., 2002; Bonizzi e Karin, 2004; Graham e Gibson, 2005), morte celular (Ruland e Mak, 2003; Sun e Ley, 2008), neuroproteção e neurodegeneração (Grilli et al., 1996; O'Neill e Kaltschmidt, 1997; Bhakar et al., 2002; Fridmacher et al., 2003).

As proteínas da família NFκB (também denominada como família Rel) formam homodímeros ou heterodímeros por combinação de suas cinco proteínas: p50 (ou NFκB1), p52 (ou NFκB2), RelA (ou p65), c-Rel e RelB (Karin e Ben-Neriah, 2000; Vallabhapurapu e Karin, 2009). As duas primeiras são formadas a partir da clivagem de precursores maiores, conhecidos como p105 e p100, respectivamente (Ghosh e Hayden, 2008).

Essas proteínas possuem um domínio de homologia Rel (RHD, do inglês, *Rel homology domain*) que possui a sequência de localização nuclear (NSL) que permite a entrada destas proteínas no núcleo da célula e sua interação com o DNA, principalmente através de seu domínio N-terminal. O

RHD também contém os sítios de ligação para as proteínas inibitórias IKB (também denominadas como NFKBI) responsáveis por manter os dímeros de NFKB inativos no citoplasma da célula; e os sítios que permitem a dimerização das proteínas da família NFKB entre si (revisto por Baeuerle, 1998; revisto por Chen e Greene, 2004; Natoli et al., 2005).

Dependendo do tipo celular e de seu estado de diferenciação a presença de cada subunidade de NFKB pode variar. As subunidades RelA e p50 estão presentes em praticamente todos os tecidos (Vallabhapurapu e Karin, 2009) enquanto c-Rel, RelB e p52 estão presentes principalmente em células hematopoiéticas (revisto por Liou e Hsia, 2003).

Uma característica comum a todas as subunidades da família NFKB é sua habilidade de ligação aos sítios *kappa* B presentes no promotor dos genes alvo, uma sequência consenso definida como GGGRNYYYCC, onde R é uma base purina, N é qualquer base e Y é uma base pirimidina (Chen e Greene, 2004).

Outra característica importante das subunidades da família NFKB é a presença do domínio de transativação (TAD, do inglês, *transcription activation domain*). As subunidades RelA, RelB e c-Rel possuem este domínio e sua ativação regula positivamente a transcrição de uma grande variedade de genes, como os de enzimas (sintase de óxido nítrico induzida, iNOS; ciclooxigenase, COX), citocinas e quimiocinas (como TNF, IL-1 β , IL-6, IL-2, IL-12, IL-8), moléculas de adesão (*vascular cell adhesion molecule*, VCAM, *intercelular adhesion molecule*, ICAM), entre outras (Müller e Harrison, 1995; revisto por Bonizzi e Karin, 2004; revisto por O'Neill e Bowie, 2007). As subunidades p50 e p52 não apresentam TAD (Vallabhapurapu e Karin,

2009) e, portanto, homo ou heterodímeros formados por p50 ou p52 são considerados repressores da transcrição gênica (revisto por Sun e Ley, 2008). Para que estas subunidades apresentem atividade transcricional positiva elas precisam interagir com cofatores como a proteína BCL-3 ou com as subunidades de NF κ B que possuem TAD (revisto por Lenardo e Siebenlist, 1994; Carlotti et al., 2000; revisto por Palmer e Chen, 2008).

2.1 Família de proteínas I κ B

Os processos de ativação ou repressão da atividade transcricional mediados pelo NF κ B são temporalmente regulados principalmente por ação das proteínas inibitórias da família I κ B (Hoffmann e Baltimore, 2006; Klinke et al., 2008; Natoli e Chiocca, 2008), responsáveis por manter os dímeros de NF κ B no citoplasma ou por regular a função destes dímeros no núcleo da célula (Wan e Lenardo, 2010).

As I κ Bs são caracterizadas pela presença de múltiplas repetições de anquirinas e esta família é composta por nove membros. As I κ Bs **clássicas** (I κ B-alfa, I κ B-beta e I κ B-épsilon) atuam no citoplasma mantendo os dímeros de NF κ B inativos. I κ B-alfa, a proteína inibitória mais bem estudada, liga-se preferencialmente ao heterodímero p50/RelA, enquanto que I κ B-épsilon regula preferencialmente homodímeros RelA/RelA ou heterodímeros c-Rel/RelA (revisto por Ferreira e Komives, 2010). As I κ Bs classificadas como **precursoras** de subunidades de NF κ B (p100, p105 e I κ B-gama) também atuam no citoplasma ligadas a uma proteína da família NF κ B e ao serem clivadas em uma subunidade p50 ou p52 formam dímeros que se

translocam ao núcleo (revisto por Beinke e Ley, 2004). A IKB-gama é classificada desta forma, pois é produto de *splicing* alternativo do RNAm de p105 (Bonizzi e Karin, 2004). O terceiro grupo de proteínas inibitórias corresponde às **atípicas** (IKB-zeta, IKBNS e BCL-3, do inglês, *B cell lymphoma 3*). Essas proteínas estão envolvidas nos processos de coativação da transcrição gênica junto aos homodímeros que não possuem TAD. A IKB-zeta é expressa apenas por indução em resposta ao LPS e estudos sugerem que esta proteína potencia a atividade transcricional de forma semelhante à BCL-3 (Yamamoto et al., 2004; Viatour et al., 2005). A IKBNS, por sua vez, tem sido sugerida como finalizador da sinalização do NFkB de maneira gene-específica (revisto por Kawai e Akira, 2007; revisto por Vallabhapurapu e Karin, 2009). Estas proteínas são classificadas como atípicas, pois apesar de possuírem as repetições de anquirinas, característica desta família de proteínas, atuam principalmente no núcleo da célula e não no citoplasma (Bonizzi e Karin, 2004).

2.2 Ativação da via NFkB

As IKBs são peças fundamentais na ativação do NFkB. Em resposta a diferentes estímulos, por exemplo, TNF ou LPS, múltiplas vias de sinalização intracelular convergem para fosforilar o complexo de quinases IKK (do inglês, *IKB kinases*). A forma mais comum deste complexo consiste em duas quinases catalisadoras: IKK1 (ou alfa) e IKK2 (ou beta) e da quinase reguladora NEMO (do inglês, *NFkB essential modulator*). Após estímulo o complexo de IKKs fosforila as IKBs em aminoácidos específicos para sinalizar

que seja degradada por proteassoma (Neumann e Naumann, 2007). Este é o mecanismo de ativação da **via clássica** de sinalização do NFkB, a mais estudada e caracterizada pela ativação dos dímeros p50/RelA ou c-Rel/RelA. A **via alternativa** de sinalização do NFkB por sua vez, envolve a ativação de IKK1 que atua fosforilando a p100 para promover seu processamento em uma forma clivada (p52), que se transloca ao núcleo sob a forma de heterodímero p52/RelB. Há ainda a **via atípica**, onde p105 atua como proteína inibitória no citoplasma. Na presença de estímulo, IKK1 sinaliza p105 para degradação por proteassoma, permitindo translocação nuclear de homodímeros p50/p50 (revisto por Sun e Ley, 2008).

2.3 Desativação da via NFkB

A apropriada finalização da atividade transcricional do NFkB é necessária para a manutenção dos dímeros deste fator em estado inativo e para que a célula se mantenha responsiva aos estímulos subsequentes (Wan e Lenardo, 2010). É interessante notar que a desativação da via NFkB é iniciada tão logo a indução da atividade transcricional desta via se inicia e ocorre num retardo temporal característico que, ainda assim, permite uma total função nuclear do NFkB (Nelson et al., 2002; revisto por Renner e Schmitz, 2009). Esta finalização é orquestrada principalmente pelo retorno dos dímeros de NFkB ao citoplasma através de alças de retroalimentação negativa que envolve a ressíntese das proteínas IKBs (Karin e Bem-Neriah, 2000). Embora as proteínas inibitórias IKB-alfa e IKB-beta possuam a habilidade de migrar ao núcleo e reprimir a ligação do NFkB ao DNA

(Carlotti et al., 2000; Malek et al., 2001) apenas a IKB-alfa participa do processo de exportação nuclear do NFkB de maneira eficiente (Huang et al., 2000; Huang e Miyamoto, 2001; Malek et al., 2001).

A função nuclear dos dímeros de NFkB pode ser regulada ainda por mecanismos independentes das proteínas IKB (revisto por Sun e Ley, 2008). As subunidades de NFkB podem ser fosforiladas, acetiladas ou ubiquitinadas em aminoácidos específicos e estes processos ocorrem no núcleo da célula resultando em mudanças funcionais nestas proteínas (Quivy e Lint, 2004; Natoli et al., 2005; Neumann e Naumann, 2007). Outro mecanismo alternativo de regulação das proteínas NFkB é decorrente da interação dos dímeros de NFkB com outras proteínas/fatores de transcrição, como AP-1 (do inglês, *activator protein 1*), SP1 (do inglês, *specificity protein 1*) e GR (revisto por Neumann e Naumann, 2007).

3. Lipopolissacarídeo (LPS)

O LPS é o principal componente da membrana de bactérias gram-negativas e um potente ativador da resposta imune inata. Esta endotoxina é uma molécula anfifílica, composta por uma fração lipídica (lipídio A), e outras formadas por um núcleo e uma cadeia lateral polissacarídica (Lu et al., 2008), sendo o lipídio A a porção ativa do LPS (Sassi et al., 2009).

A ativação celular induzida por LPS envolve a participação de diversas proteínas: LBP (do inglês, *lipopolysaccharide binding protein*), uma proteína produzida no fígado e que é encontrada solúvel no plasma, os co-receptores

MD-2 e CD14 (do inglês, *cluster differentiation 14*) e o receptor TLR4 (do inglês, *Toll-like receptor 4*).

A etapa inicial de reconhecimento do LPS envolve sua interação com a proteína LBP. Esta interação permite o transporte do LPS para a superfície das células e sua transferência para o co-receptor CD14 (Tobias et al., 1995). A presença desta proteína ligante aumenta em cerca de 100 a 1000 vezes a interação do LPS com CD14. No entanto, esta endotoxina pode interagir diretamente com este co-receptor (revisto por Arroyo-Espliguero et al., 2004).

Em 1990, a proteína CD14 foi identificada na membrana de monócitos ancorada à GPI (do inglês, *glycosylphosphatidylinositol*) e, como não possui domínios transmembrana, não ativa diretamente a sinalização intracelular (Wright et al., 1990; revisto por Beutler, 2000; revisto por Triantafilou e Triantafilou, 2002). Portanto, é necessário que LPS atue via receptor transmembrana para ativar suas cascatas de sinalização intracelular (Kawai e Akira, 2007; revisto por Arroyo-Espliguero et al., 2004), papel desempenhado pelo receptor TLR4 (do inglês, *toll-like receptor*) e que envolve o co-receptor CD14 como uma proteína de trânsito do LPS (Chow et al., 1999; Hoshino et al., 1999).

O receptor TLR4 é uma proteína cuja arquitetura compreende um domínio extracelular rico em repetições de leucina e um domínio intracelular responsável pelo recrutamento de adaptadores presentes no citoplasma da célula (revisto por Huyton et al., 2007). Embora a ativação de vias intracelulares de sinalização possa ser realizada pelo receptor TLR4 sob a forma monomérica, a interação do LPS com o complexo de receptores TLR4/MD-2 promove a ativação de maneira mais eficiente (Shimazu et al.,

1999; revisto por Arroyo-Espliguero et al., 2004; revisto por Huyton et al., 2007). A interação do LPS com este complexo ativa rapidamente a translocação nuclear de diversos fatores de transcrição devido à presença de domínios TIR (do inglês, *Toll-interleukin-1 receptor*) exposto no citoplasma da célula, que recruta adaptadores citoplasmáticos através de interações domínio-domínio (da Silva Correia e Ulevitch, 2002; Gay e Gangloff, 2007). Numa etapa posterior, o complexo formado por LPS/TLR4/MD-2 pode ser internalizado por endocitose dependente de clatrina e dinamina e rapidamente direcionado aos compartimentos celulares, permitindo o recrutamento de novos adaptadores citoplasmáticos e finalização da sinalização após degradação dos receptores e do LPS nos lisossomos (Kitchens e Munford, 1998; Husebye et al., 2006).

3.1 Sinalização intracelular ativada via TLR4

Atualmente são conhecidas cinco proteínas adaptadoras citoplasmáticas que apresentam domínio TIR: MyD88 (do inglês, *myeloid differentiation primary response gene 88*), TIRAP (do inglês, *TIR domain-containing adaptor protein*, também conhecida como Mal, ou *MyD88-adaptor-like*), TRIF (do inglês, *TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β*), TRAM (do inglês, *TRIF-related adaptor molecule*) e SARM (do inglês, *Sterile α and HEAT-Armadillo motifs-containing protein*). Comparado aos outros receptores da família *toll-like*, o TLR4 é o único que utiliza todas estas proteínas adaptadoras (revisto por O'Neill e Bowie, 2007; revisto por Lu et al., 2008).

Na figura 2 está ilustrada a via de sinalização ativada por LPS e poderá ser acompanhada com a descrição no texto a seguir.

Fig. 2. Sinalização intracelular do LPS: O reconhecimento do LPS envolve a participação de diversas proteínas: LBP e CD14 atuam como proteínas de trânsito do LPS ao receptor TLR4. TLR4 pode formar complexo protéico com MD-2. A ativação da cascata de sinalização intracelular envolve inicialmente o recrutamento de proteínas adaptadoras que interagem com o domínio citoplasmático TIR do receptor TLR4. A via do fator de transcrição NFKB pode ser ativada de duas formas: a primeira é conhecida como a fase inicial de ativação e envolve adaptadores da via MyD88. Sabidamente, o complexo formado pelas proteínas TLR4/MD-2 ligadas ao LPS pode ser internalizado, o que permite o recrutamento dos adaptadores TRIF e a ativação tardia do fator de transcrição NFKB. O término da sinalização do LPS envolve o envio do complexo LPS/TLR4/MD-2 para lisossomos, onde tanto os receptores quanto a endotoxina são degradados. Na sinalização dependente de TRIF o fator de transcrição IRF3 também pode ser ativado (Baseado em Kawai e Akira, 2007; Lu et al., 2008; McGettrick e O'Neill, 2010).

A sinalização induzida por LPS é definida pela molécula adaptadora utilizada para iniciar cada sinalização, podendo ser classificada como dependente de MyD88 ou dependente de TRIF (Barton e Medzhitov, 2003). Os adaptadores TIRAP e TRAM participam do complexo de adaptadores que são recrutados ao domínio TIR do TLR4, nas vias dependentes de MyD88 e TRIF, respectivamente (Lu et al., 2008). A participação de SARM na sinalização do TLR4 é pouco compreendida (Kenny e O'Neill, 2008).

A proteína MyD88, além do domínio TIR, possui um domínio denominado *death-domain*, o que lhe permite recrutar adaptadores subsequentes e, com isso, formar uma cascata de adaptadores ancorados ao receptor TLR4 via interações domínio-domínio (Fitzgerald et al., 2001; O'Neill et al., 2003). Dentre os principais adaptadores recrutados após a ativação do receptor TLR4 estão as quinases que possuem o *death-domain*: IRAK-4 (do inglês, *IL-1 receptor-associated kinase-4*) e IRAK-2 (do inglês, *IL-1 receptor-associated kinase-2*) e a proteína adaptadora TRAF6 (do inglês, *TNF receptor-associated factor 6*). A proteína TRAF6 é muito importante para a cascata de sinalização MyD88-dependente, pois permite o recrutamento de enzimas conjugadas à ubiquitinas, que por sua vez ativam a quinase TAK1 (do inglês, *transforming growth factor- β -activated kinase*) permitindo a translocação nuclear dos fatores de transcrição NF κ B e MAPK (do inglês, *mitogen-activated protein kinase*).

A cascata de sinalização dependente da proteína TRIF, por sua vez, permite o recrutamento de duas proteínas: a primeira é a RIP1 (do inglês, *receptor-interacting protein 1*), uma quinase responsável por induzir a fase

denominada “tardia” da translocação nuclear do fator de transcrição NF κ B e MAPK. Nesta via, o fator de transcrição NF κ B ainda pode ser ativado via adaptadores TRAF6 e TAK1. Além do NF κ B, esta via ainda é responsável por recrutar a proteína TRAF3 (do inglês, *TNF receptor-associated factor 3*) e induzir a translocação do fator de transcrição IRF3 (do inglês, *Interferon regulatory factor 3*) (revisto por Sun e Ley, 2008).

3.2 LPS como ativador do fator de transcrição NF κ B

Embora a ativação do receptor TLR4 possa ativar a translocação nuclear de diversos fatores de transcrição, as principais cascatas desencadeadas pelos adaptadores citoplasmáticos induzem a translocação do fator de transcrição NF κ B. A literatura descreve que o LPS pode ativar duas vias do NF κ B: a clássica e a atípica. Os adaptadores que são recrutados para a ativação da via de atípica ainda são pouco conhecidos. No entanto, sabe-se que esta via envolve a translocação nuclear dos homodímeros p50/p50 e que o adaptador TAK1 participa deste processo em alguns tecidos (revisto por Sun e Ley, 2008).

A ativação da via clássica de NF κ B, caracterizada pela ativação dos dímeros p50/RelA, pode ser mediada pelas vias dependentes de MyD88 ou TRIF. Estas duas vias são convergentes para a ativação de um mesmo adaptador citoplasmático: TRAF6 (Kobayashi et al., 2004; revisto por Kawai e Akira, 2007).

Na ativação da via clássica **dependente de MyD88**, TRAF6 recruta o adaptador TAK1, que ativa o complexo de quinases IKK. A IKK2 deste

complexo catalisa a fosforilação da proteína inibitória IKB-alfa nas serinas 32 e 36, sinalizando para que esta proteína seja degradada por proteassomas. Após a degradação da proteína inibitória, os dímeros p50/RelA de NFkB ficam livres no citoplasma para se translocarem ao núcleo. Na **via dependente de TRIF**, também há o envolvimento do adaptador TRAF6, o qual ativa a translocação do NFkB de maneira semelhante à dependente de MyD88, porém, esta via pode recrutar os adaptadores TAK1 ou RIP1 para fosforilar a IKB-alfa (Sun e Ley, 2008).

