

Erika Cecon

FATOR DE TRANSCRIÇÃO NFKB EM
GLÂNDULAS PINEAIS DE RATOS

São Paulo

2010

Erika Cecon

FATOR DE TRANSCRIÇÃO NFKB EM
GLÂNDULAS PINEAIS DE RATOS

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Regina
Pekelmann Markus

São Paulo

2010

Ficha Catalográfica

C 388f

Cecon, Erika

Fator de transcrição NFκB em glândulas pineais de ratos / Erika Cecon. – São Paulo : E.C., 2010.

138 p., Il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia, 2010.

1. Glândula pineal 2. NFκB
3. Melatonina I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia II. Título

LC QP 188.P55

COMISSÃO JULGADORA

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a).

Orientador(a)

À minha família querida

e aos meus amigos.

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

Albert Einstein

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”

Fernando Pessoa

Agradecimentos

“Tu deviens responsable pour toujours de ce que tu as apprivoisé.”

Saint-Exupéry, “Le Petit Prince”.

Responsabilidade igualmente importante é conseguir agradecer, em poucas palavras, a todos aqueles que viabilizaram a realização deste trabalho, seja através de auxílio profissional ou através de ensinamentos pessoais, acrescentando pedacinho por pedacinho do que sou hoje.

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais pelo incentivo constante, apoio e amor incondicionais, estando sempre presentes nas conquistas e também nos momentos de dúvidas. A história de vida de vocês é para mim um exemplo de luta, conquista, merecimento, dedicação, força de vontade e realização, que me serve de exemplo diariamente enquanto trilho meu próprio caminho. Agradeço todos os dias a Deus por ter o privilégio de poder me espelhar em pessoas tão cheias de qualidades como vocês dois. Obrigada por tudo, sempre!

À minha querida irmã Leticia e meu cunhado Francisco, por todo apoio, compreensão e conselhos com relação à vida acadêmica, e também pelos ótimos momentos compartilhados, desde viagens inesquecíveis, passando por discussões científicas até simples conversas de bar. Admiro muito vocês.

À todos os demais membros da minha família: primos, primas, tios, tias, avós, avós, e também à nova geração iniciada pelos “sobrinhos-primos”. Presentes ou não, a estrutura familiar que todos vocês criaram é um dos maiores orgulhos que tenho. A união de vocês (tão incentivada pelos meus pais, a quem agradeço novamente) é um exemplo e uma lição a se seguir a vida toda. Obrigada por todo o carinho!

Ao meu namorado Elton, por todo amor, carinho, compreensão e companheirismo ao longo de todos esses anos. Obrigada pelos conselhos, pela troca de conhecimentos, pela paciência nos momentos em que o trabalho veio em primeiro lugar e por sempre me apoiar e me incentivar, principalmente nos momentos de crises. Te amo muito!

À minha segunda família, que adquiri no Laboratório de Cronofarmacologia e com a qual convivi mais tempo do que com a minha própria família nesses últimos anos. Pedro, Eduardo e Daiane, vocês são irmãos que conquistei e que me conquistaram. Obrigada por toda a aprendizagem que me proporcionam diariamente, tanto no profissional como no pessoal. Amigos para toda hora, para todos os momentos, muito obrigada por fazerem parte da minha vida.

A todos os demais membros da família Cronofarmacologia, antigos e atuais: Alex, Ariana, Camila, Cecília, Cíntia, Claudinha, Prof^a Cláudia, Gê, Kelly, Livingstone, Mara, Marco, Marina, Renato, San, agradeço por toda a colaboração, amizade e pelo ótimo ambiente de trabalho que temos. Aos amigos Luciana e Vanderlei, por toda a ajuda experimental, fundamentais para este trabalho. À nossa querida técnica Débora Moura, por todo auxílio prestado e pela descontração no convívio diário, tornando-o extremamente agradável. Agradeço também a todos os funcionários do IB – USP, sempre muito prestativos.

Agradeço, em especial, às minhas orientadoras Regina Markus e Zulma Ferreira, por todo o aprendizado, pela orientação exemplar e pelas pessoas que são. Obrigada pelos ensinamentos diários de todos os tipos: técnicos, profissionais, culturais; e por terem transmitido a mim, talvez inconscientemente, a paixão pela ciência. Obrigada pelo ambiente de trabalho riquíssimo que nos proporcionam e por toda a contribuição que certamente fizeram ao meu crescimento pessoal. Serei eternamente agradecida.

Aos amigos em geral, que são uma das coisas mais valiosas de nossas vidas. Agradeço ao pessoal do Dep. de Fisiologia do IB, pelo companheirismo e amizade. Aos amigos que são praticamente agregados ao Lab. de Cronofarmacologia, Tchelo, Márcio, Léo e Bruno, obrigada pela convivência, proximidade e pelos momentos compartilhados. Aos amigos de graduação, pelo convívio durante e após o curso de Biologia, com quem compartilho as alegrias e incertezas da vida de biólogo e da vida acadêmica. Conto com vocês. Torço por vocês! Aos amigos não-cientistas que, mesmo sem entender muito bem meu trabalho, sempre me apoiaram e estiveram presentes. Aline, Fefa, Thaís, Veri, obrigada pelo carinho!

Por fim, agradeço o apoio financeiro da FAPESP (2007/06420-0), CAPES e CNPq, de essencial importância à realização do presente trabalho.

Índice

I – INTRODUÇÃO	14
1. Fator de transcrição NFKB	14
1.1. Família NFKB.....	16
1.2. Família IKB.....	19
1.3. Família IKK	21
1.4. Vias de sinalização de NFKB	22
1.5. Caracterização das demais subunidades de NFKB.....	24
1.6. Modulações da via NFKB.....	28
1.7. Ativação constitutiva de NFKB.....	31
2. Glândula pineal	34
2.1. Glândula pineal e ritmos biológicos.....	36
2.2. Características anatômicas e estruturais da glândula pineal	40
2.2.1. Inervação simpática	41
2.2.2. Inervações não-adrenérgicas	41
2.3. Síntese de melatonina pela glândula pineal	43
2.3.1. Cascata de sinalização noradrenérgica	44
2.3.2. Regulação transcricional e pós-traducional da enzima AA-NAT	47
3. Funções da melatonina	49
3.1. Efeito cronobiótico	50
3.2. Efeito antioxidante	51
3.3. Ações imunomodulatória, oncostática e antienvelhecimento	51

4. Eixo imune-pineal	53
5. NFkB e a glândula pineal	57
II. OBJETIVOS.....	59
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	61
1. Animais.....	61
1.1. Animais em livre-curso	62
2. Drogas e reagentes	64
2.1. Preparo das drogas	65
3. Cultura de Glândulas Pineais.....	65
4. Tratamentos in vitro	66
5. Tratamentos in vivo	66
6. Extração de proteína nuclear	67
7. Ensaio de Eletromobilidade em Gel (EMSA ou Gel-Shift) e Super-Shift	68
8. Dosagem de melatonina plasmática.....	70
9. Dosagem de corticosterona plasmática.....	71
10. Análise dos resultados	71
IV. RESULTADOS.....	73
1. Ativação constitutiva de NFkB na glândula pineal	73
1.1. Identificação das subunidades de NFkB presentes	73
1.2. Variação rítmica no conteúdo nuclear de NFkB	75
2. Regulação da ativação constitutiva de NFkB pelo ciclo claro/escuro.....	76
2.1. Efeito da transição claro/escuro sobre o ritmo de NFkB.....	76
2.2. NFkB em glândulas pineais de animais em livre-curso.....	78

3. Efeito da estimulação noradrenérgica sobre o ritmo de NFkB	80
4. Controle hormonal da translocação nuclear de NFkB	85
4.1. Ação autócrina de melatonina	85
4.2. Correlação entre o ritmo endógeno de corticosterona e o de NFkB	89
V. DISCUSSÃO	93
1. Ativação constitutiva de p50:p50	94
2. Mecanismos regulatórios do ritmo de NFkB.....	97
2.1. Melatonina e NFkB.....	99
2.2. Corticosterona e NFkB	102
3. NFkB na fisiologia e fisiopatologia da glândula pineal	106
VI. CONCLUSÕES	111
VII. RESUMO	112
VIII. ABSTRACT	113
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114
X. SÚMULA CURRICULAR.....	134

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HIAA	ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT	serotonina
5-HTP	5-hidroxitriptofano
AAAD	enzima descarboxilase de aminoácidos aromáticos
AA-NAT	enzima arilalquilamina N-acetiltransferase
AFMK	N ¹ -acetil-N ² -formil-5-metoxiquinuramina
ALLN	N-acetil-leucinil-leucinil-norleucinol-H
AMK	N ¹ -acetil-5-metoxiquinuramina
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico
AP-1	proteína ativadora 1
ATP	adenosina tri-fosfato
BCG	Bacilo Calmette-Guerin
CBP	proteína de ligação a CREB
CGRP	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	ciclooxigenase
CRE	elementos responsivos a AMPc
CREB	proteína de ligação ao elemento responsivo a AMPc
CT	Circadian Time
EMSA	ensaio de eletromobilidade em gel
GABA	ácido gama-aminobutírico
GR	receptor de glicocorticóide
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HDAC	enzima desacetilase de histonas
HIOMT	enzima hidroxindol-O-metiltransferase
HIV	virus da imunodeficiência humana
HPA	eixo hipotálamo – pituitária - adrenal
IAP	moléculas inibidoras de apoptose
ICAM	molécula de adesão inter-celular
ICER	repressor induzido por AMPc
IGL	folheto intergeniculado talâmico
IKB	proteína inibitória kappa B
IKK	proteína quinase de IKB

IL	interleucina
iNOS	sintase do óxido nítrico induzível
LPS	lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas
MAO	enzima monoaminoxidase
Mn-SOD	superóxido dismutase dependente de manganês
MT	receptores metabotrópicos de melatonina
NAS	N-acetilserotonina
NEMO	modulador essencial de NFkB
NFkB	fator nuclear kappa B
NIK	quinase indutora de NFkB
NLS	sinal de localização nuclear
nM, μ M e mM	nanomolar, micromolar e milimolar, respectivamente
NPY	neuropeptídeo Y
NSQ	núcleo supraquiasmático hipotalâmico
PACAP	peptídeo ativador de adenilil ciclase na pituitária
PAMPS	padrões moleculares associados à patógenos
PDTC	pirrolidinaditiocarbamato
PKA	proteína quinase dependente de AMPc
PKC	proteína quinase depende de cálcio
PLC	fosfolipase C
PVN	núcleo paraventricular hipotalâmico
RHD	domínio de homologia REL
ROR	família de receptores nucleares do ácido retinóico
ROS	espécies reativas de oxigênio
TAD	domínio de transativação
TLR	receptor do tipo toll
TNF	fator de necrose tumoral
TNFR	receptor de TNF
TPOH	enzima triptofano hidroxilase
VCAM	molécula de adesão de célula vascular
VIP	peptídeo intestinal vasoativo
ZT	Zeitgeber time

INTRODUÇÃO

I – INTRODUÇÃO

1. Fator de transcrição NFKB

O NFKB (do inglês: nuclear factor kappa B) corresponde a uma família de proteínas que atua como fator de transcrição regulando a expressão de uma grande variedade de genes. Esta é uma via central do sistema imunológico, tendo essencial participação na montagem de respostas imunes inata e adaptativa. Além disso, um número crescente de estudos tem demonstrado a relevância desta via em outros processos fisiológicos e fisiopatológicos importantes, desde a diferenciação celular e desenvolvimento do organismo, até doenças neurodegenerativas e câncer.

A descoberta deste fator foi decorrente da análise de sequências intrônicas de regulação positiva presentes no gene que transcreve a cadeia leve κ (kappa) da imunoglobulina em linfócitos B (Sen e Baltimore, 1986). Este estudo revelou a presença de fatores protéicos capazes de ligarem-se a sequências específicas e induzir a transcrição da cadeia leve κ . A ausência deste fator no núcleo de outras linhagens celulares levou os autores à conclusão de que se tratava de um fator exclusivo das células B, o que justifica a sua denominação de fator nuclear kappa B.

Estudos posteriores, entretanto, demonstraram que o surgimento de NFKB nuclear poderia ser induzido pela estimulação da atividade celular (Atchison e Perry, 1987). Isso foi observado, por exemplo, nos linfócitos T, nos quais a ativação da célula pelo vírus HIV (human immunodeficiency virus) é seguida de aumento da ligação de NFKB ao DNA. Além disso, um detalhe interessante é que o próprio DNA viral contém

sítios responsivos ao NFκB e sua ativação está relacionada ao processo de replicação viral (Nabel e Baltimore, 1987). Com o aprofundamento das pesquisas, verificou-se que a não detecção inicial deste fator nos extratos nucleares ou citoplasmáticos era devido à associação entre o NFκB e um fator inibitório citoplasmático nas células não-estimuladas. Essa conclusão foi decorrente da observação de que agentes dissociadores, como o deoxicolato de sódio, induzem a localização nuclear de NFκB em células não-linfóides (Baeuerle e Baltimore, 1988a; Nelsen et al., 1988) e, posteriormente, pela identificação de uma proteína complexada ao NFκB no citoplasma. Essa proteína foi denominada de proteína inibitória kappa B (IKB) e, com isso, esboçava-se o mecanismo principal desta via de sinalização: células não-estimuladas apresentam o fator NFκB ligado à proteína inibitória IKB na porção citoplasmática; a separação deste complexo protéico permite que o NFκB livre transloque-se ao núcleo e ligue-se a sequências responsivas presentes nas regiões regulatórias de diversos genes (Baeuerle e Baltimore, 1988b).