A grande diferença na ativação da via clássica do NFkB pelas vias dependentes de MyD88 ou de TRIF está no decurso temporal de indução. O recrutamento dos adaptadores da via dependente de MyD88 ocorre logo após a interação LPS/TLR4/MD-2 e, portanto, é responsável pela ativação rápida do fator de transcrição NFkB. Por outro lado, a ativação do NFkB mediada pela via dependente de TRIF ocorre de maneira mais lenta do que a dependente de MyD88 (revisto por Doyle e O'Neill, 2006). Esta diferença temporal foi proposta por ser decorrente da internalização do complexo LPS/TLR4/MD-2, pois o bloqueio da formação do endossomo inibe o recrutamento desta via (Zhou et al., 2004; Kagen et al., 2008; revisto por McGettrick e O'Neill, 2010) e temporalmente, ocorre cerca de 30 minutos após a interação inicial do LPS ao TLR4 (Werner et al., 2005). Esta internalização do complexo LPS/TLR4/MD-2 promove ainda o término da sinalização via LPS, pois o transporte deste complexo para os lisossomos permite a degradação da endotoxina e do complexo de receptores (Saitoh, 2009).

Na figura 3 pode ser apreciada a ilustração da ativação da via clássica e da via atípica.

Fig. 3. Via clássica e atípica de NFκB ativadas por LPS: Na via clássica, o NFκB pode ser ativado de forma rápida (ao utilizar adaptadores dependentes de MyD88) ou tardiamente (ao utilizar adaptadores dependentes de TRIF), ambas mediadas por TRAF6 e TAK1. O adaptador RIP1 por sua vez está envolvido apenas na via de ativação dependente de TRIF. Estas vias convergem para ativação do complexo de IKKs, com a participação de IKK2 fosforilando a IκB-alfa nas serinas 32 e 36, a qual será degradada por proteassomas liberando o heterodímero p50/RelA para translocar ao núcleo e modular genes alvo. A via atípica de NFκB envolve a ativação do complexo de IKKs, com a participação de IKK1 fosforilando p105. Após degradação por proteassomas, p105 libera o homodímero p50/p50 e sua translocação nuclear (Baseado em Beinke e Ley, 2004; Sun e Ley, 2008).

3.3 Considerações finais

A constatação das anormalidades na secreção rítmica de melatonina em pacientes com infecção e a demonstração de que LPS se acumula em todas as células da glândula pineal são dados da literatura que evidenciam um possível papel da pineal em reconhecer e modular seu funcionamento durante a montagem de um processo infeccioso. Sabidamente, LPS é um potente ativador do fator de transcrição NF κ B em diversos tecidos (Häcker e Karin, 2006; Doyle e O'Neill, 2006). Os relatos da literatura indicando que este fator de transcrição modula a atividade da glândula pineal em condições fisiológicas (Cecon et al., 2010) ou fisiopatológicas (Ferreira et al., 2005; Fernandes et al., 2006) aliados à capacidade efetiva desta endotoxina modular a produção de citocinas em diversos tecidos, foram as bases que permitiram a formulação dos objetivos desta dissertação.

Objetivos

II. OBJETIVOS

O objetivo geral da presente dissertação foi analisar o efeito do LPS na produção de melatonina em glândulas pineais de rato em cultura. Para isso, foram analisados:

1. A presença dos receptores TLR4 e CD14 na glândula pineal de ratos;
2. O padrão de translocação nuclear do fator de transcrição NFkB em glândulas pineais de rato incubadas com LPS;
3. As subunidades de NFkB ativadas por LPS em cultura;
4. A habilidade da glândula pineal em sintetizar a citocina TNF quando estimuladas com LPS;
5. A presença do receptor TNFR1 em pinealócitos e o efeito do LPS sobre a expressão deste receptor;
6. Os efeitos do LPS sobre os produtos da via biossintética de melatonina.

Material e Métodos

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Em todos os experimentos foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) machos e fêmeas pré-púberes de linhagem Wistar, pesando entre 180 e 200 g, criados no biotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno, mantidas em sala com temperatura e umidade controladas, recebendo água e ração *ad libitum*. O ciclo claro/escuro empregado foi o de 12/12 h (luzes acesas às 07h00 e apagadas às 19h00), sendo o horário de acender das luzes, considerado como *Zeitgeber Time* zero (ZT 0).

Para a obtenção das glândulas pineais, os animais foram eutanasiados por decapitação em ZT 3. Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos para pesquisa com animais, cujo protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais Vertebrados em Experimentação (CEA) do Instituto de Biociências (protocolo 045/2007, anexo 1).

2. Drogas e Reagentes

As drogas e reagentes utilizados estão listados a seguir, de acordo com a procedência.

- Abcam (Cambridge, MA, EUA): anticorpos anti-TLR4 (ab47093); anti-ED1 (ab31630); anti-CD14 (ab8103).
- Calbiochem (Darmstadt, Alemanha): NP-40;
- GE Healthcare Life Sciences (Buckinghamshire, Reino Unido): coluna microspin Sefadex G-25.
- Gibco BRL (Grand Island, NY, EUA): penicilina; estreptomicina; glutamina;
- Invitrogen Life Technology (USA): ditioneitol (DTT); fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF); anticorpo secundário anti-coelho conjugado ao fluoróforo FITC; T4 polinucleotídeo quinase.
- Merck (Brasil): acetate de sódio; ácido cítrico; ácido clorídrico; ácido perclórico; álcool etílico; EDTA (do inglês, *ethylenediaminetetracetic acid dissodium salt*); metanol; metabisulfito de sódio;
- Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Califórnia, EUA): anticorpos para as proteínas da via NFκB p-50 (sc-114X); RelA (sc-109X); p52 (sc-298X); c-Rel (sc-70X); RelB (sc-226X); BCL-3 (sc-185X).
- Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EUA): 5-hidroxitriptamina; N-acetilserotonina; melatonina; noradrenalina [(-) *arterenol hydrochloride*]; HEPES; meio de cultura BGJb; N-acetil-leu-leu-norleucinal (ALLN); bisacrilamida (N, N'-methylenebisacrylamide); anticorpo anti-GFAP conjugado ao fluoróforo Cy3; poli(dIdC).

- Perkin Elmer (Boston, MA, EUA): Easy Tides Adenosine 5'-triphosphate, [γ - ^{32}P].
- Promega (Madison, MA, EUA): Oligonucleotídeo consenso para NFkB (5'-AGTTG AGGGGACTTTCCCAGGC-3'); AP-1 (5'-CGTTGATGAGTCAGCCGG AA-3').

3. Preparo de Drogas

Os padrões de 5-HT, NAS e melatonina para cromatografia foram preparados em solução estoque na concentração de 1 mM em 0,1 M de ácido clorídrico acrescido de 0,02% de metabissulfito de sódio e 0,02% EDTA dissódico. Os estoques permaneceram congelados a -20°C até o uso e por período inferior a 30 dias. No momento do uso os padrões foram diluídos em ácido perclórico 0,1 M acrescido de 0,02% de metabissulfito de sódio e 0,02% de EDTA dissódico.

As soluções estoque de noradrenalina foram preparadas em ácido clorídrico 0,01 M, diluídas no momento do uso em solução aquosa de ácido ascórbico (50 mg/L).

LPS foi preparado na concentração de 1 mg/mL em solução aquosa. Os estoques permaneceram congelados a -20°C até o uso e por período inferior a 60 dias. No momento do uso o LPS foi diluído em meio de cultura BGJb (veículo).

As demais drogas listadas anteriormente foram, quando necessário, diluídas em água deionizada purificada por sistema Milli-Q (Millipore®, Billerica, MA, EUA).

4. Cultura de glândulas pineais

As pineais foram cultivadas de acordo com método proposto por Parfitt et al., (1976) e modificado por Ferreira et al., (1994). Detalhadamente, glândulas pineais de rato recém retiradas foram cultivadas em placas de 24 poços, sendo 1 glândula por poço em 200 μ L de meio de cultura BGJb (pH 7,4), acrescido de glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 μ g/mL) e mantidas em estufa com temperatura a 37° C em atmosfera com saturação de carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂). O tratamento foi empregado após 48 h de cultivo. A troca do meio de cultura foi realizada a cada 24 h e, no momento anterior ao tratamento com LPS.

5. Cultura primária de pinealócitos

A cultura de pinealócitos foi realizada conforme método proposto por Ferreira et al., (2003). Após a obtenção, as pineais foram cortadas em pequenas partes e seguiu-se dissociação enzimática com tripsina (0,25%, 37° C, 15 min), seguida por dispersão mecânica realizada na presença de 0,3% de inibidor de tripsina em solução contendo (mmol/L): NaCl 120, KCl 5, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1,2, glicose 12 e 0,1% w/v albumina bovina. Após centrifugação (1000 g, 15 min) as células foram ressuspensas em meio de cultura DMEM acrescido de soro fetal bovino (10%, inativado por calor), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 μ g/mL). A viabilidade celular e o número total de células foram estimados pela exclusão por azul de Trypan. A taxa de sobrevivência celular em cada procedimento foi 95% ou maior. Lâminas de 8 poços (Lab-Tek *chamber slide*, Nalge Nunc International, Nova

York, EUA) foram tratadas com poli-L-lisina por 1 h em temperatura ambiente. Após lavagem dos poços com PBS as células foram plaqueadas ($0,5 \times 10^5$ /poço) e mantidas em estufa (37°C, 5% CO₂) por 18 h.

6. *Tratamentos in vitro*

Os procedimentos foram realizados sempre após a última troca do meio, aguardando-se um período de pelo menos 30 minutos para estabilização da cultura. O tratamento com LPS foi realizado com a diluição da droga em meio de cultura apropriado (BGJb nos ensaios em glândula e DMEM nos ensaios com pinealócitos) e a incubação foi realizada nos períodos de tempo descritos em cada protocolo a seguir. Em relação aos pinealócitos, estes foram estimulados com LPS na ausência de soro fetal bovino no meio de cultura.

Para avaliar a via biossintética de melatonina, a enzima AA-NAT foi ativada com noradrenalina (10 nM) pelo período de 5 h após o tratamento com LPS.

Ao final dos tratamentos, glândulas e meios de cultivo foram estocados a -80°C e -20°C, respectivamente, por no máximo duas semanas.

7. *Ensaio de imuno-histoquímica*

Para obtenção dos tecidos, os animais foram anestesiados profundamente através de injeção por via intramuscular de ketamina (160

mg/kg) acrescido de xilazina (40 mg/kg) e perfundidos transcardialmente com aproximadamente 150 mL de solução salina, seguida de aproximadamente 300 mL de paraformaldeído 4% a 4°C (pH 9,5). Cada pineal foi então removida e crioprottegida no mesmo fixador enriquecido com 20% de sacarose por 12 h, seguindo-se por solução de sacarose 30% em tampão fosfato-salino (PBS) a 4°C por 24 h adicionais. As pineais foram então incluídas em meio para congelamento (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Torrence, CA, EUA), rapidamente congeladas em gelo seco e estocadas a -80°C. A criomicrotomia foi realizada em criostato e os cortes com espessura de 10 µm foram montados em lâminas para microscopia com aderência eletrostática (Star Frost, Alemanha). Após secarem em temperatura ambiente, as lâminas foram estocadas a -20°C até a realização da imuno-histoquímica. Seguindo o protocolo de imuno-histoquímica, após fixação em paraformaldeído 4% por 30 min os cortes foram incubados com glicina (0,1 M) por 5 min, seguido por solução de bloqueio (3% de albumina e 0,01% de saponina em PBS) por 30 min em temperatura ambiente. A biotina endógena foi bloqueada com o kit comercial *avidin-biotin blocking kit* (Vector, SP2001, Burlingame, CA, EUA) por 30 min. Seguiu-se então, a incubação com os anticorpos apropriados para cada experimento: policlonal produzido em coelho anti-TLR4 (1:200, Abcam) e monoclonal produzido em camundongo anti-CD14 (1:200, Abcam) diluídos em solução de bloqueio. Os anticorpos primários foram incubados por 16 h a 4°C, seguindo-se de incubação com o anticorpo secundário conjugado a biotina apropriado para cada anticorpo primário (1:200, Abcam) por 1 h a temperatura ambiente. O complexo avidina-biotina foi marcado com kit comercial (*Vectastain Elite Kit*, Vector,

PK-605, Burlingame, CA, EUA) e a atividade da peroxidase foi revelada com 3, 3'-diaminobenzidina (DAB, *substrate kit for peroxidase*, Vector, SK-4100, Burlingame, CA, EUA). Finalizada esta etapa, as lâminas foram contracoradas com azul de metileno ou hematoxilina-eosina, para os ensaios anti-TLR4 e anti-CD14, respectivamente, para coloração dos componentes celulares da glândula pineal.

Nos ensaios de imunofluorescência por microscopia confocal os cortes de glândula foram incubados por 5 min em PBS contendo glicina (0,1 M) seguido por incubação com solução de bloqueio (3% de albumina e 0,01% de saponina em PBS) a temperatura ambiente por 30 min. Foi então realizada a incubação com os anticorpos primários: policlonal produzido em coelho anti-TLR4 (1:100, Abcam), monoclonal produzido em camundongo anti-ED-1 (1:100, Abcam) e monoclonal produzido em camundongo anti-GFAP conjugado ao fluoróforo Cy3 (1:500, Sigma-Aldrich) diluídos em solução de bloqueio por 48 h a 4°C. Após esta etapa, os cortes foram novamente incubados em solução de bloqueio por 30 min, seguindo-se incubação dos anticorpos secundários fluorescentes apropriados: anti-coelho conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC, 1:200, Sigma-Aldrich) e anti-camundongo Cy3 (1:200, Abcam) por 1 h em temperatura ambiente. O núcleo celular foi marcado com 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 20 µM, 10 min) diluído em PBS e incubado em temperatura ambiente. Os controles negativos foram realizados com a omissão do anticorpo primário, o que resultou na completa eliminação de imunorreatividade. A marcação imunopositiva foi observada por microscopia confocal (Zeiss, LSM510, Baden-Wurttemberg, Alemanha) com objetivas de imersão em óleo (40X ou 100X),

sendo utilizado o laser HeNe 543 para excitação do fluoróforo Cy3 no comprimento de onda de 590 nm e filtro de emissão em 560 nm. Para a excitação do fluoróforo FITC utilizou-se laser argônio no comprimento de onda de 488 nm e filtro de emissão em 505. O laser enterprise foi utilizado para excitação do marcador DAPI no comprimento de onda de 364 nm e a emissão verificada com filtro de 435-485 nm.

8. Ensaio de imunocitoquímica por microscopia confocal

Após o cultivo e o tratamento na ausência ou presença de LPS, as células foram lavadas com PBS, fixadas em paraformaldeído 4% gelado por 10 min e permeabilizadas com saponina 0,5% em PBS em temperatura ambiente. Foi realizado bloqueio com albumina bovina (fração V) 1% e glicina (0,3 M) por 60 min, com o objetivo de minimizar a ligação do anticorpo a sítios não específicos. Para avaliar a presença constitutiva dos receptores TLR4 e CD14, foram utilizadas culturas de células sem tratamento com LPS que foram incubadas com anticorpo policlonal produzido em coelho anti-TLR4 ou monoclonal produzido em camundongo anti-CD14 (1:500 e 1:200, respectivamente, Abcam) por 18 h a 4°C. A avaliação do receptor TNFR1, os pinealócitos foram tratados na ausência (para avaliar a presença constitutiva) ou presença de LPS (0,1 µg/mL, 15 a 360 min). Finalizado o tratamento, os pinealócitos foram incubados com

anticorpo policlonal produzido em coelho anti-TNFR1 (1:500, Abcam) por 18 h a 4°C.

Após as incubações com os anticorpos primários, seguiu-se incubação com os seguintes anticorpos secundários: anti-coelho conjugado ao fluoróforo Texas Red (1:400, Abcam) e anti-camundongo conjugado ao fluoróforo FITC (1:200, Invitrogen) por 1 h em temperatura ambiente. O núcleo celular foi marcado com 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 300 µM, 5 min) a temperatura ambiente. Os anticorpos primários e secundários foram diluídos em tampão de bloqueio descrito acima. Os controles negativos foram realizados com a omissão do anticorpo primário. A marcação imuno-positiva foi observada usando microscópio confocal (Zeiss, Baden-Wurttemberg, Alemanha) com a objetiva de imersão em óleo (40X), sendo utilizado o laser HeNe 543 para excitação do fluoróforo Texas-Red no comprimento de onda de 590 nm e filtro de emissão em 650 nm. Para a excitação do fluoróforo FITC utilizou-se laser argônio no comprimento de onda de 488 nm e filtro de emissão em 505. O laser enterprise foi utilizado para excitação do marcador DAPI no comprimento de onda de 364 nm e a emissão verificada com filtro de 435-485 nm. Foram obtidas 4 imagens de cada poço selecionadas aleatoriamente contendo pelo menos 10 células viáveis e a quantificação da fluorescência relativa foi realizada através do *software* Image J (*download* gratuito em <http://rsb.info.nih.gov/ij>).

9. Extração de proteína nuclear

Para a extração de proteína nuclear, as glândulas pineais obtidas após o cultivo foram homogeneizadas individualmente em 100 μ L de tampão de lise (HEPES 10 mM, KCl 10 mM, EDTA 0,1 mM pH 8,0, glicerol 10%, DTT 1 mM e PMSF 0,1 mM) com auxílio de um homogeneizador e pistilo para tubo plástico de 1,5 mL de volume. Em seguida, foi adicionado 12,5 μ L de NP40 (10%), um composto detergente para auxiliar no processo de lise. Após uma breve agitação em vórtex as amostras foram incubadas em gelo por 15 min, centrifugadas (12000 g, 1 min, 4°C) e o sobrenadante, correspondente a fração citoplasmática do extrato, descartado. O *pellet* formado foi então ressuspensionado em 50 μ L de tampão de lise e seguiu-se nova centrifugação (12000 g, 1 min, 4°C). Novamente o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em tampão de extração nuclear (HEPES 10 mM, KCl 500 mM, EDTA 1 mM pH 8,0, glicerol 10%, DTT 1 mM, PMSF 0,1 mM). Após incubação por 15 min em gelo sob agitação, as amostras foram centrifugadas (20000 g, 5 min, 4°C) e o sobrenadante contendo o extrato protéico nuclear foi transferido para um novo tubo e armazenado a -20°C. A quantificação do conteúdo de proteína no extrato foi realizada a 280 nm usando o espectrofotômetro ND-1000 (Nanodrop, Wilmington, DE, EUA).