Desde estes primeiros estudos até os dias atuais, muitos foram os progressos alcançados no entendimento desta via de sinalização, como a descoberta de várias proteínas que compõem a família NFκB e a família IKB. Mesmo assim, o modelo de ativação da via descrito em 1988 ainda é consideravelmente válido, com o acréscimo de algumas informações: as subunidades do NFκB encontram-se sob a forma de dímeros ligados à proteína inibitória IKB no citoplasma; na presença de um estímulo, ativa-se um complexo específico de quinases (IKK) que fosforilam IKB, sinalizando para sua ubiquitinação e degradação por proteassomas, permitindo então que os dímeros de

NFKB transloquem-se ao núcleo e ligam-se a regiões específicas do DNA regulando a transcrição de genes-alvos (revisto por Hayden e Ghosh, 2008).

Sabe-se atualmente que o NFKB está presente em praticamente todos os tipos celulares, mas sua grande relevância ao sistema imune torna-se evidente ao analisarmos os principais estímulos que ativam esta via. São eles: citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF) e interleucinas (IL-1 , IL-2), padrões moleculares associados à patógenos (PAMPS), sinalizadores de apoptose e de proliferação celular, fatores de crescimento, estresse oxidativo, irradiação ultravioleta, e vírus, como o HIV (Traenckner et al., 1995; Verma et al., 1995; Baeuerle e Baltimore, 1996; Blackwell e Christman, 1997; Ghosh e Karin, 2002). Nas células imunocompetentes, a ativação desta via induz a transcrição de uma gama de genes, como os de citocinas (TNF, IL-1 , IL-2, IL-6, IL-12), moléculas de adesão (VCAM, ICAM) e enzimas (iNOS – sintase de óxido nítrico induzida; COX – ciclooxigenase), todos essenciais à montagem de uma resposta imune, tanto inata quanto adaptativa (O'Neill e Kaltschmidt, 2007).

1.1. Família NFKB

Atualmente, são cinco as proteínas que constituem a família NFKB em mamíferos, identificadas por compartilharem entre si um domínio amino-terminal de homologia REL (RHD – REL homology domain). São elas: p65 (ou RelA), RelB, c-Rel, p50 (ou NFKB1) e p52 (ou NFKB2), sendo que essas duas últimas são formadas a partir da clivagem de precursores maiores, p105 e p100, respectivamente (fig. 1A) (Ghosh e Hayden, 2008). Os genes que codificam para essas subunidades são, nesta mesma

ordem, denominados de RelA, RelB, Rel, NFkB1 e NFkB2. A nomenclatura desta família de proteínas vem sofrendo alterações com o intuito de uniformizá-la e, atualmente, sugere-se a substituição das letras gregas, ausência de hífen e maior correspondência entre a nomenclatura do gene e da proteína. Na presente dissertação foi utilizada a nomenclatura baseada no comitê "HUGO Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute" (<http://www.genenames.org>).

O RHD é essencial para o controle da translocação nuclear de NFkB, pois é o domínio responsável pelos processos de dimerização entre as subunidades e contém as sequências de localização nuclear (NLS), que garantem a entrada das subunidades no núcleo celular. Este domínio também contém os sítios de interação com as proteínas inibitórias IKB (que quando ligadas recobrem o NLS de NFkB, mantendo as subunidades no citoplasma) e com o DNA, reconhecendo as sequências nucleotídicas responsivas ao NFkB nos genes-alvos (Verma et al., 1995).

As subunidades de NFkB atuam sempre sob a forma de dímeros, havendo as seguintes possibilidades de combinações: p50:RelA, p50:RelB, p50:c-Rel, p52:RelA, p52:RelB, p52:c-Rel, RelA:RelB, RelA:c-Rel, p50:p50, p52:p52, c-Rel:c-Rel e RelA:RelA. As formas em negrito são as mais amplamente encontradas, sendo o heterodímero p50:RelA a predominante (revisto por Sun e Zhang, 2007). De modo simplificado, essas subunidades podem ser distinguidas quanto a sua distribuição e funcionalidade. Enquanto as subunidade RelA e p50 são expressas ubiquamente, c-Rel, RelB e p52 são mais encontradas em células hematopoiéticas (revisto por Liou e Hsia, 2003). Já quanto à funcionalidade, elas podem ser consideradas ativadoras ou repressoras gênicas, apesar disso não ser uma característica intrínseca, e sim passível de modulação.

As subunidades RelA, RelB e c-Rel são tidas como ativadoras da transcrição gênica, pois apresentam um domínio de transativação (TAD) na sua porção C-terminal, essencial à indução da transcrição gênica. As subunidades p50 e p52 são tidas como repressoras por não apresentarem este domínio. Homodímeros dessas subunidades são de fato relatados como repressores de transcrição gênica, sendo o p50:p50 a forma mais comum. Entretanto, se uma subunidade sem TAD formar heterodímero com qualquer subunidade que possua TAD, o complexo passa a ser um regulador positivo (revisto por Hayden e Ghosh, 2008). A subunidade RelB apresenta ainda um sítio denominado zíper de leucina, essencial para que exerça sua transativação máxima (Dobrzanski et al., 1993).

Seja qual for a constituição do NFκB presente no núcleo celular, sua ligação ao DNA depende do RHD que reconhece uma sequência nucleotídica consenso nos promotores gênicos, definida como GGGRNNYYCC, onde R = base purina; N = qualquer base; Y = pirimidina (Hayden e Ghosh, 2004). Essa sequência pode ser considerada um consenso fraco, na medida em que muitas sequências diferentes são admissíveis. Inicialmente, foi cogitado que essas diferentes possibilidades poderiam conferir especificidade à ligação de determinados dímeros. Entretanto, isso não foi verificado pelos estudos subsequentes, sendo esse tipo de especificidade aplicável a uma gama bem restrita de genes, conforme discutido mais adiante (revisto por Hoffmann et al., 2003).

1.2. Família IKB

A família das proteínas inibitórias IKB é composta, atualmente, por nove membros que compartilham entre si um domínio de repetição de ankirinas que lhes confere a capacidade de interação com as subunidades de NF κ B (fig 1B). Estas proteínas podem ser separadas em três classes distintas de acordo com suas características (revisito por Ghosh e Hayden, 2008):

- as IKB típicas: IKB α , IKB β , IKB γ (genes correspondentes: Nfkbia, Nfkbib, Nfkbie), presentes constitutivamente no citoplasma e que sofrem degradação e re-síntese na presença de um estímulo. As IKB α e IKB β apresentam um domínio rico em resíduos de prolina, glutamato, aspartato, serina e treonina, denominado domínio PEST, cuja fosforilação regula a estabilidade/degradação dessas proteínas, encaminhando-as aos proteassomas (Whiteside e Israel, 1997);
- as IKB atípicas: IKB δ (IKB zeta, gene Nfkbiz), BCL-3 (B-cell lymphoma 3) e IKBNS (do gene Nfkbid), cuja expressão é dependente de estímulo e a atuação é nuclear, e não no citoplasma. A BCL-3 foi inicialmente descrita como um oncogene das células B e foi incluída na família IKB após a verificação de que sua estrutura contém repetições de ankirinas semelhantes ao encontrado nas proteínas IKB típicas (Hatada et al., 1992). Sua ligação às subunidades de NF κ B pode modular a ação transcricional, pois também possui o domínio TAD;
- e os precursores p100 e p105, e IKB γ , sendo este último produto de splicing alternativo do RNA de p105, encontrado nas células B (Inoue et al., 1992). Essas proteínas apresentam um motivo de repetição de ankirinas, tal como as IKB α , e ao

formarem dímeros com outras subunidades, mantêm-nas no citoplasma. Após um estímulo, os precursores p100 e p105 podem ser totalmente degradados ou processados para formar as subunidades p52 e p50, respectivamente.

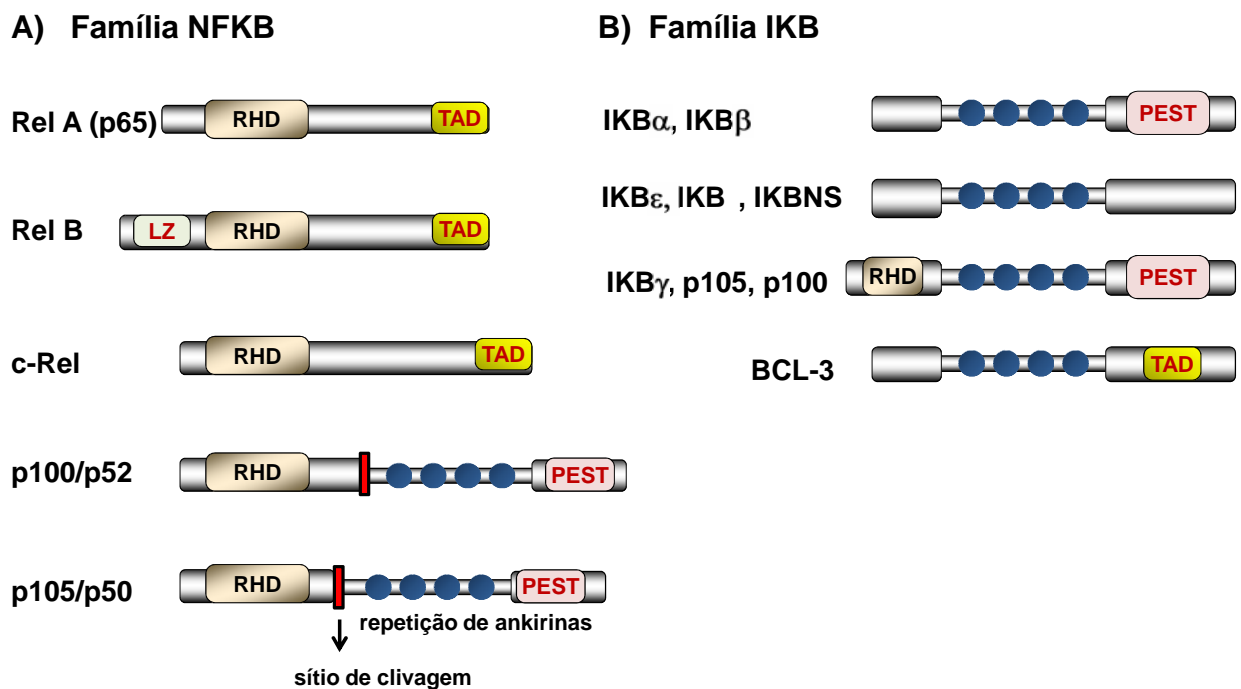


Figura 1 – Proteínas que compõem as famílias NFκB e IκB. Esquema simplificado das estruturas protéicas, contendo os principais domínios, explicados no texto. RHD = domínio de homologia Rel; LZ = zíper de leucina; TAD = domínio de transativação; PEST = domínio rico em prolina, aspartato, glutamato, serina e treonina; a barra vermelha indica o sítio onde p100 e p105 são clivados para a formação de p52 e p50, respectivamente (esquema baseado em Inoue et al., 1992; Whiteside et al., 1997; Hayden e Ghosh, 2004; Trinh et al., 2008).

1.3. Família IKK

O complexo de quinases de IKB (IKK) é composto pelas subunidades catalíticas $IKK\alpha$ (ou IKK1, do gene *Chuk*) e $IKK\beta$ (ou IKK2, gene *Ikkb*) e pela subunidade regulatória $IKK\gamma$, mais conhecida como NEMO (NFKB Essential Modulator; gene *Ikbkg*). As subunidades catalíticas agrupam-se como homo ou heterodímeros e são responsáveis pela fosforilação das IKBs, sinalizando para sua ubiquitinação e degradação pelo proteassoma 26S (revisto por Karin e Ben-Neriah, 2000).

A presença de todos esses componentes possibilita que um sinal extracelular seja convertido em uma cascata de sinalização intracelular comum (NFKB), mas com geração de uma resposta gênica adequada e específica. Os receptores do tipo toll (Toll like receptors – TLRs) são um bom exemplo de como diversos estímulos diferentes (lipoproteínas de bactérias gram-positivas e gram-negativas, DNA bacterial, RNA viral, dentre outros) atuando por receptores específicos, podem gerar cascatas de sinalização intracelular semelhantes, culminando na transcrição dos genes induzidos pelo NFKB.

O padrão temporal da resposta mediada por NFKB também é relevante à especificidade da resposta, havendo indução da transcrição de genes de resposta rápida (early genes) e, posteriormente, de outros de resposta mais tardia. Nestes últimos estão incluídos os genes das próprias proteínas inibitórias, como IKB, revelando um mecanismo de retroalimentação negativa envolvido na finalização da resposta mediada por NFKB (Sun et al., 1993).

1.4. Vias de sinalização de NFκB

Ao contrário do que seria de se esperar, a grande variabilidade de peças disponíveis para formar a via de sinalização de NFκB não se reflete em uma grande variação na sinalização frente a diferentes estímulos. Aliás, as vias de NFκB são comumente distinguidas entre três possibilidades: uma via clássica (ou canônica), uma via alternativa (não-canônica) e uma via atípica (revisto por Tergaonkar, 2006).

Da via clássica participam o complexo de IKK, com especial importância da IKK β , que fosforila a IκB, cuja degradação permite a translocação nuclear do heterodímero p50:RelA. Esta via é ativada pela maioria dos estímulos relacionados ao NFκB, como LPS (lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas), TNF, IL-1 e outras citocinas pró-inflamatórias, sendo essencial à resposta imune inata (fig. 2). O heterodímero ativado na via clássica, o p50:RelA, é o mais amplamente distribuído entre os tipos celulares e, conseqüentemente, o mais estudado também. Além de induzir a transcrição da grande maioria dos genes regulados por NFκB durante uma resposta imune, citados anteriormente, essa via também participa de processos fisiológicos importantes, como no desenvolvimento embrionário. Isso foi constatado pela verificação de que a deleção de gene RelA em camundongos é altamente letal, sendo possivelmente conseqüência de uma degeneração massiva do fígado (Beg et al., 1995).