10. Ensaio de eletromobilidade por retardo em gel (EMSA)

Este ensaio foi utilizado para análise do conteúdo nuclear de NFkB em glândulas pineais e consiste na reação de ligação de proteínas do extrato

nuclear com a sequência de nucleotídeos específica para o fator de transcrição NFkB marcada com o radioisótopo ^{32}P .

Nestes ensaios foram utilizados 6 μg de proteína, obtida por extração nuclear descrita anteriormente. Seguiu-se incubação destas, com tampão de ensaio (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl_2 1 mM, NaCl 50 mM, DTT 0,5 mM, EDTA 0,5 mM, poli(dIdC) 1 μg e glicerol 4%) por 20 min em temperatura ambiente. Na sequência, as amostras foram incubadas por 30 min em temperatura ambiente com 40000 cpm de sonda de oligonucleotídeo dupla-fita correspondente ao consenso para NFkB (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3', Promega, Madison, WI, EUA) marcado com radioisótopo. A marcação da sonda foi realizada pela incubação do oligonucleotídeo consenso para NFkB com 1 μL de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (atividade específica 3000 Ci/mmol) na presença da enzima T4 polinucleotídeo quinase (10 U). Esta enzima substitui os fósforos do oligonucleotídeo por fósforo radioativo e o que não é incorporado é removido por coluna sefadex G-25 (GE Healthcare Life Sciences). Em seguida, foi adicionado 2 μL de tampão de corrida (Tris-HCl 250 mM pH 7,5, glicerol 4%, azul de bromofenol 0,2%). Os complexos proteína-DNA foram analisados em gel de poliacrilamida não-desnaturante, 6% de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1) por eletroforese (150V, 1h30min) em tampão 0,25 x de Tris-borato/EDTA (TBE). Finalizada a corrida, o gel foi seco a vácuo, exposto ao filme BIOMAX-MS (Kodak, Rochester, NY, EUA) em cassete apropriado por 48 h a -80°C . Seguiu-se revelação por imersão do filme em solução reveladora por 5 min (Kodak, Rochester, NY, EUA) e em solução fixadora por 10 min (Kodak, Rochester,

NY, EUA). As autoradiografias foram quantificadas através do *software* Image J.

A especificidade da sonda para NFkB utilizada foi testada em ensaio de competição. Foi utilizado um *pool* de 6 extratos nucleares provenientes de glândulas tratadas na presença de LPS (1,0 µg/mL, 15 min). Os extratos nucleares foram incubados com oligonucleotídeo dupla-fita correspondente ao consenso para NFkB marcado com radioisótopo nas condições descritas anteriormente. Para a competição (Fig 4), houve incubação prévia por 30 min de excesso molar de 50 e 100 vezes do oligonucleotídeo dupla-fita correspondente ao consenso para NFkB sem marcação com radioisótopo. Ainda foi realizada a incubação com oligonucleotídeo dupla-fita correspondente ao consenso para AP-1 sem marcação com radioisótopo (5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3'; Promega, Madison, W, EUA). A análise por EMSA indica a formação de dois complexos protéicos, nomeados como complexo 1 (C1) e complexo 2 (C2). A adição de oligonucleotídeo sem marcação com radioisótopo (NFkB), competiu com o oligonucleotídeo marcado, favorecendo o desaparecimento de ambos os complexos identificados. Ainda, a adição do oligonucleotídeo não relacionado (AP-1) sem marcação com radioisótopo, não alterou a marcação dos complexos, indicando a especificidade do complexo à sequência de nucleotídeos utilizada.

Fig. 4. Ensaio de competição: Gel-shift de extratos protéicos nucleares de glândulas pineais de rato mantidas em cultura e estimuladas com LPS (1,0 µg/mL, 37°C, 95% O₂, 15 min) incubados na presença de oligonucleotídeo marcado radioativamente. Para competição, foi adicionado ao extrato nuclear: oligonucleotídeo para NFKB em excesso molar como indicado, ou oligonucleotídeo para AP-1, ambos sem marcação com radioisótopo (frio). O material aplicado em cada coluna está especificado na parte superior da figura.

11. Ensaio de super-shift

A identificação das subunidades de NFKB nuclear presentes em extratos de glândulas pineais tratadas na ausência (veículo) ou presença de LPS (1 µg/mL, 15 min), foi realizada através de ensaio EMSA com 6 µg de proteína provenientes de um *pool* de 6 extratos nucleares de cada grupo experimental. Este ensaio (*super-shift*) foi realizado nas mesmas condições

descritas anteriormente. A diferença foi a inclusão de uma etapa, que consiste na incubação com anticorpos específicos para cada subunidade de NF κ B por 45 min, antes da incubação com o tampão de ensaio. As demais etapas foram realizadas sem alterações.

12. Dosagem de TNF

O conteúdo de TNF presente no meio de cultura de glândulas pineais incubadas na ausência (veículo) ou presença de LPS (0,1 ou 1,0 μ g/mL) foram quantificadas com conjunto diagnóstico comercial (*rat TNF-alpha ELISA ready-set-go kit*, cat. 88-7340, eBioscience, San Diego, CA, EUA) por meio da técnica imunoenzimática conhecida como ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*) de acordo com instruções do fabricante.

13. Determinação de indolaminas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O conteúdo de 5-HT, NAS e melatonina induzidas por noradrenalina, presentes no meio de cultura em que glândulas pineais foram incubadas na ausência (veículo) ou presença de LPS (0,1 μ g/mL, 13 h) estimuladas com noradrenalina (10 nM) foi determinado por HPLC com detecção eletroquímica. O sistema cromatográfico (Waters, Mildford, MA, EUA) foi operado isocraticamente em temperatura ambiente. A fase móvel para 5-HT e NAS (acetato de sódio 0,1 M, ácido cítrico 0,1 M, EDTA 0,15 mM e metanol 10%, pH 3,7) e a fase móvel para melatonina (acetato de sódio 0,1 M, ácido

cítrico 0,1 M, EDTA 0,15 mM e metanol 25%, pH 3,7) fluiu com fluxo de 0,95 mL/min ou 0,50 mL/min, respectivamente, através da coluna de fase reversa 5-mm Resolve C18 (Waters, Mildford, MA, EUA). O potencial do detector foi ajustado para +0,90 V *versus* eletrodo de referência Ag/AgCl, acoplado a um computador para integração dos dados. Foi injetado 20 µL do meio de cultura ou de padrões para cada analito diretamente no sistema cromatográfico.

14. Análise dos resultados

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (e. p. m.). As médias foram obtidas a partir de, no mínimo três amostras em cada grupo experimental. A comparação entre duas médias foi realizada pelo teste “t” de *student*. A comparação entre mais de duas médias foi realizada por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida de pós-teste *Newman-Keuls* ou de duas vias seguida de teste de *Bonferroni* (dosagem de TNF), calculados pelo software GraphPad Prism 4.0. As amostras foram consideradas significativamente diferentes quando apresentavam probabilidade de $P < 0,05$.

Resultados

IV. RESULTADOS

1. Expressão constitutiva dos receptores TLR4 e CD14 na glândula pineal de ratos

A avaliação da expressão protéica constitutiva dos receptores TLR4 e CD14 foi realizada por imuno-histoquímica, pelo método de imunoperoxidase, em cortes de glândulas pineais de ratos eutanasiados no ZT3 (Fig. 5). A imunorreatividade TLR4-positiva e CD-14 positiva demonstra que estes receptores estão expressos difusamente nas células do parênquima da glândula (objetiva de 4X, Fig. 5B e 5E). Em maior aumento (objetiva de 100X, Fig. 5C e 5F) fica evidenciado que não são todas as células da glândula que expressam estes receptores (seta aberta) e que nas células imunorreativas a expressão destes receptores é observada tanto na membrana celular, quanto no citoplasma.

Considerando que o receptor TLR4 é essencial para ativação da cascata de sinalização intracelular e a diversidade de tipos celulares presentes na glândula pineal, avaliamos, na etapa seguinte, em quais células da pineal este receptor é expresso. Para tanto, utilizamos o método de dupla imunofluorescência e análise por microscopia confocal para identificação do receptor TLR4 (anti-TLR4) e de células gliais (anti-GFAP, marcador de astrócitos; anti-ED-1, marcador de microglia) Estes ensaios confirmaram o mesmo padrão de imunorreatividade observado pelo método de imunoperoxidase. Como pode ser observado na figura 6, TLR4 é expresso

em astrócitos (Fig. 6A-D) e em microglia (Fig. 6E-H). Levando em consideração a intensa imunorreatividade presente nas células adjacentes não reativas à marcação de células da glia, é possível sugerir que pinealócitos também expressam constitutivamente este receptor.

Fig. 5. Expressão de TLR4 e CD14 em cortes de glândula pineal de ratos: Fotomicrografias obtidas em microscopia de campo claro de cortes de pineal de rato submetidos à imuno-histoquímica e coloração para azul de metileno (TLR4) ou hematoxilina-eosina (CD14). Controles negativos (A e D) foram obtidos com a omissão da incubação do anticorpo primário. Os cortes foram corados com azul de metileno (A – C) ou hematoxilina e eosina (D – F). Em menor aumento observa-se parte do parênquima da glândula pineal e a presença difusa dos receptores TLR4 (B) ou CD14 (E). Em maior aumento a marcação TLR4-positiva (C) e CD-14-positiva (F) é observada na membrana e no citoplasma de algumas células (seta fechada), e ausente em outras (seta aberta). Resultados representativos de 2 a 3 experimentos independentes. Barra de escala: 50µm.

Fig. 6. Colocalização por imunofluorescência de TLR4 (em verde) e astrócitos (GFAP, vermelho, A-D) ou microglia (ED-1, vermelho, E-H) em cortes de glândula pineal de rato. O núcleo das células foi marcado com DAPI (azul). As imagens A e B ou E e F estão sobrepostas em C e G, respectivamente (objetiva de 40X). Em C e G os quadrados brancos representam as regiões fotografadas em maior aumento (objetiva de 100X) e apresentadas em D e H, respectivamente. A colocalização de TLR4 e células da glia está indicada pelas setas duplas (C,D, G e H). A imunorreatividade de TLR4 na maioria das células do parênquima sugere expressão deste receptor em pinealócitos (seta simples, D e H). Barra de escala: 20 μ m.

2. Expressão constitutiva dos receptores TLR4 e CD14 em pinealócitos de ratos

A confirmação da presença dos receptores TLR4 e CD14 em pinealócitos foi realizada através de imunocitoquímica por microscopia confocal em células cultivadas isoladamente (Fig. 7).

Fig. 7. Pinealócitos em cultura expressam constitutivamente os receptores TLR4 (A) e CD14 (B): as células foram observadas por microscopia confocal. A imunofluorescência em vermelho representa a marcação TLR4-positiva (A) e em verde a marcação CD14-positiva (B). Os núcleos das células foram marcados em azul com DAPI. Barra de escala: 10 µm.

3. LPS ativa a translocação nuclear do NFkB em glândulas pineais de rato em cultura

Tendo em vista que a ativação de receptores TLR4 por LPS promove a translocação nuclear do NFkB em diversos modelos celulares, foi avaliado o efeito do LPS sobre o acúmulo nuclear deste fator de transcrição pela técnica EMSA em extratos nucleares de glândulas pineais desnervadas em cultura (48 h).

3.1 Decurso temporal da translocação nuclear do NFkB induzido por LPS

Para determinar a dinâmica de translocação nuclear deste fator de transcrição foi realizada uma análise temporal da ativação do NFkB em glândulas pineais tratadas com veículo (meio de cultura, 37°C, 95% O₂, 5 a 120 min) ou LPS (1,0 µg/mL, 37°C, 95% O₂, 5 a 120 min).

A análise por EMSA indica a formação de dois complexos protéicos que foram denominados complexo 1 (C1) e complexo 2 (C2). As quantificações densitométricas de C1 e C2 demonstram que LPS promove um aumento rápido e transiente na translocação nuclear do NFkB no C1 (Fig. 8B). O início do aumento ocorre após 5 minutos e a máxima detecção nuclear após 15 minutos de incubação com LPS. Em relação ao C2, LPS não promoveu alterações nos primeiros 15 minutos de incubação. Nos períodos

subsequentes, foi observado decréscimo do conteúdo nuclear de NFKB nos complexos C1 e C2 (Fig. 8B e C).

Fig. 8. Decurso temporal da ativação do fator de transcrição NFKB em glândulas pineais de rato incubadas com LPS: (A) glândulas pineais de rato foram incubadas com LPS (1,0 μg/mL, 37°C, 95% O₂, 0 a 120 min). A análise dos extratos nucleares por EMSA utilizando oligonucleotídeo para NFKB marcado com radioisótopo ³²P demonstra a formação de dois complexos proteína-DNA (NFKB C1 e NFKB C2). Quantificação densitométrica de C1 e C2, em B e C, respectivamente. Os dados estão apresentados como média ± e. p. m. e foram normalizados em porcentagem em relação à glândulas controle. N = 5 a 13 glândulas por ponto, provenientes de 3 experimentos independentes. *p<0,05 quando comparado ao grupo controle.

3.2 Identificação das subunidades de NF κ B ativadas por LPS em pineais de rato

Para identificar as subunidades de NF κ B presentes em cada complexo foi utilizado um *pool* de extratos protéicos provenientes de glândulas controle e de glândulas tratadas com LPS. Estes extratos foram incubados com anticorpos específicos para cada subunidade da família NF κ B (RelA, p50, p52, c-Rel, RelB) e também com anticorpo para a proteína BCL-3. Quando há interação do anticorpo com a proteína de interesse forma-se um complexo maior (DNA-anticorpo-proteína) que promove um retardo adicional na migração dos extratos no gel (*super-shift*).

Como observado na figura 9, o retardo ocorreu apenas no C1 em todos os grupos experimentais. Em extratos de glândulas controle este retardo foi observado somente na presença do anticorpo anti-p50, que deslocou completamente a banda. Uma vez que o fator de transcrição NF κ B atua no núcleo sempre sob a forma de homodímeros ou heterodímeros, estes resultados sugerem a presença de homodímeros p50/p50. Em glândulas tratadas com LPS (1,0 μ g/mL, 15 min), o retardo foi observado na presença do anticorpo anti-RelA, que deslocou parcialmente a banda, e na presença do anticorpo anti-p50, que deslocou a banda por completo, sugerindo que na presença de LPS o homodímero p50/p50 ainda é detectado e que esta endotoxina também induz a translocação nuclear do heterodímero p50/RelA. Embora o ensaio de competição tenha demonstrado que o C2 seja específico, este complexo não foi deslocado pela incubação de nenhum dos anticorpos utilizados.

Fig. 9. Ensaio de *super-shift* em glândulas pineais de rato: Na parte superior da figura é possível observar cada anticorpo utilizado no ensaio de *super-shift*. Como representado na autoradiografia, em extratos de glândulas controle apenas o anticorpo anti p-50 desloca a banda, demonstrando a presença de homodímero p50/p50. Em extratos de glândulas tratadas com LPS o NFKB C1 foi deslocado parcialmente pelo anticorpo anti-RelA e completamente pelo anticorpo anti-p50, sugerindo a presença de homodímero p50/p50 e de heterodímero p50/RelA neste complexo.

4. LPS induz a produção da citocina TNF em glândulas pineais de rato em cultura

A presença do domínio TAD na subunidade de NF κ B RelA é responsável pela indução de um pacote de genes. Este é o mecanismo de controle positivo da produção de TNF e TNFR1 em diversos tecidos, incluindo o cérebro (Liu et al., 1999; Li et al., 2004; Shen et al., 2009). Nos experimentos anteriores observamos que a translocação desta subunidade em glândulas pineais de rato é induzida por LPS. Na etapa seguinte, avaliamos a habilidade da glândula pineal em sintetizar a citocina TNF em cultura.

4.1 Decurso temporal da produção de TNF induzido por LPS

O conteúdo da citocina foi dosado no meio de cultura em que as glândulas foram mantidas (Fig. 10). Na ausência de LPS pineais de rato apresentam quantidades de TNF abaixo do limite de detecção do método. Glândulas pineais incubadas na presença de LPS (0,1 ou 1,0 μ g/mL, 30 a 360 min) apresentam aumento dependente de tempo no conteúdo de TNF no meio de incubação, sendo a máxima detecção observada após 240 min ($8,6 \pm 3,3$ pg/poço e $7,7 \pm 1,9$ pg/poço, para LPS 0,1 μ g/mL e 1,0 μ g/mL, respectivamente). Entre os tempos de 240 a 360 minutos de incubação com LPS foi observada uma redução significativa no conteúdo de TNF no meio de cultura ao utilizarmos a concentração de 0,1 μ g/mL, enquanto que na

concentração de LPS 1,0 $\mu\text{g/mL}$ foi observada uma tendência neste sentido. A análise de variância de duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni revelou significância estatística para os efeitos tempo-dependente do LPS ($P < 0,001$) sem significância entre as concentrações utilizadas. Uma vez que os efeitos máximos observados com ambas as concentrações de LPS não apresentaram diferença estatística, optamos por utilizar a concentração mais baixa de LPS (0,1 $\mu\text{g/mL}$) nos experimentos subsequentes.

Fig. 10. LPS induz a produção de TNF em glândulas pineais em cultura: círculos vermelhos representam a concentração de LPS 0,1 $\mu\text{g/mL}$. Quadrados azuis representam a concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$. Dados estão expressos como média $\pm$ e. p. m de 4 a 8 glândulas por ponto.