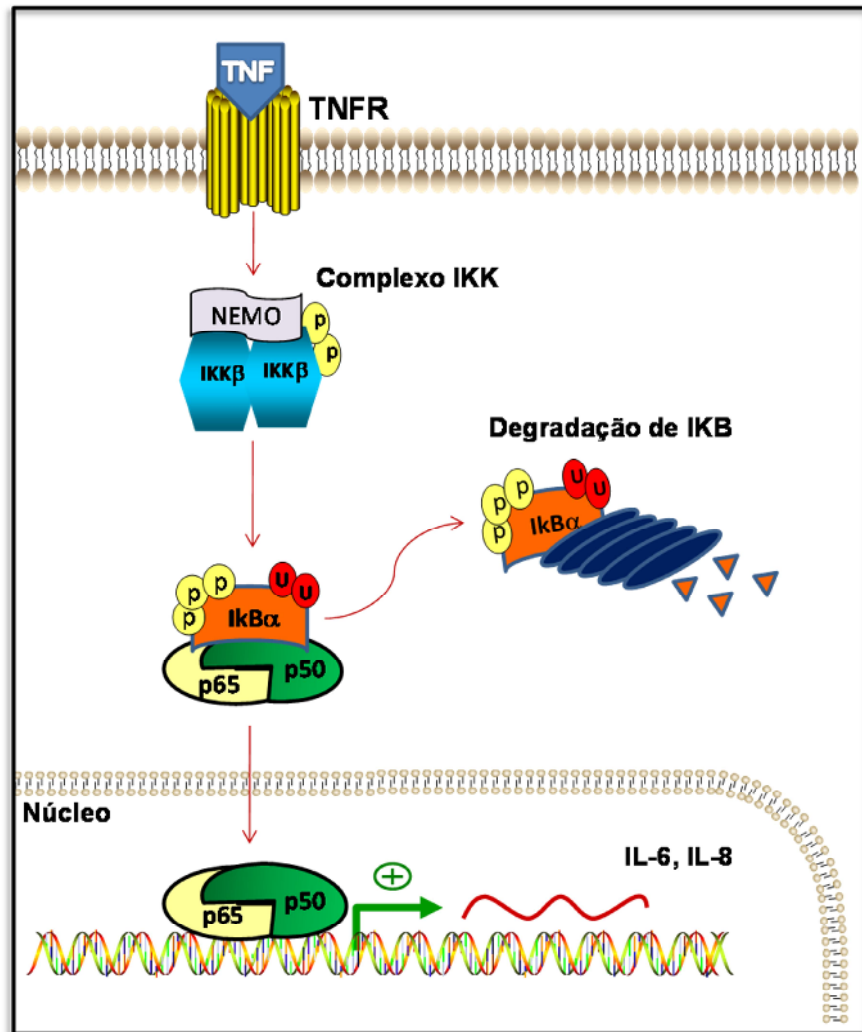


Figura 2 – Ativação da via clássica de NFκB por TNF. Esquema simplificado dos mecanismos envolvidos na translocação nuclear do heterodímero p50:p65 (também denominado p50:RelA) induzida pela ativação do receptor de TNF (TNFR), conforme descrito no texto (p = sítios fosforilados; u = sítios ubiquitinados).

A via alternativa pode ser induzida por linfotoxina B e CD40 e há ativação da IKK pela quinase indutora de NFκB (NIK), o que resulta na fosforilação da subunidade p100 e posterior processamento a p52. O dímero comumente translocado ao núcleo por esta via é o RelB:p52 (Perkins, 2007). A ativação desta via está relacionada aos processos de desenvolvimento, maturação e seleção de linfócitos B e T, e na diferenciação de células apresentadora de antígenos, como as dendríticas (Burkly et al.,

1995). Animais knockout para os componentes desta via apresentam defeitos nesses processos de desenvolvimento do sistema imune, expressando inclusive fenótipos de doenças auto-imunes (Kajiura et al., 2004; Zhang et al., 2006; Brown et al., 2008).

Já a via atípica é geralmente acionada pelo reconhecimento de DNA danificado, gerado por irradiação UV, por exemplo, ou por estímulos redox como H_2O_2 ou situação de hipóxia. Esses estímulos induzem a fosforilação de IKB por um mecanismo independente do complexo IKK, dissociando-se de NFkB sem ser degradada por proteassoma. As subunidades ativadas nesta via são as mesmas da via clássica, p50:RelA, que atuam não só no controle de genes inflamatórios como também de genes envolvidos com reparo de DNA e antioxidantes (revisto por Tergaonkar, 2006), tendo importância fundamental em situações de doenças inflamatórias crônicas, como a artrite, e no envelhecimento (Kriete e Mayo, 2009; Cullen et al., 2010).

1.5. Caracterização das demais subunidades de NFkB

Os demais dímeros que compõem a família NFkB são encontrados em situações específicas e/ou células específicas, o que justifica o número menor de relatos sobre suas funções. Em geral, tais estudos referem-se a ensaios de superexpressão ou deleção de cada subunidade com o intuito de averiguar suas funções isoladamente.

Conforme mencionado anteriormente, acreditava-se que a especificidade na geração de uma resposta mediada por NFkB seria decorrente de diferentes sequências nucleotídicas responsivas a NFkB nos diferentes genes-alvos. Entretanto, são poucos os exemplos representativos desta situação. Estudos *in vitro* demonstraram que as

subunidades RelA e c-Rel, sob a forma do homo ou heterodímeros, apresentam maior afinidade de ligação a sequências que são levemente distintas do consenso kappa B. Assim, genes que apresentam essa variação no motivo kappa B em seu promotor são especificamente regulados por essas subunidades, como os genes de IL-8 e de TF (tissue factor) em monócitos (Oeth et al., 1994). Por outro lado, dímeros de p50:RelA e p50:c-Rel parecem compartilhar de mesma afinidade aos sítios responsivos kappa B, o que dificulta o discernimento entre a existência de vias redundantes ou específicas.

A importância da subunidade c-Rel foi demonstrada utilizando-se camundongos knockout, nos quais foi verificado que a indução da transcrição gênica de IL-12 e IL-23 em macrófagos e em células dendríticas é prejudicada (Sanjabi et al., 2000; Mise-Omata et al., 2007). Esta subunidade também participa dos processos de diferenciação e sobrevivência de linfócitos B e T, regulando a transcrição gênica de IL-2, CD40 e de genes anti-apoptóticos. Aliás, essa função anti-apoptótica é especialmente vinculada à subunidade c-Rel, sendo importante tanto em situações fisiológicas quanto fisiopatológicas. Em linfócitos, neurônios e células pancreáticas, c-Rel é fundamental na proteção e sobrevivência celular (Mokhtari et al., 2009), enquanto que em algumas células tumorais esse mesmo efeito encontra-se exacerbado (revisto por Liou e Hsia, 2003). A identificação desta subunidade ocorreu, inclusive, em linfomas, tendo sido primeiramente caracterizada como um oncogene (revisto por Gregersen et al., 2009).