4.2 Participação do NF κ B na produção de TNF induzido por LPS

Com o objetivo de avaliar se a produção de TNF induzido por LPS é dependente do fator de transcrição NF κ B, utilizamos o inibidor de proteassoma N-acetil-leu-leu-norleucinal (ALLN).

Os resultados obtidos demonstram que o conteúdo de TNF presente no meio de cultura na presença de LPS (0,1 μ g/mL, 2 h) é bloqueado, partindo de valores $3,3 \pm 0,5$ pg/poço para valores não detectáveis no grupo pré-incubado com ALLN (12,5 μ M, 48 h) (Fig. 11). Os grupos sem estímulo com LPS ou tratados apenas com ALLN também não apresentam conteúdo detectável de TNF (dados não apresentados).

Fig. 11. O bloqueio da via NF κ B inibe a produção de TNF induzida por LPS em glândulas pineais de rato em cultura. Os dados estão apresentados como média $\pm$ e. p. m. do número de glândulas apresentado em cada barra.

5. LPS modula a expressão do receptor TNFR1 em pinealócitos

A partir da observação de que a glândula pineal produz a citocina TNF fomos avaliar se pinealócitos expressam o receptor para esta citocina (TNFR1, do inglês, *tumor necrosis factor receptor 1*). Este receptor é descrito como presente constitutivamente na maioria dos tecidos e é considerado como o principal mediador da sinalização do TNF (revisto por Wajant et al., 2003).

A avaliação da presença do TNFR1 foi realizada através de imunocitoquímica por microscopia confocal em cultura primária de pinealócitos (Fig. 12). A expressão do receptor TNFR1 foi detectada de maneira constitutiva em pinealócitos e a incubação destas células com LPS (0,1 µg/mL, 15 a 360 min) promoveu modulação na expressão deste receptor. A quantificação da fluorescência relativa do receptor TNFR1 em pinealócitos demonstra que nos 30 min iniciais de incubação, LPS reduz em cerca de 55% a imunofluorescência basal ($100\% \pm 8,1$ para $45,8\% \pm 3,6$) que se mantém reduzida até 120 min de LPS ($61,8\% \pm 6,5$). Após 240 min de incubação, LPS promove aumento na fluorescência, sugerindo aumento na expressão deste receptor. Comparado aos valores basais, a supra-regulação na imunorreatividade é de cerca de 60% ($100\% \pm 8,1$ para $159,6\% \pm 18,3$). Por fim, após 360 min de incubação, LPS novamente inibe a imunorreatividade em cerca de 50% em relação aos valores basais ($100\% \pm 8,1$ para $51\% \pm 4,5$).

Fig. 12. Efeitos do LPS sobre a expressão constitutiva do receptor TNFR1. (A) Quantificação da fluorescência relativa do receptor TNFR1 em pinealócitos em cultura. (B) Imagens representativas da expressão constitutiva de TNFR1 (esquerda) e induzida por 240 min de incubação com LPS (direita) em pinealócitos de rato. As fotomicrografias foram obtidas por microscopia confocal. Em vermelho, a imunofluorescência emitida pelo anticorpo secundário conjugado ao fluoróforo Texas Red. Em azul, a imunofluorescência emitida por DAPI, marcador de núcleo celular. Barra de escala: 10 µm. Os dados estão normalizados em porcentagem em relação ao controle e apresentados como média ± e. p. m. N = 3 culturas obtidas de diferentes ratos. *P<0,05 comparado ao grupo controle.

6. Efeitos do LPS sobre os produtos da via biossintética de melatonina.

O efeito modulatório do LPS (0,1 µg/mL, 13 h) sobre a via biossintética de melatonina induzida em cultura por noradrenalina (Fig. 13) foi avaliado através da quantificação dos principais produtos da via biossintética de melatonina presentes no meio de incubação: 5-HT, NAS e melatonina. LPS aumenta significativamente o conteúdo de 5-HT de valores $178,1 \pm 29,3$ ng/poço no grupo controle para $242,8 \pm 9,6$ ng/poço (N=6-7). Em relação ao precursor NAS, o conteúdo é inibido de $15,2 \pm 2,6$ ng/poço no grupo controle para $7,8 \pm 1,4$ ng/poço no grupo tratado na presença de LPS (N=5-7). A produção de melatonina também foi inibida por LPS de valores $91,6 \pm 14,7$ ng/poço no grupo controle para $50,4 \pm 6,9$ no grupo tratado com LPS (N=10-11). LPS *per se*, não apresenta efeito sobre a produção de 5-HT, NAS ou melatonina (dados não apresentados)

Fig. 13. Efeitos do LPS sobre os produtos da via biossintética de melatonina.

LPS (0,1 $\mu\text{g/mL}$, 13 h) promove acúmulo de 5-HT e inibição de NAS e melatonina induzidos por noradrenalina (NA, 10 nM, 5 h) em glândulas pineais de rato em cultura. Os dados estão apresentados como média $\pm$ e. p. m. A comparação entre as duas médias foi realizada pelo teste “t” de *student*.

Discussão

V. DISCUSSÃO

Classicamente, a glândula pineal atua como transdutora neuroendócrina da alternância entre as fases de claro/escuro ambiental produzindo melatonina durante a fase de escuro (revisto por Reiter, 1991). Apesar do controle da síntese de melatonina ser orquestrado pela sincronização ao meio externo, recentes evidências apontam que esta síntese também é modulada por fatores internos, como citocinas e glicocorticóides (Withyachumnarnkul et al., 1990, 1991; Tsai e McNulty, 1999; Tsai et al., 2001a, b; Ferreira et al., 2005; Fernandes et al., 2006; Fernandes et al., 2009). No contexto do eixo imune-pineal, a glândula pineal atuaria como um sensor interno capaz de detectar e responder a estes agentes moduladores de processos fisiopatológicos para permitir a migração de leucócitos e a montagem da resposta inflamatória (revisto por Markus et al., 2007).

Jiang-Shieh e colaboradores (2005) avaliaram os efeitos do LPS administrado por via intravenosa e observaram que esta endotoxina se difunde pelo parênquima da glândula pineal, promovendo ativação das células da glia e aumento da produção de serotonina em pinealócitos. Além disso, estes autores não propuseram os possíveis mecanismos de ação do LPS sobre a glândula. A presente dissertação demonstra que a glândula pineal é alvo para LPS e, discute a seguir, os possíveis mecanismos de supressão da síntese de melatonina.

O mecanismo de ativação da resposta celular desencadeada pelo LPS envolve a participação de seus receptores de membrana celular, CD14 e TLR4. No entanto, apenas TLR4 ativa as vias intracelulares de sinalização, pois é o único que possui domínio citoplasmático (Chow et al., 1999; Hoshino et al., 1999).

A transcrição constitutiva do RNAm para CD14 e TLR4 na pineal foi observada recentemente (Armelin, 2009). Nossos resultados obtidos com imuno-histoquímica demonstram que também há expressão da proteína para estes receptores nas células da glândula pineal. De fato, cada vez mais a presença destes receptores no sistema nervoso central (SNC) vem sendo documentada na literatura. Entre os órgãos circunventriculares, dos quais a pineal também faz parte, a expressão de TLR4 já foi demonstrada na área postrema, no *organum vasculosum of the lamina terminalis*, plexo coróide e eminência média (Laflamme e Rivest, 2001; Wuchert et al., 2001). Este receptor também foi observado em áreas que estão situadas dentro da barreira hematoencefálica, como córtex parietal, hipocampo e hipotálamo (Laflamme e Rivest, 2001; Rolls et al., 2007; Li et al., 2008) e a presença constitutiva de TLR4 vem sendo utilizada para explicar a ativação da resposta imunológica no SNC (Laflamme e Rivest, 2001).

Alguns autores sugerem que TLR4 é expresso essencialmente em microglia (Lehnardt et al., 2003), as células imunocompetentes residentes do SNC. No entanto, este receptor também tem sido reportado em astrócitos, células endoteliais e neurônios (Jou et al., 2006; Tang et al., 2007). Em nossos resultados foi possível observar que TLR4 está presente em astrócitos, microglia e pinealócitos. Portanto, as células produtoras de

melatonina e as principais células da glia da glândula pineal estão equipadas para reconhecer e gerar a sinalização intracelular desencadeada pelo LPS.

A presença de TLR4 na glândula pineal pode ser discutida de duas maneiras. Classicamente, o TLR4 é importante para reconhecer PAMPs, tendo o LPS como o principal ativador das cascatas de sinalização. Por outro lado, recentes evidências apontam que TLR4 atua no reconhecimento de substâncias endógenas (revisto por Erridge, 2010). Essas moléculas têm sido propostas por atuarem como mediadores da inflamação e por serem liberados em resposta a padrões moleculares associados ao dano tecidual, estes mediadores foram denominadas como DAMPs (do inglês, *danger-associated molecular pattern*). As principais descritas na literatura são as proteínas relacionadas ao choque térmico HSP60, HSP70 e HSP90 (do inglês, *heat shock protein*), angiotensina II, fibrinogênio, HMGB-1 (do inglês, *high-mobility group Box 1*), peptídeo β -amilóide, entre outras. Estes DAMPs promovem a ativação do fator de transcrição NF κ B via TLR4 de maneira semelhante à iniciada pelo LPS (Park et al., 2004; Apetoh et al., 2007; Balistreri et al., 2007, 2009; Hreggvidsdottir et al., 2009; Lee e Seong, 2009). Deste modo, a presença do receptor TLR4 na glândula pineal pode ser discutida em relação à habilidade de um mesmo receptor poder detectar um mediador inflamatório liberado durante uma infecção bacteriana gram-negativa (LPS) ou ainda, por poder detectar outros sinais gerados pelo organismo na presença de dano tecidual.

Em nossos resultados de imuno-histoquímica também observamos a presença constitutiva do co-receptor CD14 em glândulas pineais de rato.

Sabidamente, o CD14 está envolvido na efetiva transferência do LPS para o receptor TLR4. Esta proteína também é encontrada em diversas áreas do SNC (Laflamme e Rivest, 2001). Adicionalmente, CD14 atua como um co-receptor essencial para outros receptores da família TLR (McGettrick e O'Neill, 2010) e a presença desta proteína na pineal sugere que outros receptores desta família de receptores possam estar presentes na glândula, assim como ocorre em outras áreas do cérebro (Landreth e Reed-Geaghan, 2009).

Ativação do NFκB

O reconhecimento do LPS orquestrado pelo receptor TLR4 desencadeia a ativação de duas cascatas de sinalização independentes. O início destas vias é mediada por diferentes adaptadores que por via dependente da proteína MyD88 ou dependente da via TRIF, recrutam o adaptador citoplasmático TRAF6 por interações domínio-domínio. Este adaptador por sua vez, ativa o complexo de IKKs que fosforila as proteínas inibitórias permitindo a translocação nuclear do fator de transcrição NFκB (Kawai e Akira, 2007). No SNC a ativação deste fator de transcrição por LPS já foi observada em diversos órgãos circunventriculares, na hipófise, no córtex, no cerebelo, tálamo e núcleo paraventricular (Pitossi et al., 1997; Kakizaki et al., 1999; Chakravarty e Herkenham, 2005).

Na glândula pineal, observamos que LPS modula a translocação nuclear deste fator de transcrição. O perfil temporal desta ativação

demonstra que LPS aumenta o conteúdo de NFkB de maneira rápida, iniciand-se logo após sua incubação e atingindo máxima detecção nuclear após 15 min. No período subsequente observamos que há redução do conteúdo nuclear de NFkB. De modo geral, este perfil temporal da translocação nuclear do NFkB induzido por LPS é temporalmente regulado e ocorre de maneira rápida em diversos tecidos (Covert et al., 2005; Werner et al., 2005). Uma possível explicação para a redução neste conteúdo envolve as alças de retroalimentação negativa controladas pelas proteínas inibitórias IKBs. Estas proteínas (principalmente IKB-alfa) são rapidamente sintetizadas após incubação com LPS (Hoffmann e Baltimore, 2006) e sua ressíntese está diretamente relacionada à redução do conteúdo nuclear de NFkB (Hoffmann et al., 2002; Nelson et al., 2004; Covert et al., 2005) promovendo a finalização apropriada da atividade transcricional para que as células se mantenham responsivas aos estímulos subsequentes (Wan e Lenardo, 2010).

Em glândulas pineais controle, homodímero p50/p50 de NFkB está constitutivamente ativado, sendo que o conteúdo nuclear deste fator apresenta acúmulo gradativo ao longo da fase de claro, com redução abrupta logo após a entrada da fase de escuro (Cecon et al., 2010). Em condições de hígidez, tanto a redução do conteúdo de NFkB quanto a manutenção de baixos níveis durante a noite seria um fator que permitiria a produção de melatonina, pois este homodímero não possui domínio TAD, e portanto, atua reprimindo a transcrição gênica. De fato, o bloqueio com PDTC ou ALLN da translocação nuclear do NFkB constitutivo em glândulas pineais cultivadas potencia a produção de melatonina induzida por noradrenalina (Ferreira et al., 2005). Este mesmo efeito foi observado pela infusão direta de

corticosterona na glândula pineal por microdiálise (Fernandes et al., 2009) ou pela incubação de pineais com corticosterona, que também bloqueia a via NFkB e promove aumento na síntese de melatonina (Ferreira et al., 2005). Portanto, é possível considerar que esta via é relevante para a função da glândula pineal.

Nossos resultados demonstram que em glândulas pineais controle há apenas a presença de homodímero p50/p50, confirmando dados anteriores obtidos pelo grupo (Cecon et al., 2010). Neste ponto é importante mencionar que a interação de p50/p50 e a formação de um complexo ternário com a proteína BCL-3 permitiria uma regulação transcricional positiva, pois BCL-3 possui TAD (Trinh et al., 2008). Em nossos ensaios de *super-shift* não identificamos a presença da proteína BCL-3, sugerindo portanto, que este homodímero constitutivo atua como repressor da transcrição gênica.

Em extratos de glândulas pineais incubadas com LPS, observamos que a densidade da banda que foi retardada pelo anticorpo anti-p50 é maior que a retardada no grupo controle. Neste sentido, os dados sugerem que LPS promove aumento da translocação nuclear de homodímero p50/p50. Observamos ainda que LPS induz a translocação nuclear da subunidade RelA. Neste sentido, os dados sugerem a indução do heterodímero p50/RelA. Em vista do exposto acima, um mesmo sinal gerado pela ativação de TLR4 desencadeia a translocação nuclear de um dímero de NFkB que atua reprimindo e outro que atua ativando a transcrição gênica. A ativação da translocação nuclear do heterodímero, provavelmente envolve a ativação da via clássica, caracterizada pela fosforilação e degradação da proteína IKB-

alfa, que permite a translocação de p50/RelA. A translocação do homodímero p50/p50 provavelmente envolve a ativação da via atípica.

Modulação da sinalização TNF/TNFR1

O controle transcricional positivo do dímero p50/RelA é o mecanismo pelo qual LPS induz a produção de TNF e TNFR1 em diversos tecidos (Kakizaki et al., 1999; Liu et al., 1999; Li et al., 2004; Shen et al., 2009). A produção de TNF é conhecida por envolver a síntese de uma proteína monomérica transmembrana (mTNF) que é inserida na membrana celular como um homotrímero por uma metaloproteinase, podendo ser clivada pela enzima TACE (do inglês, *TNF alpha converting enzyme*) em um trímero solúvel (sTNF) (revisto por McCoy e Tansey, 2008; Tracey et al., 2008). Nossos dados demonstram que LPS induz a produção de TNF em glândulas pineais cultivadas de maneira transiente, aumentando de valores não detectáveis para máxima detecção após 4 horas de incubação com LPS. Um perfil temporal semelhante já foi observado em outras áreas do SNC como hipófise, córtex, cerebelo, tálamo, núcleo paraventricular e em outros órgãos circunventriculares (Pitossi et al., 1997; Kakizaki et al., 1999; Chakravarty e Herkenham, 2005).

Após a observação de que TNF é produzido na glândula pineal, realizamos experimentos para avaliar se a produção desta citocina é dependente do fator de transcrição NFkB. Nossos resultados demonstram que a inibição desta via com ALLN bloqueia por completo a produção desta

citocina. Este bloqueador é conhecido por impedir a produção de TNF induzida por LPS em diversos tecidos, pois atua inibindo a degradação da proteína inibitória IKB-alfa e impedindo a translocação nuclear do heterodímero p50/RelA (Schow e Joly, 1997; Haas et al., 1998; Zen et al., 1998; Fine et al., 1999). Esta possivelmente é a subunidade responsável pela ativação da produção de TNF.

Na etapa seguinte, analisamos se as células produtoras de melatonina poderiam reconhecer o TNF produzido na glândula. Verificamos que pinealócitos expressam constitutivamente o receptor TNFR1 e, portanto, estas células estão equipadas para reconhecer o TNF. Este receptor é expresso ubiquamente em diversas células e como pode ser ativado tanto pelo sTNF quanto por mTNF, é considerado o principal receptor para o reconhecimento da citocina TNF (McCoy e Tansey, 2008).

Analisamos também os efeitos do LPS sobre a expressão do TNFR1 em pinealócitos. A quantificação da fluorescência relativa demonstra que nos momentos iniciais de incubação com LPS (zero a 120 min) esta endotoxina reduz a expressão de TNFR1. Este efeito do LPS já foi descrito na literatura como sendo dependente da clivagem do TNFR1 e ocorre de maneira rápida como também observado em nossos resultados (Pedron et al., 2003; Wang et al., 2004; Dai et al., 2005). No período subsequente, observamos aumento na expressão de TNFR1 em pinealócitos após 4 horas de incubação com LPS. Curiosamente, a máxima expressão do receptor em pinealócitos é coincidente com a máxima detecção de TNF no meio de cultura. Estes dados sugerem que LPS via p50/RelA modula a transcrição gênica da citocina e de seu receptor, possivelmente como um mecanismo convergente para

amplificar o sinal inicial ativado por LPS, uma vez que a interação TNF-TNFR1 também promove ativação do fator de transcrição NFkB (Kawai e Akira, 2007). Após 6 horas de incubação com LPS, observamos nova redução na expressão do TNFR1 em pinealócitos. Sabidamente, a sinalização ativada pela interação TNF/TNFR1 também envolve a internalização deste complexo e seu envio para lisossomos para degradação do receptor e do ligante (revisto por Tracey et al., 2008). Neste sentido, a atuação autócrina/parácrina do TNF produzido pela glândula pineal explicaria a redução tanto da citocina, quanto do receptor observado após 6 horas de incubação com LPS.