A subunidade RelB, por sua vez, além de participar da via alternativa de NFkB, exerce importante papel inibitório na via clássica através de pelo menos dois mecanismos distintos. A expressão de RelB é induzida por p50:RelA, e o aumento nos seus níveis induz a formação do dímero RelB:p50. Em monócitos e neutrófilos, este

dímero é transcricionalmente ativo e induz a continuação da transcrição da proteína inibitória IKB , iniciada pelo próprio p50:RelA. Com isso, a transcrição contínua e sustentada de IKB inibe uma re-ativação da via clássica e este mecanismo está envolvido nos casos de tolerância ao LPS (Chen et al., 2009). O outro mecanismo de inibição corresponde à formação do dímero RelB:RelA conforme os níveis de RelB aumentam, induzidos pela via clássica. Neste caso, RelB é inibitório por alterar a capacidade de ligação de RelA aos sítios responsivos nos promotores gênicos, constituindo um heterodímero transcricionalmente inativo (Marienfeld et al., 2003).

RelA participa ainda na formação de outros dímeros, como RelA:p52 e RelA:RelA. Este último parece atuar em células endoteliais, mediando a resposta induzida por TNF na regulação da transcrição de alguns genes que apresentam motivos kappa B específicos a esse homodímero (Marui et al., 2005). Foi observado ainda que os níveis de RelA:RelA são aumentados nos processos de diferenciação de monócitos a macrófagos, enquanto que na diferenciação às células dendríticas há o envolvimento do dímero p50:RelB (Ammon et al., 2000). O dímero RelA:p52 revelou ser funcional em neurônios dopaminérgicos de modelos de doença de Parkinson, sendo que seus níveis aumentam concomitantemente com a diminuição de p50:RelA. Isso ocorre após estimulação desses neurônios com um fator neurotrófico glial, cujo efeito neuroprotetor depende do dímero RelA:p52 (Cao et al., 2008).

Por fim, existem ainda as ações dos homodímeros de p50 e p52, que além de atuarem por si só, são alvos de mecanismos modulatórios. Homodímeros de p50 são encontrados no núcleo da maioria das células, mesmo na ausência de estímulos, onde acredita-se que controlem negativamente a transcrição gênica (Guan et al., 2005).

Concordantemente, o processamento de p105 a p50 é passível de ocorrer constitutivamente (Sun e Zhang, 2007). A importância da atenuação de uma resposta imune pela ação inibitória desta subunidade foi verificada em camundongos knockout para p50, que apresentaram maior susceptibilidade à letalidade causada por endotoxemia (Cao et al., 2006).

A p52, como mencionado, tem uma distribuição tecidual mais restrita que p50, sendo encontrada preferencialmente em células hematopoiéticas. Assim como as demais subunidades de NFkB, sua relação com o sistema imune é revelada em animais knockout que, neste caso, apresentam número reduzido de células B e defazagem nas respostas antígeno-específicas (Franzoso et al., 1998).

Apesar de essas subunidades não possuírem TAD, a associação com outros fatores podem torná-las reguladoras positivas de alguns genes. Isso foi verificado no promotor viral de HIV, que apresenta alguns sítios responsivos a esses homodímeros em específico e cuja ligação contribui para o recrutamento de um coativador em um sítio próximo (Montano et al., 1996). Além disso, tanto os homodímeros de p50 quanto de p52 são passíveis de ligação à proteína inibitória BCL-3 e o complexo formado os tornam, em alguns casos, reguladores positivos da transcrição gênica (Bours et al., 1993). O gene de Bcl-2, por exemplo, um oncogene relacionado à leucemia linfocitária crônica, possui sítios responsivos a NFkB específicos à ligação desses homodímeros, e a interação com BCL-3 faz com que ambos sejam ativadores dessa transcrição (Viatour et al., 2003). Já em macrófagos, o complexo p50:p50:BCL-3 inibe a expressão gênica, reforçando o efeito anti-inflamatório de p50:p50 por atenuar a produção de citocinas (Wessells et al., 2004).

Observa-se, portanto, a grande versatilidade que permeia a via NF κ B, seja pela expressão diferencial de suas subunidades nos diversos tipos celulares, seja pela resposta gerada frente a estímulos diversos. A própria comunicação existente entre as diferentes vias de NF κ B possibilita uma variedade de ações desse fator, se comportando ora como pró-inflamatório, ora como anti-inflamatório, com indubitável importância ao sistema imune, desde sua organogênese.

1.6. Modulações da via NF κ B

Conforme aumentam os estudos a respeito da via de sinalização do fator de transcrição NF κ B, um aumento proporcional também é verificado na complexidade dos mecanismos envolvidos na geração de uma resposta estímulo-específica e célula-específica.

O primeiro quesito refere-se à grande dinâmica que permeia esta via. Em células não-estimuladas, a manutenção dos complexos NF κ B:I κ B no citoplasma não é um processo estático, mas sim, resultado de um equilíbrio dinâmico do fluxo de entrada e saída nuclear deste complexo (Huang et al., 2000). A própria ligação entre NF κ B e I κ B é dinâmica, pois a baixa afinidade desta ligação favorece a dissociação e associação recorrentes, permitindo que pequenas quantidades de NF κ B livre transloque-se naturalmente ao núcleo (Carlotti et al., 2000). Adicionalmente, as proteínas I κ B também são encontradas no núcleo, onde acredita-se que contribuam para a finalização ou modulação da resposta mediada por NF κ B. A I κ B, por exemplo, tem sua transcrição induzida pelo próprio NF κ B e é capaz de se complexar com o NF κ B nuclear que está

ligado ao DNA e carregá-lo de volta ao citoplasma, pois possui um domínio de exportação nuclear em sua estrutura (Lee e Hannink, 2001).

De modo geral, as IKB típicas podem contribuir para a modulação e especificidade da via NFκB a ser ativada pela afinidade diferencial de ligação aos dímeros de NFκB e também por apresentarem diferentes cinéticas de degradação. A IKB β , por exemplo, liga-se preferencialmente à heterodímeros de p50:RelA e sua degradação é induzida pela maioria dos estímulos que ativam NFκB, sendo rápida e transiente. Já a IKB δ liga-se às subunidades RelA e c-Rel com afinidades semelhantes, mas sua degradação é induzida por um número de estímulos mais restrito, principalmente LPS e IL-1 (Thompson et al., 1995), além de ser mais lenta que a de IKB β . IKB δ também é capaz de se ligar ao dímero p50:RelA nos promotores gênicos, prolongando a resposta por estabilizá-los e impedir que a IKB β retire esse complexo do núcleo (Thompson et al., 1995, Suyang et al., 1996). Foi observado que fibroblastos de camundongos knockouts que expressam somente IKB δ ou somente IKB β apresentam uma ativação de NFκB intermitente, em oposição ao padrão oscilatório e transiente encontrado nos animais que contêm apenas a IKB β (Hoffmann et al., 2002). A IKB γ , encontrada em quantidades maiores que de IKB β em células B, apresenta predominância de ligação aos dímeros RelA:RelA e RelA:c-Rel que, como visto anteriormente, ligam-se preferencialmente a determinados promotores, como o de IL-8 (revisado por Whiteside et al., 1997; Doerre et al., 2005).