Esta regulação do LPS em promover uma ativação da sinalização autócrina/parácrina do TNF/TNFR1 também já foi observada na medula espinal (Shen et al., 2009), nos gânglios da raiz dorsal (Li et al., 2004) e em outros órgãos circunventriculares (Naudeau e Rivest, 1999). Em vista do exposto acima, nossos resultados sugerem que os efeitos do LPS na modulação da sinalização TNF/TNFR1 é um processo tempo-dependente, assegurando a natureza transiente desta resposta, provavelmente para permitir a máxima resposta do TNF.

Modulação dos produtos da via biossintética de melatonina

Os dados apresentados até o momento apontam para a glândula pineal sendo capaz de reconhecer e gerar uma resposta ao LPS. O reconhecimento de LPS pela pineal não é traduzido apenas em termos de

produção transiente de citocina, mas também no controle da via biossintética de melatonina.

Nossos resultados demonstram que LPS inibe a produção de melatonina e de seu precursor NAS e promove acúmulo de serotonina induzidos por noradrenalina em cultura de glândulas pineais. Em vista do exposto é possível que LPS esteja modulando negativamente a enzima AA-NAT, uma vez que esta enzima é responsável por acetilar serotonina para formar NAS e, por consequência na redução deste substrato, a produção de melatonina seria reduzida.

Anormalidades na secreção rítmica de melatonina são bem documentadas em pacientes com infecção local (Perras et al., 2007) ou sistêmica grave (Mundigler et al., 2002; Olofsson et al., 2004; Perras et al., 2006). É interessante notar os altos níveis de TNF circulantes durante infecção (Zhou et al., 2009). Em processos inflamatórios locais, como mastite, nosso grupo demonstrou a relação entre os níveis circulantes de TNF e baixos níveis de melatonina presentes, enquanto puérperas saudáveis que não apresentavam TNF possuíam o ritmo circadiano característico de melatonina (Pontes et al., 2006, 2007).

De fato, a citocina TNF inibe a produção de NAS na glândula pineal em cultura por bloquear a transcrição gênica da enzima AA-NAT (Fernandes et al., 2006). A análise *in silico* da região regulatória 5'-*upstream* do gene *Aa-nat* demonstra que o promotor deste gene apresenta quatro diferentes sítios *kappa* B (Markus et al., 2007). Portanto, a demonstração de que o fator de transcrição NFkB modula a função pineal, potenciando a síntese de melatonina quando esta via está inibida por corticosterona (Ferreira et al.,

2005) ou bloqueando a síntese quando esta via está ativada por TNF (Fernandes et al., 2006; Fernandes, 2009) também é sugerida neste trabalho como o mecanismo pelo qual LPS suprime a síntese de melatonina na glândula pineal.

A ativação da translocação do NF κ B desencadeada pelo LPS ou pelo TNF envolve a ativação do complexo de quinases IKKs. Estudos demonstraram que na sinalização via TLR4 o complexo de IKKs apresenta atividade bifásica, com uma ativação inicial rápida e de baixa atividade e uma segunda ativação mais prolongada e com maior atividade no período subsequente. Nestes estudos, a utilização de cicloheximida, um bloqueador de síntese protéica, impede o segundo período de ativação do complexo de IKKs, sugerindo que a ativação desse complexo nesta fase é dependente de síntese protéica e que inicialmente LPS induz uma resposta inicial que serve para potenciar o segundo período de ativação do complexo de IKKs (Covert et al., 2005; Werner et al., 2005). Em vista do exposto acima, a inibição da produção de melatonina poderia ser diretamente mediado pelo LPS, via ativação do receptor TLR4 expresso na glândula pineal, ou poderia ser indireta ao induzir a produção de TNF localmente e, via sinalização autócrina/parácrina, esta citocina inibir a síntese de melatonina ao atuar via TNFR1. A demonstração de que glândulas pineais podem produzir a citocina TNF ainda sugere que LPS pode modular a produção de melatonina mesmo quando não houver TNF circulante, pois poderia induzir localmente esta produção para os efeitos autócrinos/parácrinos desta citocina.

Fig. 14. Efeitos do LPS sobre a glândula pineal: LPS atuando em TLR4 ativa o complexo de IKKs que atuam fosforilando as proteínas repressoras que após serem degradadas, permitem a translocação nuclear de p50/p50 e p50/RelA. Uma vez que p50/p50 não possui TAD, esta subunidade poderia atuar no promotor da enzima AA-NAT impedindo sua transcrição gênica. A presença de TAD na subunidade p50/RelA poderia permitir que este dímero de NFκB atuasse no promotor de TNF e TNFR1 ativando sua transcrição. TNF atuando de maneira autócrina/parácrina em seu receptor TNFR1 poderia novamente ativar a translocação nuclear do NFκB. Os efeitos observados sobre os produtos da via biossintética de melatonina são: acúmulo de 5-HT e inibição da produção de melatonina e seu precursor NAS.

Apesar de este trabalho mostrar possíveis pontos de regulação da produção de melatonina na presença de estímulos pró-inflamatórios, ainda há muitos pontos que precisam ser esclarecidos e que permitirão uma melhor compreensão do papel da glândula pineal frente a processos de injúria. Os resultados obtidos na presente dissertação demonstram que a glândula pineal é alvo para LPS. Quando pineais de rato são incubadas com LPS observamos como resposta a produção da citocina TNF via ativação do fator de transcrição NF κ B, modulação da expressão do receptor TNFR1 em pinealócitos e inibição da produção de melatonina, de seu precursor NAS, e consequente acúmulo de 5-HT no meio de cultura. Sem esta inibição, a melatonina poderia impedir a migração de leucócitos para o local de injúria impedindo a montagem da resposta inflamatória. Em resumo, este trabalho corrobora com a hipótese principal de nosso laboratório, onde a comunicação bidirecional entre a glândula pineal e o sistema imune (eixo imune-pineal) é primordial para o sistema de defesa do organismo.

Conclusões

VI. CONCLUSÕES

- 1) A glândula pineal de rato expressa os receptores CD14 e TLR4 de maneira constitutiva. A expressão constitutiva de TLR4 é observada em pinealócitos, microglia e astrócitos.
- 2) LPS promove ativação rápida e transiente do fator de transcrição NFκB. Em glândulas controle observa-se homodímero p50/p50. Na presença de LPS há aumento de homodímero p50/p50 e indução de heterodímero p50/RelA.
- 3) Glândulas pineais de rato cultivadas na presença de LPS produzem a citocina TNF de maneira tempo-dependente, com máxima detecção após 4 horas. Esta produção é dependente da ativação do fator de transcrição NFκB.
- 4) Pinealócitos expressam constitutivamente o receptor TNFR1. Quando estas células são incubadas com LPS observa-se redução na expressão do TNFR1 nos momentos iniciais. Após 4 horas de incubação com LPS a presença desse receptor em pinealócitos é supra-regulado, coincidindo com a máxima detecção de TNF no meio de cultura. Após esta fase a expressão deste receptor é novamente reduzida.
- 5) LPS promove aumento do conteúdo de serotonina e inibe a produção de NAS e melatonina induzidos por noradrenalina em glândulas pineais em cultura.

Os resultados apresentados nesta dissertação permitem concluir que a glândula pineal de ratos está equipada a reconhecer diferentes mediadores inflamatórios, como o componente da membrana de bactérias gram-negativas, LPS, e a citocina TNF. A via do fator de transcrição NF κ B, central nas respostas de montagem de processos inflamatórios, tem se revelado um fator essencial para a modulação da glândula pineal na montagem do processo inflamatório. Em resumo, este trabalho pôde somar aos dados do grupo novas evidências que sugerem que a pineal é modulada por padrões moleculares associados à patógenos. De modo geral, os dados obtidos no presente projeto abrem uma nova perspectiva quanto aos mecanismos moleculares envolvidos na regulação da função da glândula pineal durante a montagem da resposta inflamatória e ainda, perspectivas para avaliação da glândula pineal como sensor de moléculas endógenas que sinalizam dano tecidual. A interação destes DAMPs ao receptor TLR4 permitirá no futuro, compreender o funcionamento da glândula pineal, e a sincronização que esta glândula impõe ao organismo frente a diferentes processos fisiopatológicos, como doenças neurodegenerativas e auto-imunes.

VII. RESUMO

O fator de transcrição nuclear *kappa* B (NFkB), central na resposta inflamatória, é constitutivamente expresso em glândulas pineais de rato. A inibição da translocação nuclear deste fator em pineais de rato por corticosterona potencia, enquanto que a inibição pela citocina fator de necrose tumoral (TNF) inibe a síntese de melatonina por inibição da transcrição da *Aa-nat*. Esta redução da produção noturna de melatonina está implicada em favorecer a montagem da resposta inflamatória. Embora dados da literatura sugerirem redução da produção de melatonina durante processos infecciosos, não há evidências diretas da habilidade da glândula pineal em reconhecer o lipopolissacarídeo (LPS), a endotoxina da membrana de bactérias gram-negativas. Esta dissertação investigou se a glândula pineal de ratos expressa receptores para o reconhecimento do LPS e estabeleceu possíveis mecanismos de ação desta endotoxina na glândula pineal de ratos. Nossos resultados demonstram que a glândula pineal expressa de maneira constitutiva os receptores CD14 e o TLR4. LPS induz a translocação nuclear dos dímeros p50/p50 e p50/RelA e a síntese de TNF em glândulas cultivadas. A máxima produção de TNF no meio de cultura é coincidente com a máxima expressão do receptor TNFR1 em pinealócitos. Além disso, LPS inibe a síntese de N-acetilserotonina e melatonina. Em conclusão, neste estudo, demonstramos que a pineal é alvo para o componente de bactérias gram-negativas LPS, reforçando a proposta de que esta glândula reconhece e gera respostas a moléculas que sinalizam a montagem da resposta inflamatória.

VIII. ABSTRACT

Nuclear factor-kappa B (NFkB), a pivotal player in inflammatory responses, is constitutively expressed in the pineal gland. Corticosterone inhibits pineal NFkB leading to an enhancement of melatonin production, while tumor necrosis factor (TNF) leads to inhibition of *Aa-nat* transcription and the production of N-acetylserotonin (NAS) in cultured glands. The reduction of nocturnal melatonin surge favors the mounting of the inflammatory response. Despite these data, there is no clear evidence of the ability of the pineal gland to recognize molecules that signal infection. This study investigated whether the rat pineal gland expresses receptors for lipopolysaccharide (LPS), the endotoxin from the membranes of gram-negative bacteria, and to establish the mechanism of action of LPS. Here we show that pineal glands possess both CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4), membrane proteins that bind LPS and trigger the NFkB pathway. LPS induced the nuclear translocation of p50/p50 and p50/RELA dimers and the synthesis of TNF. The maximal expression of TNF in cultured glands coincides with an increase in the expression of TNF receptor 1 (TNFR1) in isolated pinealocytes. In addition, LPS inhibited the synthesis of N-acetylserotonin and melatonin. Therefore, the pineal gland transduces gram-negative endotoxin stimulation by producing TNF and inhibiting melatonin synthesis. Here we provide evidence to reinforce the idea of an immune-pineal axis, showing that the pineal gland is a constitutive player in the innate immune response.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APETOH L., GHIRINGHELLI F., TESNIERE A., CRIOLLO A., ORTIZ C., LIDEREAU R., MARIETTE C., CHAPUT N., MIRA JP., DELALOGUE S., ANDRÉ F., TURSZ T., KROEMER G., ZITVOGEL L. (2007). The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol Rev.* **220**: 47-59.
- ARENDT J. (2009). Managing jet lag: some of the problems and possible new solutions. *Sleep Med Rev.* **13**:249-256.
- ARMELIN MA. Caracterização dos efeitos de LPS em pinealócitos de rato em cultura. 2009. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Fisiologia). Instituto de Biociências, USP, São Paulo, 2009.
- ARROYO-ESPLIGUERO R., AVANZAS P., JEFFERY S., KASKI JC. (2004). CD14 and Toll-like receptor 4: a link between infection and acute coronary events? *Heart.* **90**: 983-988.
- AXELROD J., SHEIN HM., WURTMAN RJ. (1969). Stimulation of C14-melatonin synthesis from C14-tryptophan by noradrenaline in rat pineal in organ culture. *Proc Natl Acad Sci USA.* **62**: 544-549.
- BAEUEERLE PA. (1998). IkappaB–NF-kappaB structures: at the interface of inflammation control. *Cell.* **95**:729-731.
- BALER R., COVINGTON S., KLEIN DC. (1997). The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter. cAMP activation via a cAMP-responsive element-CCAAT complex. *J Biol Chem.* **272**:6979-6985.
- BALISTRERI CR., CANDORE G., LISTÌ F., FAZIO T., GANGI S., INCALCATERRA E., CARUSO M., VECCHI ML., LIO D., CARUSO C. (2007). Role of TLR4

- polymorphism in inflammatory responses: implications for unsuccessful aging. *Ann N Y Acad Sci.* **1119**: 203-207.
- BALISTRERI CR., COLONNA-ROMANO G., LIO D., CANDORE G., CARUSO C. (2009). TLR4 polymorphisms and ageing: implications for the pathophysiology of age-related diseases. *J Clin Immunol.* **29**:406-415.
- BARTON GM., MEDZHITOV R. (2003). Toll-like receptor signaling pathways. *Science.* **300**:1524-1525.
- BEINKE S., LEY SC. (2004). Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J.* **382**:393-409.
- BENI SM., KOHEN R., REITER RJ., TAN DV., SHOHAMI E. (2003). Melatonin-induced neuroprotection after closed head injury is associated with increase brain antioxidants and attenuated late-phase activation of NF-kappaB and AP-1. *FASEB J.* **18**:149-151.
- BENÍTEZ-KING G., HUERTO-DELGADILLO L., ANTÓN-TAY F. (1993). Binding of 3H-melatonin to calmodulin. *Life Sci.* **53**:201-207.
- BEUTLER B. (2000). Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol.* **12**:20-26.
- BHAKAR AL., TANNIS LL., ZEINDLER C., RUSSO MP., JOBIN C., PARK DS., MACPHERSON S., BARKER PA. (2002). Constitutive nuclear factor-kappa B activity is required for central neuron survival. *J Neuroscience.* **22**:8466-8475.
- BONIZZI G., KARIN M. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* **25**:280-288.
- BOSSHART H., HEINZELMANN M. (2007). Targeting bacterial endotoxin: two sides of a coin. *Ann N Y Acad Sci.* **1096**:1-17.
- BROWN WH., PEARCE L., VAN ALLEN CM. (1925). Organ weights of normal rabbits. *J Exp Med.* **42**:69-82.

- BUBENIK GA. (2002). Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig Dis Scie.* **47**:2336-2348.
- CARLOTTI F., DOWER SK., QWARNSTROM EE. (2000). Dynamic shuttling of nuclear factor kappa B between the nucleus and cytoplasm as a consequence of inhibitor dissociation. *J Biol Chem.* **275**:41028-41034.
- CARRILO-VICO A., CALVO JR., ABREU P., LARDONE PJ., GARCÍA-MAURIÑO S., REITER RJ., GUERRERO JM. (2004). Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.* **18**:537-539.
- CARRILLO-VICO A., GUERRERO JM., LARDONE PJ., REITER RJ. (2005a). A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine.* **27**: 189-200.
- CARRILO-VICO A., LARDONE PJ., NAJI L., FERNÁNDEZ-SANTOS JM., MARTÍN-LACAVE I., GUERRERO JM., CALVO JR. (2005b). 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.
- CECON E., FERNANDES PA., PINATO L., FERREIRA ZS., MARKUS RP. (2010). Daily variation of constitutively activated nuclear factor kappa B (NFkB) in rat pineal gland. *Chronobiol Int.* **27**:52-67.
- CHAKRAVARTY S., JERKENHAM M. (2005). Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustain CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines. *J Neuroscience.* **25**: 1788-1796.
- CHEN LF., GREENE WC. (2004). Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell.* **5**:392-401.

- CHOW JC., YOUNG DW., GOLENBOCK DT., CHRIST WJ., GUSOVSKY F. (1999). Toll-like receptor-4 mediates Lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem.* **274**:10689-10692.
- CHUNG YH., JHUN BH., RYU SC., KIM HS., KIM CM., KIM YO., LEE SJ. (2007). STP-C an oncoprotein of herpesvirus saimiri augments the activation of NF-kappaB through ubiquitination of TRAF6. *J Biochem Mol Biol.* **40**:341-348.
- COON SL., ROSEBOOM PH., BALER R., WELLER JL., NAMBOODIRI MA., KOONIN EV., KLEIN DC. (1995). Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. *Science.* **270**:1681-1683.
- COON SL., DEL OLMO E., YOUN WS 3rd., KLEIN DC. (2002). Melatonin synthesis enzyme in macaca mulatta: focus on arylalkylamine N-acetyltransferase (EC2.3.1.87). *J Clin endocrinol Metab.* **87**:4699-4706.
- COOPER ER. (1932). The human pineal gland and pineal cysts. *J Anat.* **67**:28-46.
- COVERT MW., LEUNG TH., GASTON JE., BALTIMORE D. (2005). Achieving stability of Lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation. *Science.* **309**:1854-1857.
- DAI H., GUZMAN J., CHEN B., COSTABEL U. (2005). Production of soluble tumor necrosis factor receptors and tumor necrosis-alpha by alveolar macrophages in sarcoidosis and extrinsic allergic alveolitis. *Chest.* **127**:251-256.
- DEGUCHI T., AXELROD J. (1972). Control of circadian change of serotonin N-acetyltransferase activity in the pineal organ by the beta-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci.* **69**:2547-2550.
- DOBRZANSKI P., RYSECK RP., BRAVO R. (1995). Specific inhibition of RelB/p52 transcriptional activity by the C-terminal domain of p100. *Oncogene* **10**:1003-1007.

- DOYLE SL., O'NEILL LA. (2006). Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol.* **72**:1102-1113.
- DRIJFHOUT WJ., VAN DER LINDE AG., KOOI SE., GROL CJ., WESTERINK BH. (1996). Norepinephrine release in the rat pineal gland: the input from the biological clock measured by in vivo microdialysis. *J Neurochem.* **66**: 748-755.
- DUBOCOVICH ML., DELAGRANGE P., KRAUSE DN., SUGDEN D., CARDINALI DP., OLCESE J. (2010). International Union of Basic and clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev.* (in press).
- DUVERNOY HM., RISOLD PY. (2007). The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain Res Rev.* **56**:119-147.
- ERLICH SS., APUZZO ML. (1985). The pineal gland: anatomy, physiology and clinical significance. *J Neurosurg.* **63**: 321-341.
- ERIDGE C. (2010). Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *J Leukoc Biol.* **87**:989-999.
- FERNANDES PA., CECON E., MARKUS RP., FERREIRA ZS. (2006). Effect of TNF-alpha on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a 'feedback' of the immune response on circadian timing. *J Pineal Res.* **41**:344-250.
- FERNANDES PA., BOTHOREL B., CLESSE D., MONTEIRO AW., CALGARI C., RAISON S., SIMONNEAUX V., MARKUS RP. (2009). Local corticosterone infusion enhances nocturnal pineal melatonin production in vivo. *J Neuroendocrinol.* **21**:90-97.

- FERNANDES PA. Regulação da produção hormonal da glândula pineal de ratos por moduladores do processo inflamatório. 2009. 142F. Tese (Doutorado em Ciências – Fisiologia). Instituto de Biociências, USP, São Paulo, 2009.
- FERREIRA ZS., CIPOLLA-NETO J., MARKUS RP. (1994). Presence of P2-purinoceptors in the rat pineal gland. *Br J Pharmacol.* **112**:107-110.
- FERREIRA ZS., MARKUS RP. (2001). Characterization of P2Y(1)-like receptors in cultured rat pineal glands. *Eur J Pharmacol.* **415**:151-156.
- FERREIRA ZS., GARCIA CR., SPRAY DC., MARKUS RP. (2003). P2Y(1) receptor activation enhances the rate of rat pinealocytes-induced extracellular acidification via calcium-dependent mechanism. *Pharmacology.* **69**:33-37.
- FERREIRA ZS., FERNANDES PA., DUMA D., ASSREUY J., AVELLAR MC., MARKUS RP. (2005). Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. *J Pineal Res.* **38**:182-188.
- FERREIRO DU., KOMIVES EA. (2010). Molecular mechanisms of system control of NF-kappaB signaling by IkappaBalpha. *Biochemistry.* **49**:1560-1567.
- FINE SM., MAGGIRWAR SB., ELLIOT PR., EPSTEIN LG., GELBARD HA., DEWHURST S. (1999). Proteasome blockers inhibit TNF-alpha release by Lipopolysaccharide stimulated macrophages and microglia: implications for HIV-1 dementia. *J Neuroimmunol.* **95**:55-64.
- FITZGERALD KA., PALSSON-MCDERMOTT EM., BOWIE AG., JEFFERIES CA., MANSELL AS., BRADY G., BRINT E., DUNNE A., GRAY P., HARTE MT., MCMURRAY D., SMITH DE., SIMS JE., BIRD TA., O'NEILL LA. (2001). Mal (MyD88-adaptor-like) is required for toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature.* **413**:78-83.
- FRIDMACHER V., KALTSCHMIDT B., GOUDEAU B., NDIAYE D., ROSSI FM., PFEIFFER J., KALTSCHMIDT C., ISRAEL A., MÉMET S. (2003). Forebrain-

- specific neuronal inhibition of nuclear factor-kappaB activity leads to loss of neuroprotection. *J Neurosci.* **23**: 9403-0408.
- GANGULY S., GASTEL JA., WELLER JL., SCHWARTZ C., JAFFE H., NAMBOODIRI MA., COON SL., HICKMAN AB., ROLAG M., OBSIL T., BEAUVERGER P., FERRY G., BOUTIN JA., KLEIN DC. (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.
- GANGULY S., COON SL., KLEIN DC. (2002). Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell Tissue Res.* **309**:127-137.
- GASTEL JA., ROSEBOOM PH., RINALDI PA., WELLER JL., KLEIN DC. (1998). Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science.* **279**: 1358-1360.
- GAUER F., CRAFT CM. (1996). Circadian regulation of hydroxyindole-O-methyltransferase mRNA levels in rat pineal and retina. *Brain Res.* **737**:99-109.
- GAY NJ., GANGLOFF M. (2007). Structure and function of toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem.* **76**:141-165.
- GHOSH S., HAYDEN MS. (2008). New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol.* **8**:837-848.
- GILAD E., WONG HR., ZINGARELLI B., VIRÁG L., O'CONNOR M., SALZMAN AL., 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.
- GÓMEZ-CORVERA A., CERRILLO I., MOLINERO P., NARANJO MC., LARDONE PJ., SANCHEZ-HIDALGO M., CARRASCOSA-SALMORAL MP., MEDRANO-CAMPILLO P., GUERRERO JM., RUBIO A. (2009). Evidence of immune

- system melatonin production by two pineal melatonin deficient mice, C57BL/6 and swiss strains. *J Pineal Res.* **47**:15-22.
- GRAHAM B., GIBSON SB. (2005). The two faces of NFkappaB in cell survival responses. *Cell Cycle.* **4**:1342-1345.
- GRILLI M., GOFFI F., MEMO M., SPANO P. (1996). Interleukin-1beta and glutamate activate the NF-kappaB/Rel binding site from the regulatory region of the amyloid precursor protein gene in primary neuronal cultures. *J Biol Chem.* **271**: 15992-15007.
- HÄCKER H., KARIN M. (2006). Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE.* **357**:re13.
- HARMOUCH A., GUERRERO JM., OSUNA C. (1994). Different sensitivity of rat pineal N-acetyltransferase to alpha- and beta-adrenergic receptor agonists during development: in vitro studies. *Neurosci Lett.* **182**:303-305.
- HAAS M., PAGE S., PAGE M., NEUMANN FJ., MARX N., ADAM M., ZIEGLER-HETBROCK HW., NEUMEIER D., BRAND K (1998). Effect of proteasome inhibitors on monocytic IkappaB-alpha and -beta depletion, NF-kappaB activation, and cytokine production. *J Leukoc Biol.* **63**:395-404.
- HIGLEY HR., MCNULTY JA., ROWDER G. (1984). Glial fibrillary acidic protein and S-100 protein in pineal supportive cells: an electron microscopic study. *Brain Res.* **304**: 117-120.
- HO AK., THOMAS TP., CHIK CL., ANDERSON WB., KLEIN DC. (1988). Protein kinase C: subcellular redistribution by increased Ca²⁺ influx. Evidence that potentiation of beta-adrenergic stimulation of pineal cAMP and cGMP by K⁺ and A23187. *J Biol Chem.* **263**:9292-9297.
- HOFFMANN A., LEVCHENKO A., SCOTT ML., BALTIMORE D. (2002). The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science.* **298**:1241-1245.

- HOFFMANN A., BALTIMORE D. (2006). Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunol Rev.* **210**:171-186.
- HOSHINO K., TAKEUCHI O., KAWAI T., SANJO H., OGAWA T., TAKEDA Y., TAKEDA K., AKIRA S. (1999). Cutting edge: toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to Lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol.* **162**:3749-3752.
- HREGGVIDSDOTTIR HS., OSTBERG T., WÄHÄMAA H., SCHIERBECK H., AVEBERGER AC., KLEVENVALL L., PALMBLAD K., OTTOSSON L., ANDERSSON U., HARRIS HE. (2009). The alarmin HMGB1 acts in synergy with endogenous and exogenous danger signals to promote inflammation. *J Leukoc Biol.* **86**:655-662.
- HUANG SK., NOBILING R., SCHACHNER M., TAUGNER R. (1984). Interstitial and parenchymal cells in the pineal gland of the golden hamster. A combined thin-section, freeze-fracture and immunofluorescence study. *Cell Tissue Res.* **235**: 327-337.
- HUANG TT., WUERZBERGER-DAVIS SM., SEUFZER BJ., SHUMWAY SD., KURAMA T., BOOTHMAN DA., MIYAMOTO S. (2000). NF-kappaB activation by camptothecin. A linkage between nuclear DNA damage and cytoplasmic signaling events. *J Biol Chem.* **275**:9501-9509.
- HUANG TT., MIYAMOTO S. (2001). Postrepression activation of NF-kappaB requires the amino-terminal nuclear export signal specific to IkappaBalpha. *Mol Cell Biol.* **21**:4737-4747.
- HUSEBYE H., HALAAS O., STENMARK H., TUNHEIM G., SANDANGER O., BOGEN B., BRECH A., LATZ E., ESPEVIK T. (2006). Endocytic pathways regulate toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J.* **25**:683-692.

- HUYTON T., ROSSJOHN J., WILCE M. (2007). Toll-like receptors: structural pieces of a curve-shaped puzzle. *Immunol cell Biol.* **85**:406-410.
- JIANG-SHIEH YF., WY CH., CHANG ML., SHIEH JY., WEN CY. (2003). Regional heterogeneity in immunoreactive macrophages/microglia in the rat pineal gland. *J Pineal Res.* **35**:45-53.
- JIANG-SHIEH YF., WU., CHEIN HF., WEI TH., CHANG ML., SHIEH JY., WEN CY., (2005). Reactive changes of interstitial glia and pinealocytes in the rat pineal gland challenged with cell wall components from gram-positive and -negative bacteria. *J Pineal Res.* **38**:17-26.
- JIMENEZ-JORGE S., GUERRERO JM., JIMENEZ-CALIANI AL., NARANJO MC., LARDONE PJ., CARRILO-VICO A., OSUNA C., MOLINERO P. (2007). Evidence for melatonin synthesis in the rat brain during development. *J Pineal Res.* **42**:240-246.
- JOHNSTON JD., BASHFARTH R., DIACK A., ANDERSSON H., LINCOLN GA., HAZLERIGG DG. (2004). Rhythmic melatonin secretion does not correlate with the expression of arylalkylamine N-acetyltransferase, inducible cyclic AMP early repressor, period 1 or cryptochrome1 mRNA in the sheep pineal. *Neuroscience.* **124**:789-795.
- JOU I., LEE JH., PARK SY., YOON HJ., JOW EH., PARK EJ. (2006). Gangliosides trigger inflammatory responses via TLR4 in brain glia. *Am J Pathol.* **168**:1619-1630.
- KAGEN JC., SU T., HOMG T., CHOW A., AKIRA S., MEDZHITOV R. (2008). TRAM couples endocytosis of toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat. Immunol.* **9**:361-368.
- KAKIZAKI Y., WATANOBE H., KOHSAKA A., SUDA T. (1999). Temporal profiles of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in the plasma and hypothalamic paraventricular nucleus after intravenous or

- intraperitoneal administration of Lipopolysaccharide in the rat: estimation by push-pull perfusion. *Endocr J.* **46**:487-496.
- KALSBEEK A., GARIDOU ML., PALM IF., VAN DER VLIET J., SIMONNEAUX V., PÉVET P., BUIJS RM. (2000). Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *Eur J Neurosci.* **12**: 3146-3154.
- KALSBEEK A., PERREAU-LENZ S., BUIJS RM. (2006). A network of (autonomic) clock outputs. *Chronobiol Int.* **23**: 521-535.
- KALTSCHMIDT B., KALTSCHMIDT C. (2000). Constitutive NF-kappa B activity is modulated via neuron-astroglia interaction. *Exp Brain Res.* **130**:100-104.
- KALTSCHMIDT B., WIDERA D., KALTSCHMIDT C. (2000). Signaling via NF-kappaB in the nervous system. *Biochem Biophys Acta.* **1745**:287-299.
- KAPPERS JA. (1960). The development, topographical relations and enervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* **52**:163-215.
- KARASEK M., REITER RJ. (1992). Morphofunctional aspects of the mammalian pineal gland. *Microsc Res Tech.* **21**:136-157.
- KARIN M., BEN-NERIAH Y. (2000). Phosphorilation meets ubiquitination: the control of NF-kappaB activity. *Annu Rev Immunol.* **18**:621-663.
- KAUR C., LING EA. (2008). Antioxidants and neuroprotection in the adult and developing central nervous system. *Curr Med Chem.* **15**:3068-3080.
- KAUR C., SIVAKUMAR V., LING EA. (2005). Expression of N-methyl-D-aspartate (NMDA) and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) GluR2/3 receptors in the developing rat pineal gland. *J Pineal Res.* **39**: 294-301.
- KAWAI T., AKIRA S. (2007). Signaling to NF-kappaB by toll-like receptors. *Trends Mol Med.* **13**:460-469.

- KENNY EF., O'NEILL LA. (2008). Signaling adaptors used by toll-like receptors: an update. *Cytokine*. **43**:342-349.
- KING TS., STEINLECHNER S., REITER RJ. (1984). Does maximal serotonin N-acetyltransferase activity necessarily reflect maximal melatonin production in the rat pineal gland?. *Neurosci Lett*. **48**:343-347.
- KITCHENS RL., MUNFORD RS. (1998). CD14-dependent internalization of bacterial Lipopolysaccharide (LPS) is strongly influenced by LPS aggregation but not by cellular responses to LPS. *J Immunol*. **160**:1920-1928.
- KLEIN DC., WELLER JL. (1970). Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science*. **169**:1093-1095.
- KLEIN DC., SUGDEN D., WELLER JL. (1983). Postsynaptic alpha-adrenergic receptors potentiate the beta-adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **80**: 599-603.
- KLEIN DC. (1999). Serotonin N-acetyltransferase. A personal historical perspective. *Adv Exp Med Biol*. **460**:5-16.
- KLINKE DJ 2nd., USTYUGOVA IV., BRUNDAGE KM., BARNETT JB. (2008). Modulating temporal control of NF-kappaB activation: implications for therapeutic and assay selection. *Biophys J*. **94**:4249-4259.
- KOBAYASHI T., WALSH MC., CHOI Y. (2004). The role of TRAF6 in signal transduction and the immune response. *Microbes Infect*. **6**:1333-1338.
- KOCH M., MAUHIN V., STEHLE JH., SCHOMERUS C., KORF HW. (2003). Dephosphorylation of pCREB by protein serine/threonine phosphatases is involved in inactivation of Aanat gene transcription in rat pineal gland. *J Neurochem*. **85**:170-179.
- KONTUREK SJ., KONTUREK PC., BRZozowski T., BUBENIK GA. (2007). Role of melatonin in upper gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol*. **6**:23-52.

- KUMAR A., TAKADA Y., BORIEK AM., AGGARWAL BB. (2004). Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med.* **82**:434-448.
- LAFLAMME N., RIVEST S. (2001). Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB J.* **15**:155-163.
- LANDRETH GE., REED-GEAGHAN EG. (2009). Toll-like receptors in Alzheimer's disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* **336**:137-153.
- LANDSTRÖM N. (2010). The TAK1-TRAF6 signalling pathway. *Int J Biochem Cell Biol.* **42**:585-589.
- LARDONE PJ., CARRILLO-VICO A., NARANJO MC., DE FELIPE B., VALLEJO A., KARASEK M., GUERRERO JM. (2006). Melatonin synthesized by Jurkat human leukemic T cell line is implicated in IL-2 production. *J Cell Physiol.* **206**:273-279.
- LEE KM., SEONG SY. (2009). Partial role of TLR4 as a receptor responding to damage-associated molecular pattern. *Immunol Lett.* **125**:31-39.
- LEHNARDT S., MASSILLON L., FOLLETT P., JENSEN FE., RATAN R., ROSENBER PA., VOLPE JJ., VARTANIAN T. (2003). Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**:8514-8519.
- LENARDO M., SIEBENLIST U. (1994). Bcl-3-mediated nuclear regulation of the NF-kappa B trans-activating factor. *Immunol Today.* **15**:145-147.
- LERNER AB., CASE JD., TAKAHASHI Y. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc.* **80**:2587.
- LERNER AB., CASE JD., HEINZELMAN RV. (1959). Structure of melatonin. *J Am Chem Soc.* **81**:6084-6085.

- LI R., YANG L., LINDHOLM K., KONISHI Y., YUE X., HAMPEL H., ZHANG D., SHEN Y. (2004). Tumor necrosis factor death receptor signaling cascade is required for amyloid-beta protein-induced neuron death. *J Neurosci.* **24**:1760-1771.
- LI YN., WIN XJ., KUANG F., WU R., DUAN XL., JU G., WANG BR. (2008). Alterations of Fc gamma receptor I and Toll-like receptor 4 mediate the antiinflammatory actions of microglia and astrocytes after adrenaline-induced blood-brain barrier opening in rats. *J Neurosci Res.* **86**:3556-3565.
- LI Z., NICKKHOLGH A., YI X., BRUNS H., GROSS ML., HOFFMANN K., MOHR E., ZORN M., BUCHLER MW., SCHEMMER P. (2009). Melatonin protects kidney grafts from ischemia/reperfusion injury through inhibition of NF-kB and apoptosis after experimental kidney transplantation. *J Pineal Res.* **46**:365-372.
- LIOU HC., HSIA CY. (2003). Distinctions between c-Rel and other NF-kappaB proteins in immunity and disease. *Bioessays.* **25**:767-780.
- LIU SF., YE X., MALIK AB. (1999). Inhibition of NF-kappaB activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents In vivo expression of proinflammatory genes. *Circulation.* **100**:1330-1337.
- LOPES C., DELYRA JL., MARKUS RP., MARIANO M. (1997). Circadian rhythm in experimental granulomatous inflammation is modulated by melatonin. *J Pineal Res.* **23**:72-78.
- LOPES C., MARIANO M., MARKUS RP. (2001). Interaction between the adrenal and the pineal gland in chronic experimental inflammation induced by BCG in mice. *Inflamm Res.* **50**:6-11.
- LU YC., YEH WC., OHASHI PS. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* **42**:145-151.