As IKB atípicas também estão altamente relacionadas à modulação das vias de NFκB justamente por atuarem exclusivamente no núcleo celular (revisado por Vallabhapurapu e Karin, 2009). A IKB ζ (zeta) é expressa após estimulação por IL-1 ou

LPS e possui preferência de ligação à p50, tornando esta subunidade transcricionalmente ativa e induzindo a transcrição de IL-6 e IL-12 em macrófagos (Yamamoto et al., 2004; Trinh et al., 2008). Esse efeito é semelhante ao de BCL-3 quanto à modulação da atividade dos homodímeros de p50 e p52 (Fujita et al., 1993; Cristofanon et al., 2009). A IKBNS, por sua vez, é induzida rapidamente em timócitos após a estimulação de TCR (T-cell receptor) e inibe a transcrição gênica induzida por NFkB, participando do processo de seleção negativa das células T (Fiorini et al., 2002). Esse efeito inibitório de IKBNS também foi observado em macrófagos e células dendríticas ativados por LPS e pode estar relacionado a um favorecimento da ligação do dímero inibitório p50:p50 ao DNA (Hirotsu et al., 2005; Kuwata et al., 2006).

Além das IKBs, também foi demonstrada a presença nuclear das proteínas IKKs, onde são capazes de modular a via através de fosforilação direta das subunidades de NFkB, principalmente de RelA, ou então de co-ativadores, co-repressores e histonas, na maquinaria de transcrição (Anest et al., 2003; Verma, 2004; Hoberg et al., 2004, 2006). De fato, a fosforilação das subunidades de NFkB tem sido relatada como um importante mecanismo pelo qual a via consegue especificidade (revisado por Viatour, 2005). Mas outras alterações pós-traducionais também são capazes de modular a via NFkB, tais como acetilação e desacetilação (Hou et al., 2003), nitração (Park et al., 2005), S-nitrosilação (Grumbach et al., 2005) e sumoilização de suas subunidades (Mankan et al., 2009).

1.7. Ativação constitutiva de NFkB

Embora haja um maior conhecimento dos efeitos da ativação da via de sinalização NFkB, vem se acumulando dados que mostram uma ativação basal deste fator. Consideráveis quantidades de NFkB estão presentes no núcleo celular sob condições fisiológicas e a utilização de animais knockout tem contribuído para a compreensão de sua funcionalidade e importância. As células hematopoiéticas e neuronais estão dentre as principais células que apresentam NFkB ativado constitutivamente e cuja relevância funcional é conhecida. Nas primeiras, foi relatada a participação de NFkB na mediação dos processos de diferenciação e maturação, enquanto que nos neurônios essa via está relacionada tanto a processos de neuroproteção quanto de neurodegeneração (Ghosh et al., 1998; Kaltschmidt e Kaltschmidt, 2000).

As células neuronais apresentam grandes quantidades de NFkB nuclear constitutivamente ativado quando comparadas às células de outros tecidos. Isso é atribuído à intensa atividade elétrica e transmissão sináptica que ocorrem nessas células. Esses mecanismos já se demonstraram potentes indutores da via NFkB, ao mesmo tempo em que inibidores da geração de potencial de ação e antagonistas de receptores de glutamato diminuem os níveis nucleares deste fator de transcrição (Mattson e Camandola, 2001).

As principais funções relacionadas ao NFkB neuronal, induzido ou constitutivo, são descritas nos mecanismos de neuroproteção (regulação do íon cálcio, geração de novas sinapses, balanceamento na produção de ROS – espécies reativas de oxigênio – e

transcrição de genes anti-apoptóticos) (Kaltschmidt et al., 2005); de plasticidade neuronal (modulação de receptores de glutamato e de sinapses) (Mikenberg et al., 2007); em processos cognitivos e comportamentais (Mattson, 2005); e em processos inflamatórios centrais, nos quais NFκB é ativado tanto nas células neurais como nas gliais. Nessas últimas, ele induz a transcrição de citocinas como TNF, IL-1 e IL-6, ROS e moléculas de adesão, que regulam a migração celular ao local de agressão. Nos neurônios, seu papel é dual, podendo exercer tanto efeito pró-apoptótico quanto de neuroproteção contra a citotoxicidade local (Mémet, 2006). O tipo da resposta dependerá do estímulo e de sua duração.

As subunidades mais comumente encontradas nas células neuronais são a p53 e RelA que, além de estarem constitutivamente presentes, podem ainda ser ativadas por estímulos como TNF, Fas ligante, glutamato e fatores de crescimento (Mattson, 2005). Dentre os genes regulados por NFκB estão a enzima antioxidante Mn-SOD (superóxido dismutase dependente de manganês), moléculas inibidoras (IAPs) ou ativadoras de apoptose, subunidades de canal iônico de cálcio dependente de voltagem e de canal glutamatérgico (revisto por Kaltschmidt e Kaltschmidt, 2009). A inibição da via NFκB em animais transgênicos induz a morte celular frente a estímulos por neurotoxinas (Fridmacher et al., 2003), enquanto que sua hiperexpressão tem sido cada vez mais relacionada a doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson (revisto por Kaltschmidt e Kaltschmidt, 2000; Mattson e Camandola, 2001; Tergaonkar, 2006). Assim, postula-se que a relação entre a função de NFκB e seus níveis nucleares obedeça a uma curva em forma de “U” invertido, em que uma ativação basal é indispensável,

mas alterações que elevem ou inibam excessivamente sua atividade, são danosas (Kaltschmidt et al., 2005; Pizzi et al., 2009).

Além dessas importantes funções neuronais, a via NFκB também já foi descrita como responsável por modulações no sistema neuro-endócrino. Isso foi demonstrado na glândula pineal, importante órgão transmissor da informação fótica ambiental ao organismo por produzir o hormônio melatonina de forma rítmica, somente na fase de escuro. Conforme discutido mais adiante, a melatonina é uma molécula bem versátil, com diversas funções relatadas. Apesar de sua síntese ser majoritariamente controlada por uma via poli-sináptica originária do hipotálamo, foi demonstrado que a glândula é capaz de responder a agentes pró e antiinflamatórios presentes na corrente sanguínea, modulando sua atividade biossintética (Ferreira et al., 2005; Fernandes et al., 2006). O NFκB parece ser uma peça-chave nesses processos modulatórios, atuando na regulação de genes essenciais à síntese do hormônio melatonina e correspondendo a um importante elo entre a glândula pineal e o sistema imune (Markus et al., 2007). Já em situações fisiológicas, não há relatos sobre a relevância desta via de sinalização à glândula pineal, sendo justamente o foco da presente dissertação.

2. Glândula pineal

A glândula pineal é um órgão conhecido a cerca de 2000 anos. Seu primeiro registro data do século II d.C. por Galeno, com base nas observações feitas anteriormente pelo anatomista grego Herophilus (325-280 a.C.). O nome “pineal” é devido à descrição de seu formato de pinha, pinea em latim. Pela sua localização central no cérebro de humanos e por ser uma estrutura única, não pareada, acreditava-se que a pineal funcionasse como uma válvula controladora do fluxo dos pensamentos, que estariam armazenados nos ventrículos (Axelrod, 1974).