- LUO ZR., SCHULTZ RL., WHITTER EF., VOLLRATH L. (1984). Ultrastructural characterization of glial cells in the rat pineal gland with special reference to the pineal stalk. *Anat Rec.* **210**:663-674.
- MACLOSKIE G. (1887). Pineal eye of lizard. *Science.* **10**:10.
- MALDONADO MD., MORA-SANTOS M., NAJI L., CARRASCOSA-SALMORAL MP., NARANJO MC., CALVO JR. (2010). Evidence of melatonin synthesis and release by mast cells. Possible modulatory role on inflammation. *Pharmacol Res.* **62**:282-287.
- MALEK S., CHENY., HUXFORD T., GHOSH G. (2001). IkappaBbeta, but not IkappaBalpha, functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF-kappaB dimers by masking both NF-kappaB nuclear localization sequences in resting cells. *J Biol Chem.* **276**:45225-45235.
- MARKUS RP., FERREIRA ZS., FERNANDES PA., CECON E. (2007). The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *Neuroimmunomodulation.* **14**:126-133.
- MARKUS RP., SILVA CL., FRANCO DG., BARBOSA EM JR., FERREIRA ZS. (2010). Is modulation of nicotinic acetylcholine receptors by melatonin relevant for therapy with cholinergic drugs? *Pharmacol Ther.* **126**:251-262.
- MARONDE E., WICHT H., TASKÉN K., GENIESER HG., DEHGHANI F., OLCESE J., KORF HW. (1999). CREB phosphorylation and melatonin biosynthesis in the rat pineal gland: involvement of cyclic AMP dependent protein kinase type II. *J Pineal Res.* **27**:170-182.
- MATSUSHIMA S., REITER RJ. (1975). Ultrastructural observations at pineal gland capillaries in four rodent species. *Am J Anat.* **143**:265-181.
- MCCOY MK., TANSEY MG. (2008). TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation.* **5**:45.

- MCGETTRICK AF., O'NEILL LA. (2010). Regulators of TLR4 signaling by endotoxins. *Subcell Biochem.* **53**:153-171.
- MEFFORD IN., CHANG P., KLEIN DC., NAMBOODIRI MA., SUGDEN D., BARCHAS J. (1983). Reciprocal day/night relationship between serotonin oxidation and N-acetylation products in the rat pineal gland. *Endocrinology.* **113**:1582-1586.
- MÍGUEZ JM., RECIO J., SÁNCHEZ-BARCELÓ E., ALDEGUNDE M. (1998). Changes with age in daytime and nighttime contents of melatonin, indoleamines, and catecholamines in the pineal gland: a comparative study in rat and Syrian hamster. *J Pineal Res.* **25**:106-115.
- MØLLER M., INGILD A., BOCK E. (1978). Immunohistochemical demonstration of S-100 protein and GFA protein in interstitial cells of rat pineal gland. *Brain Res.* **140**:1-13.
- MØLLER M., RAVAUULT JP., COZZI B. (1996). The chemical neuroanatomy of the mammalian pineal gland: neuropeptides. *Neurochem Int.* **28**:23-33.
- MØLLER m., BAERES FM. (2002). The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res.* **309**:139-150.
- MORTANI-BARBOSA EJ., FERREIRA ZS., MARKUS RP. (2000). Purinergic and noradrenergic cotransmission in the rat pineal gland. *Eur J Pharmacol.* **401**:59-62.
- MÜLLER CW., HARRISON SC. (1995). The structure of the NF-kappa B p50:DNA-complex: a starting point for analyzing the Rel family. *FEBS Lett.* **369**: 113-117.
- MUNDIGLER G., DELLE-KARTH G., KORENY M., ZEHETGRUBER M., STEINDLMUNDA P., MARKTL W., FERTI L., SIOSTRZONEK P. (2002). Impaired circadian rhythm of melatonin secretion in sedated critically ill patients with severe sepsis. *Crit Care Med.* **30**:536-540.

- NARANJO MC., GUERRERO JM., RUBIO A., LARDONE PJ., CARRILLO-VICO A., CARRASCOSA-SAMORAL MP., JIMÉNEZ-JORGE S., ARELLANO MV., LEAL-NOVAL SR., LEAL M., LISSEN E., MOLINERO P. (2007). Melatonin biosynthesis in the thymus of humans and rats. *Cell Mol Life Sci.* **64**:781-790.
- NATOLI G., CHIOCCA S. (2008). Nuclear ubiquitin ligases, NF-kappaB degradation, and the control of inflammation. *Sci Signal.* **8**:Pe1.
- NATOLI G., SACCANI S., BOSISIO D., MARAZZI I. (2005). Interactions of NF-kappaB with chromatin: the art of being at the right place at the right time. *Nat Immunol.* **6**:439-445.
- NADEAU S., RIVEST S. (1999). Effects of circulating tumor necrosis factor on the neuronal activity and expression of the genes encoding the tumor necrosis factor receptors (p55 and p75) in the rat brain: a view from the blood-brain barrier. *Neuroscience.* **93**:1449-1464.
- NELSON G., PARAOAN L., SPILLER DG., WILDE GJ., BROWNE MA., DJALI PK., UNITT JF., SULLIVAN E., FLOETTMANN E., WHITE MR. (2002). Multi-parameter analysis of the kinetics of NF-kappaB signalling and transcription in single living cells. *J Cell Sci.* **115**:1137-1148.
- NELSON DE., IHEKWABA AE., ELLIOTT M., JOHNSON JR., GIBNEY CA., FOREMAN BE., NELSON G., SEE V., HORTON CA., SPILLER DG., EDWARDS SW., MCDOWELL HP., UNITT JF., SULLIVAN E., GRIMLEY R., BENSON N., BROOMHEAD D., KELL DB., WHITE MR. (2004). Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science.* **306**:704-708.
- NEUMANN M., NAUMANN M. (2007). Beyond IkappaBs: alternative regulation of NF-kappaB activity. *FASEB J.* **21**:2642-2654.

- O'NEILL LA., KALTSCHMIDT C. (1997). NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci.* **20**:252-258.
- O'NEILL LA., BOWIE AG. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* **7**: 353-364.
- OLOFSSON K., ALLING C., LUNDBERG D., MALMROS C. (2004). Abolished circadian rhythm of melatonin secretion in sedated and artificially ventilated intensive care patients. *Acta Anaesthesiol Scand.* **48**:679-684.
- OSBORN HF. (1887). A pineal eye in the mesozoic Mammalia. *Science.* **9**:92.
- OSBORN HF. (1887). A The pineal eye in Tritylodon. *Science.* **9**:114.
- PALMER S., CHEN YH. (2008). Bcl-3, a multifaceted modulator of NF-kappaB-mediated gene transcription. *Immunol Res.* **42**:210:218.
- PANDI-PERUMAL SR., SRINIVASAN V., MAESTRONI GJ., CARDINALI DP., POEGGELER B., HARDELAND R. (2006). Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J.* **273**:2813-2838.
- PANDI-PERUMAL SR., TRAKHT I., SRINIVASAN V., SPENCE DW., MAESTRONI GJ., ZISAPEL N., CARDINALI DP. (2008). Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol.* **85**:335-353.
- PANGERL B., PANGERL A., REITER RJ. (1990). Circadian variations of adrenergic receptors in the mammalian pineal gland: a review. *J Neural Transm Gen Sect.* **81**:17-29.
- PAPASOZOMENOS SC. (1983). Glial fibrillary acidic (GFA) protein-containing cells in the human pineal gland. *J Neuropathol Exp Neurol.* **42**:391-408.
- PARFITT A., WELLER JL., KLEIN DC. (1976). Beta adrenergic-blockers decrease adrenergically stimulated N-acetyltransferase activity in pineal glands in organ culture. *Neuropharmacology.* **15**:353-358.

- PARK HS., JUNG HY., PARK EY., KIM J., LEE WJ., BAE YS. (2004). Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J Immunol.* **173**:3589-3593.
- PEDERSEN EB., FOX LM., CASTRO AJ., MCNULTY JA. (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.
- PEDERSEN EB., MCNULTY JA., CASTRO AJ., FOX LM., ZIMMER J., FINSEN B. (1997). Enriched immune-environment of blood-brain barrier deficient areas of normal adult rats. *J Neuroimmunol.* **76**:117-131.
- PEDRON T., GIRARD R., CHABY R. (2003). TLR4-dependent lipopolysaccharide-induced shedding of tumor necrosis factor receptors in mouse bone marrow granulocytes. *J Biol Chem.* **278**:20555-20564.
- PERRAS B., KUROWSKI V., DODT C. (2006). Nocturnal melatonin concentration is correlated with illness severity in patients with septic disease. *Intensive Care Med.* **32**:624-625.
- PERRAS B., MEIER M., DODT C. (2007). Light and darkness fail to regulate melatonin release in critically ill humans. *Intensive Care Med.* **33**:1954-1958.
- PITOSI F., DEL REY A., KABIERSCH A., BESEDOVSKY H (1997). Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following peripheral administration of endotoxin to mice. *J Neurosci Res.* **48**:287-298.
- PONTES GN., CARDOSO EC., CARNEIRO-SAMPAIO MM., MARKUS RP. (2006). Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) - melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. *J Pineal Res.* **41**:136-141.

- PONTES GN., CARDOSO EC., CARNEIRO-SAMPAIO MM., MARKUS RP. (2007). Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF-alpha increase after cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. *J Pineal Res.* **43**:365-371.
- PROVENCIO I., RODRIGUEZ IR., JUANG G., HAYES WP., MOREIRA EF., ROLLAG MD. (2000). A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci.* **20**:600-605.
- QUAY WB. (1970). Effects of the mammalian pineal. *Am Zool.* **10**:237-246.
- QUIVY V., VAN LINT C. (2004). Regulation at multiple levels of NF-kappaB-mediated transactivation by protein acetylation. *Biochem Pharmacol.* **68**:1221-1229.
- REITER RJ. (1973). Comparative physiology: pineal gland. *Annu Rev Physiol.* **35**:305-328.
- REITER RJ., TAN DX., MANCHESTER LC., TAMURA H. (2007). Melatonin defeats neurally-derived free radicals and reduces the associated neuromorphological and neurobehavioral damage. *J Physiol Pharmacol.* **58**:5-22.
- REITER RJ., PAREDES SD., KORKMAZ A., MANCHESTER LC., TAN DX. (2008). Melatonin in relation to the "strong" and "weak" versions of the free radical theory of aging. *Adv Med Sci.* **53**:119-129.
- REITER RJ., TAN DX., ERREN TC., FUENTES-BROTO L., PAREDES SD. (2009). Light-mediated perturbations of circadian timing and cancer risk: a mechanistic analysis. *Integr Cancer Ther.* **8**:354-360.
- REITER RJ., TAN DX., MANCHESTER LC., PAREDES SD., MAYO JC., SAINZ RM. (2009). Melatonin and reproduction revisited. *Biol Reprod.* **81**:445-456.
- REITER RJ. (1981). The mammalian pineal gland: structure and function. *Am J Anat.* **162**:287-313.
- REITER RJ. (1991). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev.* **12**:151-180.

- RENNER F., SCHMITZ ML. (2009). Autoregulatory feedback loops terminating the NF-kappaB response. *Trends Biochem Sci.* **34**:128-135.
- REPPERT SM., WEAVER DR. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature.* **418**:935-941.
- REUSS S. (1999). Trigeminal innervation of the mammalian pineal gland. *Microsc Res Tech.* **46**:305-309.
- RIBELAYGA C., PÉVET P., SIMONNEAUX V. (1997). Adrenergic and peptidergic regulations of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in rat pineal gland. *Brain Res.* **777**:247-250.
- RIBELAYGA C., GAUER F., PÉVET P., SIMONNEAUX V. (1998). Ontogenesis of hydroxyindole-O-methyltransferase gene expression and activity in the rat pineal gland. *Brain Res Dev Brain Res.* **110**:235-239.
- ROLLS A., SHECHTER R., LONDON A., ZIV Y., RONEN A., LEVY R., SCHWARTZ M. (2007). Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nat Cell Biol.* **9**:1081-1088.
- ROSEBOOM PH., COON SL., BALER R., MCCUNE SK., WELLER JL., KLEIN DC. (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.
- RULAND J., MAK TW. (2003). Transducing signals from antigen receptors to nuclear factor kappaB. *Immunol Rev.* **193**:93-100.
- SAITOH S. (2009). Chaperones and transport proteins regulate TLR4 trafficking and activation. *Immunobiology.* **214**:594-600.
- SANCHEZ-HIDALGO M., DE LA LASTRA CA., CARRASCOSA-SALMORAL MP., NARANJO MC., GOMEZ-CORVERA A., CABALLERO B., GUERRERO JM. (2009). Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. *Exp Gerontol.* **44**:328-334.

- SASSI N., PAUL C., MARTIN A., BETTAIEB A., JEANNIN JF. (2009). Lipid A-induced responses in vivo. *Adv Exp Med Biol.* **667**:69-80.
- 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.
- SCHOMERUS C., KORF HW., LAEDTKE E., WELLER JL., KLEIN DC. (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.
- SCHOMERUS C., LAEDTKE E., KORF HW. (2003). Norepinephrine-dependent phosphorylation of the transcription factor cyclic adenosine monophosphate responsive element-binding protein in bovine pinealocytes. *J Pineal Res.* **34**:103-109.
- SCHOW SR., JOLY A. (1997). N-acetyl-leuciny-l-leuciny-l-norleucinal inhibits lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation and prevents TNF and IL-6 synthesis in vivo. *Cell Immunol.* **175**:199-202.
- SCHRÖDER H., BENDIG A., DAHL D., GRÖSCHEL-STEWART U., VOLLRATH L. (1990). Neuronal markers in the rodent pineal gland - an immunohistochemical investigation. *Histochemistry.* **94**:309-314.
- SENFTLEBEN U., CAO Y., XIAO G., GRETEN FR., KRÄHN G., BONIZZIG G., CHEN Y., HU Y., FONG A., SUN SC., KARIN M. (2001). Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science.* **293**:1495-1499.
- SHAFFER LL., MCNULTY JA., YOUNG MR. (2001). Assessment of melatonin's ability to regulate cytokine production by macrophage and microglia cell types. *J Neuroimmunol.* **120**:84-93.

- SHEN A., ZHOU D., SHEN Q., LIU HO., SUN L., LIU Y., CHEN J., YANG J., JI Y., CHENG C. (2009). The expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) by the intrathecal injection of lipopolysaccharide in the rat spinal cord. *Neurochem Res.* **34**:333-341.
- SHIMAZU R., AKASHI S., OGATA H., NAGAI Y., FUKUDOME K., MIYAKE K., KIMOTO M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med.* **189**:1777-1782.
- DA SILVA CORREIA J., ULEVITCH RJ. (2002). MD-2 and TLR4 N-linked glycosylations are important for a functional lipopolysaccharide receptor. *J Biol Chem.* **277**:1845-1854.
- SILVA GO., ROGRIGUES MR., XIMENES VF., BUENO-DA-SILVA AE., AMARANTE-MENDES GP., CAMPA A. (2004). Neutrophils as a specific target for melatonin and kynuramines: effects on cytokine release. *J Neuroimmunol.* **156**:146-152.
- SILVA CL., TAMURA EK., MACEDO SM., CECON E., BUENO-ALVES L., FARSKY SH., FERREIRA ZS., MARKUS RP. (2007). Melatonin inhibits nitric oxide production by microvascular endothelial cells in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol.* **151**:195-205.
- 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.
- SISSON WR., FINNEY JM. (1920). Effect of feeding the pineal body upon the development of the albino rat. *J Exp Med.* **31**:335-344.
- SLOMINSKI A., BAKER J., ROSANO TG., GUISTI LW., ERMAK G., GRANDE M., GAUDET SJ. (1996). Metabolism of serotonin to N-acetylserotonin,

- melatonin, and 5-methoxytryptamine in hamster skin culture. *J Biol Chem.* **271**:12281-12286.
- SLOMINSKI A., PISARCHIK A., SEMAK I., SWEATMAN T., WORTSMAN J., SZCZESNIEWSKI A., SLUGOCKI G., MCNULTY J., KAUSER S., TOBIN DJ., JING C., JOHANSSON O. (2002). Serotonergic and melatonergic systems are fully expressed in human skin. *FASEB J.* **16**:896-898.
- SRINIVASAN V., SPENCE DW., MOSCOVITCH A., PANDI-PERUMAL SR., TRAKHT I., BROWN GM., CARDINALI DP. (2010). Malaria: therapeutic implications of melatonin. *J Pineal Res.* **48**:1-8.
- STEFULJ J., HÖRTNER M., GHOSH M., SCHAUENSTEIN K., RINNER I., WÖLFLE A., SEMMLER J., LIEBMANN PM. (2001). Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res.* **30**:243-247.
- STEHLER JH., VON GALL C., KORF HW. (2001). Analysis of cell signaling in the rodent pineal gland deciphers regulators of dynamic transcription in neural/endocrine cells. *Eur J Neurosci.* **14**:1-9.
- SUGDEN LA., SUGDEN D., KLEIN DC. (1987). Alpha 1-adrenoceptor activation elevates cytosolic calcium in rat pinealocytes by increasing net influx. *J Biol Chem.* **262**:741-745.
- 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.
- SUN SC., LEY SC. (2008). New insights into NF-kappaB regulation and function. *Trends Immunol.* **29**:469-478.
- TAMURA EK., SILVA CL., MARKUS RP. (2006). Melatonin inhibits endothelial nitric oxide production in vitro. *J Pineal Res.* **41**:267-274.

- TAMURA EK., CECON E., MONTEIRO AW., SILVA CL., MARKUS RP. (2009). Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells. *J Pineal Res.* **46**:268-274.
- TAN DX., MANCHESTER LC., TERRON MP., FLORES LJ., REITER RJ. (2007). One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res.* **42**:28-42.
- TANG AH., BRUNN GJ., CASCALHO M., PLATT JL. (2007). Pivotal advance: endogenous pathway to SIRS, sepsis, and related conditions. *J Leukoc Biol.* **82**:282-285.
- TECLEMARIAM-MESBAH R., TER HORST GJ., POSTEMA F., WORTEL J., BUIJS RM. (1999). Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway. *J Comp Neurol.* **406**:171-182.
- TERRIFF DL., CHIK CL., PRICE DM., HO AK. (2005). Proteasomal proteolysis in the adrenergic induction of arylalkylamine-N-acetyltransferase in rat pinealocytes. *Endocrinology.* **146**:4795-4803.
- TOBIAS PS., SOLDAU K., GEGNER JA., MINTZ D., ULEVITCH RJ. (1995). Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J Biol Chem.* **270**:10482-10488.
- TOUITOU Y., BOGDAN A. (2007). Promoting adjustment of the sleep-wake cycle by chronobiotics. *Physiol Behav.* **90**:294-300.
- TRACEY D., KLARESKOG L., SASSO EH., SALFELD JG., TAK PP. (2007). Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther.* **117**:244-279.
- TRIAANTAFILOU M., TRIANTAFILOU K. (2002). Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol.* **23**:301-304.

- TRICOIRE H., MØLLER M., CHEMINEAU P., MALPAUX B. (2003). Origin of cerebrospinal fluid melatonin and possible function in the integration of photoperiod. *Reprod Suppl.* **61**:311-321.
- TRINH DV., ZHU N., FARHANG G., KIM BJ., HUXFORD T. (2008). The nuclear I kappaB protein IkappaB zeta specifically binds NF-kappaB p50 homodimers and forms a ternary complex on kappaB DNA. *J Mol Biol.* **379**:122-135.
- TSAI SY., MCNULTY JA. (1997). Microglia in the pineal gland of the neonatal rat: characterization and effects on pinealocyte neurite length and serotonin content. *Glia.* **20**:243-253.
- TSAI SY., MCNULTY JA. (1999). Interleukin-1beta expression in the pineal gland of the rat. *J Pineal Res.* **27**:42-48.
- TSAI SY., SCHLUNS KS., LE PT., MCNULTY JA. (2001a). TGF-beta1 and IL-6 expression in rat pineal gland is regulated by norepinephrine and interleukin-1beta. *Histol Histopathol.* **16**:1135-1141.
- TSAI SY., O'BRIEN TE., MCNULTY JA. (2001b). Microglia play a role in mediating the effects of cytokines on the structure and function of the rat pineal gland. *Cell Tissue Res.* **303**:423-431.
- TURNER W. (1888). The Pineal Body (Epiphysis Cerebri) in the Brains of the Walrus and Seals. *J Anat Physiol.* **22**:300-303.
- VALLABHAPURAPU S., KARIN M. (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol.* **27**:693-733.
- VIATOUR P., MERVILLE MP. BOURS V., CHARIOT A. (2005). Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci.* **30**:43-52.
- VILLEGAS J. (2004). Time course of angiogenesis in solid pineal autografts. *CellTissue Res.* **315**:349-359.

- WAN F., LENARDO MJ. (2010). The nuclear signaling of NF-kappaB: current knowledge, new insights, and future perspectives. *Cell Res.* **20**:24-33.
- WANG M., MENG X., TSAI B., WANG JF., TURRENTINE M., BROWN JW., MELDRUM DR. (2004). Preconditioning up-regulates the soluble TNF receptor I response to endotoxin. *J Surg Res.* **121**:20-24.
- WANG H., XU DX., LV JW., NING H., WEI W. (2007). Melatonin attenuates Lipopolysaccharide (LPS)-induced apoptotic liver damage in D-galactosamine-sensitized mice. *Toxicology.* **237**:49-57.
- WERNER SL., BARKEN D., HOFFMANN A. (2005). Stimulus specificity of gene expression programs determined by temporal control of IKK activity. *Science.* **309**:1857-1861.
- WHITE BH., KLEIN DC. (1993). Developmental appearance of pineal adrenergic guanosine 3',5'-monophosphate response is determined by a process downstream from elevation of intracellular Ca²⁺: possible involvement of a diffusible factor. *Endocrinology.* **132**:1026-1034.
- WITHYACHUMNARNKUL B., NONAKA KO., ATTIA AM., REITER RJ. Changes in indole metabolism in organ cultured rat pineal glands induced by interferon-gamma. *J Pineal Res.* **8**:313-322.
- WITHYACHUMNARNKUL B., REITER RJ., LERCHL A., NONAKA KO., STOKKAN KA. (1991). Evidence that interferon-gamma alters pineal metabolism both indirectly via sympathetic nerves and directly on the pinealocytes. *Int J Biochem.* **23**:1397-1401.
- WONG ET., TERGAONKAR V. (2009). Roles of NF-kappaB in health and disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond).* **116**:451-465.
- WRIGHT SD., RAMOS RA., TOBIAS PS. ULEVITCH RJ., MATHISON JC. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* **249**:1431-1433.

- WU CC., CHIAO CW., HSIAO G., CHEN A., YEN MH. (2001). Melatonin prevents endotoxin-induced circulatory failure in rats. *J Pineal Res.* **30**:147-156.
- WUCHERT F., OTT D., MURGOTT J., RAFALZIK S., HITZEL N., ROTH J., GERSBERGER R. (2008). Rat area postrema microglial cells act as sensors for the toll-like receptor-4 agonist lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol.* **204**:66-74.
- WURTMAN RJ., AXELROD J., SEDVALL G., MOORE RY. (1967). Photic and neural control of the 24-hour norepinephrine rhythm in the rat pineal gland. *J Pharmacol Exp Ther.* **157**:487-492.
- YAMAMOTO M., YAMAZAKI S., UEMATSU S., SATO S., HEMMI H., HOSHINO K., KAISHO T., KUWATA H., TAKEUCHI O., TAKESHIGE K., SAITOH T., YAMAOKA S., YAMAMOTO N., YAMAMOTO S., MUTA T., TAKEDA K., AKIRA S. (2004). Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta. *Nature.* **430**:218-222.
- YILMAZ ZB., WEIH DS., SIVAKUMAR V., WEIH F. (2003). RelB is required for Peyer's patch development: differential regulation of p52-RelB by lymphotoxin and TNF. *EMBO J.* **22**:121-130.
- ZAWILSKA JB., SKENE DJ., ARENDT J. (2009). Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacol Rep.* **61**:383-410.
- ZEN K., KARSAN A., EUNSON T., YEE E., HARLAN JM. (1998). Lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation in human endothelial cells involves degradation of IkappaBalpha but not IkappaBbeta. *Exp Cell Res.* **243**:425-433.
- ZHOU H., DING G., LIU W., WANG L., LU Y., CAO H., ZHENG J. (2004). Lipopolysaccharide could be internalized into human peripheral blood mononuclear cells and elicit TNF-alpha release, but not via the pathway of toll-like receptor 4 on the cell surface. *Cell Mol Immunol.* **1**:373-377.

- ZHOU H., ANDONEGUI G., WONG CH., KUBES P. (2009). Role of endothelial TLR4 for neutrophil recruitment into central nervous system microvessels in systemic inflammation. *J Immunol.* **183**:5244-5250.
- ZMIJEWSKI MA., SWEATMAN TW., SLOMINSKI AT. (2009). The melatonin-producing system is fully functional in retinal pigment epithelium (ARPE-19). *Mol Cell Endocrinol.* **307**:211-216.

XX. SÚMULA CURRICULAR

Nome: Sanseray da Silveira Cruz Machado

Data de Nascimento: 29 de maio de 1984

Local de Nascimento: Feira de Santana/BA

Endereço eletrônico: sanseray@usp.br

Formação Acadêmica/Titulação

2008 – 2010 Mestrado em Fisiologia.

Universidade de São Paulo – USP

Título da dissertação: *Caracterização do Eixo Imune-Pineal: Glândula Pineal como alvo para Lipopolissacarídeo (LPS).*

Orientador: Regina Pekelmann Markus

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo n° 2007/06444-7, vigência entre 01/09/2009 a 31/05/2010; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES, vigência 01/06/2009 a 31/08/2009).

2003 - 2007 Graduação em Fisioterapia.

Centro Universitário de Itajubá, UNIVERSITAS, Brasil

Título: *Uso do Princípio de Irradiação da Facilitação Neuromuscular Proprioceptiva (FNP) em Programas de Reabilitação.*

Orientador: Sidney Benedito da Silva

Atuação profissional:

Centro Universitário de Itajubá - UNIVERSITAS

2007 - 2007 Vínculo: Monitoria , Enquadramento funcional: Monitor da Disciplina Histologia , Carga horária: 8, Regime: Parcial

- 2006 - 2007** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Fisioterapia em Oncologia , Carga horária: 8, Regime: Parcial
- 2006 - 2007** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Membro/Diretoria: Liga de Biomecânica e Dor , Carga horária: 4, Regime: Parcial
- 2004 - 2004** Vínculo: Monitoria , Enquadramento funcional: Monitor da Disciplina Histologia , Carga horária: 8, Regime: Parcial

Artigos completos publicados em periódicos

1. SOUSA CEC., **CRUZ-MACHADO SS**, TAMURA EK. (2008). Os ritmos circadianos e a reprodução em mamíferos. *Boletim do Centro da Biologia da Reprodução (UFJF)*. 26: 15-21.
2. **CRUZ-MACHADO SS**. (2010). Lipopolissacarídeo (LPS): Ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NF-kB. *Revista da Biologia*. 4:40- 43
3. **CRUZ-MACHADO SS.**, SOUSA CEC., TAMURA EK., PINATO L., CECON E., FERNANDES PACM, FERREIRA ZS, AVELLAR MCW., MARKUS RP. (2010). TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland triggers NFkB pathway. *Journal of Pineal Research*, 49:183-192.

Artigo Submetido

1. TAMURA EK., FERNANDES PA., MARÇOLA M., **CRUZ-MACHADO SS.**, MARKUS RP. Long-lasting priming of endothelial cells by plasma melatonin levels. **Plos One**, Submetido.

Prêmios e títulos

- 2009** Menção Honrosa pelo Pôster: *Characterization of Immune-Pineal Axis: LPS activates NFκB translocation to nucleus and induces TNF production in rat pineal gland*. Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental (2009).

Resumos publicados em anais de eventos internacionais

1. PINATO L., **CRUZ-MACHADO SS**, FERNANDES PACM., ROCHA VA, FERREIRA ZS, MARKUS RP. (2010). Intracerebroventricular (ICV) lipopolysaccharide (LPS) imposes antagonistic changes in blood and brain melatonin content. In: Gordon Research Conference on Pineal Cell Biology, 2010, Galveston, TX. **Anais do Gordon Research Conference on Pineal Cell Biology.**
2. TAMURA EK., MARÇOLA M., FERNANDES PACM., **CRUZ-MACHADO SS.**, MARKUS RP. (2010). Plasma melatonin primes for a long-term endothelial cell cultures. In: 26th Conference of the International Society of Chronobiology, 2010, Vigo, Espanha. **Anais da 26th Conference of the International Society of Chronobiology.**
3. MARKUS RP., TAMURA EK., FERNANDES PACM., MARÇOLA M., MONTEIRO AWA., **CRUZ-MACHADO SS.** (2009). Endothelial cells cultures are preconditioned by environmental lighting, melatonin and lipopolysaccharide treatment In: XI Congress of the European Biological Rhythms Society, 2009, Strasbourg - France. **Anais do XI Congress of the European Biological Rhythms Society.**

Resumos publicados em anais de eventos nacionais

1. **CRUZ-MACHADO SS.**, PINATO L., CARVALHO-SOUSA CE., TAMURA EK., FERREIRA ZS., MARKUS RP. (2010). Evidences for glia-pinealocytes interaction in cultured rat pineal gland. **XV Congresso da Sociedade**

Brasileira de Biologia Celular.

2. CARVALHO-SOUSA CE., **CRUZ-MACHADO SS.**, PINATO L., TAMURA EK., FERNANDES PACM., MARKUS RP. (2010). Pineal gland expresses TNFR1 in a constitutive and rhythmic manner. **XV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular.**
3. **CRUZ-MACHADO SS.**, FERREIRA ZS., MARKUS RP. (2009). Characterization of Imune-Pineal Axis: Lipopolysaccharide activates NF-kB translocation to nucleus and induces TNF production in rat pineal gland In: 41 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2009, Ribeirão Preto. **Anais do 41 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2009.**
4. TAMURA EK., MARÇOLA M., FERNANDES PACM., MONTEIRO AWA., **CRUZ-MACHADO SS.**, MARKUS RP. (2009). Melatonin inhibits preconditioning of cultured endothelial cells induced by lipopolysaccharide (LPS). In: 41 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2009, Ribeirão Preto. **Anais do 41 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental.**
5. **CRUZ-MACHADO SS.**, CORRÊA APA., MALAGÓ R., VILELA MSB., VILELA ASB. (2007). Proposta de Avaliação dos Efeitos da Estimulação Elétrica Neuromuscular (EENM) no Metabolismo e Morfologia Muscular de Ratos Hiperglicêmicos Experimentais In: I Congresso de Iniciação Científica de Itajubá, 2007, Itajubá. **Anais do I Congresso de Iniciação Científica de Itajubá.**
6. **CRUZ-MACHADO SS.**, CARDOSO AP, SILVA SB. (2007). The Use of Irradiation Principle from Proprioceptive Neuromuscular Facilitation pattern (PNF) in Rehabilitation programs: A Review In: V Congresso de Saúde e Qualidade de Vida do Cone Leste Paulista, 2007, São José dos Campos. **Anais do V Congresso de Saúde e Qualidade de Vida do Cone Leste Paulista.**
7. CANTUÁRIA AT., MIRANDA CT., **CRUZ-MACHADO SS.**, REIS BHJ., PEREIRA VS., SILVA SB. (2007). Tratamento Fisioterapêutico das Disfunções Músculo-

Esqueléticas de Pacientes Hemofílicos: Revisão da Literatura In: V Congresso de Saúde e Qualidade de Vida do Cone Leste Paulista, 2007, São José dos Campos. **Anais do V Congresso de Saúde e Qualidade de Vida do cone Leste Paulista.**

8. **CRUZ-MACHADO SS, SILVA SB.** (2006). Proposta de Avaliação dos Efeitos da FNP Combinada com a EENM no Membro Inferior de Hamiparéticos Crônicos In: VI Simpósio de Fisioterapia, 2006, Poços de Caldas. **Anais eletrônicos do VI Simpósio de Fisioterapia da PUC-Minas.**

Apresentação de Trabalho (Comunicação Oral)

1. CRUZ-MACHADO, S.S, SILVA, S.B. **Proposta de Avaliação dos Efeitos da FNP Combinada com a EENM no Membro Inferior de Hamiparéticos Crônicos**, 2006. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

Produção Técnica

1. CRUZ-MACHADO, S.S. **Fotorrecepção: principal aferência para sincronização dos osciladores endógenos**, 2009. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional)
2. CRUZ-MACHADO, S.S. **Fotorrecepção: principal aferência para sincronização dos osciladores endógenos**, 2009. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
3. CRUZ-MACHADO, S.S. **Ajuste do Relógio Biológico: Aferências da Retina à Glândula Pineal**, 2008. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional)
4. CRUZ-MACHADO, S.S. **Ajuste do Relógio Biológico: Aferências da Retina à Glândula Pineal**, 2008. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Atividades de Pesquisa

1. CRUZ-MACHADO, S.S, FERNANDES P.A.C.M, MARKUS, RP.

Estágio de Pesquisa: “Efeitos das Citocinas IL-6 e IFN-gama na produção de melatonina pela glândula pineal de ratos”, *Laboratório de Cronofarmacologia, Departamento de Fisiologia, IB-USP, 2007.*

2. CRUZ-MACHADO, S.S, SILVA, S.B

Estágio de Iniciação Científica: “Efeitos do Princípio de Irradiação da Facilitação Neuromuscular Proprioceptiva (FNP) na Marcha de Pacientes Hemiparéticos Crônicos: Estudo de Casos”, *Departamento de Fisioterapia, Centro Universitário de Itajubá 2007.*

3. CRUZ-MACHADO, S.S, MALAGÓ, R.

Estágio de Pesquisa: “Avaliação dos Efeitos da Estimulação Elétrica Neuromuscular (EENM) no metabolismo e morfologia Muscular de Ratos Hiperglicêmicos Experimentais”, *Laboratório de Histologia, Instituto de Ciências Biológicas, Centro Universitário de Itajubá, 2007.*

4. CRUZ-MACHADO, S.S, SILVA, S.B

Estágio de Iniciação Científica: “Efeitos do Princípio de Irradiação da Facilitação Neuromuscular Proprioceptiva (FNP) na Marcha de Pacientes Hemiparéticos Crônicos: Estudo de Casos”, *Departamento de Fisioterapia, Centro Universitário de Itajubá, 2006.*

XI. ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

OF.CEA/IB/011/2008
Ref. 2007.1.1191.41.0

São Paulo, 14 de março de 2008.

Prezada Senhora

Dirijo-me a V. Sa. para informar que a Comissão de Ética em Uso de Animais Vertebrados em Experimentação do IB, em reunião realizada no dia 13/03/2008, **APROVOU** o Projeto "Caracterização do eixo imune-pineal: glândula pineal como alvo para lipopolissacarídeos (LPS)" – **Protocolo 045/2007**, de sua responsabilidade (colaboradores: Sanseray da Silveira Cruz Machado – Mestrando e Pedro Augusto Carlos Magno Fernandes - Doutorando).

Atenciosamente.

Prof. Dra. Eleonora Trajano

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

Ilma. Sra.

Prof. Dra. REGINA PEKELMANN MARKUS

Departamento de Fisiologia do IBUSP

Rua do Matão - Travessa 14 nº 321 - CEP 05508-900 - Cidade Universitária
São Paulo - Brasil - <http://www.ib.usp.br>