Mesmo muitos séculos depois, esse papel metafísico ainda era atribuído à glândula. Em 1662, o filósofo francês René Descartes descreveu a pineal como sendo a sede da alma racional, capaz de controlar o fluxo do espírito animal aos nervos motores e, assim, controlar o movimento do corpo. De acordo com sua hipótese, os olhos fariam a percepção do mundo real, exterior, transmitiriam esta percepção à glândula, e esta controlaria o fluxo de fluidos às demais partes do corpo (Arendt, 1995) sendo, portanto, o sítio de confluência entre a alma e o corpo físico. Apesar de esta ser uma explicação filosófica da pineal, Descartes estava certo quanto à existência de uma comunicação entre ela e o exterior do organismo, mediada pela percepção retiniana.

A glândula pineal ganhou atenção científica somente no final do século XIX e início do século XX, com o relato de um caso de um garoto com puberdade precoce e que também apresentava um tumor na pineal. Nos anos seguintes, diversos relatos semelhantes foram descritos e a interação entre a pineal e o sistema reprodutor foi intensamente pesquisada. Mesmo assim, diversos aspectos ainda contribuíam para que

muitos pesquisadores se mantivessem céticos quanto a qualquer funcionalidade deste órgão, dentre eles: a falta de resultados claros nas pesquisas; a observação de que a pineal sofre uma calcificação em indivíduos adultos, o que geralmente está relacionado a uma perda funcional; e ainda a relação filogenética entre a pineal de mamíferos e o órgão parietal (ou “terceiro olho”) de vertebrados inferiores, nos quais exerce função de fotorrecepção e, portanto, poderia se tratar simplesmente de um órgão vestigial nos vertebrados superiores (Dandy, 1915; Oksche, 1965).

Grande avanço foi obtido em 1958 por Aaron B. Lerner que, estudando as alterações na coloração da pele de anfíbios, descobriu uma substância presente em extratos de pineais de bovinos, muito potente em agregar os pigmentos de melanina. Esta substância foi isolada e caracterizada quanto à sua estrutura química, recebendo o nome de melatonina (Lerner et al., 1958). Essa denominação é decorrente da junção de dois fatos: pela molécula atuar sobre o pigmento melanina, presente nos melanócitos epidérmicos de anfíbios, e por ser derivada da serotonina (Reiter et al., 2000). Tal descoberta revigorou os estudos sobre a pineal e em pouco tempo já foram investigados outros locais produtores desse novo hormônio, suas vias metabólicas e até mesmo o caráter rítmico com que a pineal produz a melatonina (Lerner et al., 1960; Axelrod e Weissbach, 1961; Quay, 1963 e 1964; Klein e Weller, 1970).

A importância da relação entre a síntese de melatonina e o ciclo claro/escuro ambiental foi observada ainda nas investigações sobre os efeitos deste hormônio no sistema reprodutor. Roedores mantidos em fotoperíodo curto (fase de claro mais curta que a de escuro) apresentam redução no tamanho das gônadas, sendo esse efeito revertido com a extirpação da glândula pineal. Já em animais mantidos em fotoperíodo

longo (fase de claro longa e de escuro curta), isso não ocorre (Kitay e Altschule, 1954; Axelrod, 1974). A capacidade reprodutiva desses animais apresenta variação sazonal bem definida e a detecção de que a melatonina é o hormônio capaz de transduzir humoralmente a informação fótica ambiental explicou as grandes diferenças observadas nos resultados com administração exógena de melatonina ou com pinealectomia, já que seus efeitos são organismo-dependente e fotoperíodo-dependente (Reiter, 1980). Esboçava-se assim o primeiro e um dos principais papéis da melatonina: o de sincronizar ritmos endógenos às variações ambientais diárias ou anuais, contribuindo para o sistema de temporização interno. Esse sistema garante organização temporal nas funções fisiológicas, permitindo ao organismo antecipação e adaptação aos fenômenos cíclicos ambientais, como o dia e noite e as estações do ano (Menaker et al., 1997).

2.1. Glândula pineal e ritmos biológicos

Assim como as descobertas sobre a melatonina, o desenvolvimento da ciência que estuda os ritmos biológicos – a Cronobiologia – também ocorreu entre a segunda metade e o final do século XX. Embora esses estudos tenham ocorrido paralelamente, a glândula pineal pode ser considerada um elo central dentro do sistema de temporização interno de mamíferos. Ao mesmo tempo em que a síntese rítmica de melatonina é um típico exemplo de ritmo biológico endógeno sob controle do relógio biológico central, sua liberação na circulação também é essencial para a sincronização de outros ritmos. Para a compreensão desta relação, faz-se necessária uma breve descrição a respeito dos estudos sobre ritmos biológicos.

Os primeiros relatos sobre a existência de ritmos biológicos datam da época de Aristóteles (384-322 a.C.) e Hipócrates (460-377 a.C.), apesar de a cronobiologia como ciência ser uma área relativamente nova (Grant, 1974). Estes primeiros relatos, e todos os demais até o século XIX, referiam-se principalmente a observações dos movimentos de abertura e fechamento de folhas e flores de diversas plantas. Foi construído até mesmo um "relógio floral" por Lineu, no século XVIII, com base em seus conhecimentos sobre a hora do dia em que determinadas flores se abrem (Chandrashekar, 2006).

Dentre estes primeiros trabalhos, destaca-se o estudo realizado pelo astrônomo francês Jean Jacques de Mairan, em 1729, relatando a persistência do movimento de abertura e fechamento dos folíolos de uma espécie de Mimosa, mesmo com a transferência da planta para o interior de uma caverna, em condição de escuro total e constante (apud Chandrashekar, 2006). Este relato foi essencial à compreensão de que os ritmos biológicos são originados por mecanismos endógenos, e não por forças ambientais externas.

Já no século XX, diversas outras observações corroboraram o relato inicial de Jacques de Mairan, demonstrando que outros ritmos biológicos, como o de atividade e repouso, continuavam a ocorrer mesmo em animais mantidos em condições constantes de iluminação e temperatura. Entretanto, a expressão dos ritmos nessas condições constantes exibe sempre um período próximo de 24 horas, mas nunca exato (Pittendrigh, 1993). Ritmos com esse período foram então chamados de circadianos (circa = cerca de; diem = dia). Importante conceituar os parâmetros utilizados para descrever uma oscilação. São eles: frequência (número de ciclos por unidade de tempo),

período (a quantidade de tempo necessária para um ciclo se completar), amplitude (a extensão de uma oscilação) e fase (cada fração de um ciclo inteiro). Dessa forma, o ciclo claro/escuro ambiental é um exemplo de oscilação que apresenta um período de 24h, composto por duas fases: a de claro e a de escuro.

Em condições naturais, o chamado relógio biológico utiliza-se das variações ambientais cíclicas, como dia/noite, para ajustar seu período às 24h diárias. O “agente” sincronizador recebeu o nome de Zeitgeber pelo pesquisador Aschoff, palavra alemã que significa “doador de tempo” (Pittendrigh et al., 1958). Desde então, a palavra Zeitgeber (ZT) foi incorporada aos conceitos de cronobiologia. Em concordância com as primeiras observações de ritmos, o ciclo claro/escuro ambiental é realmente o principal Zeitgeber para a maioria dos organismos, embora existam situações em que outros Zeitgebers, como alimentação ou comportamento social, possam prevalecer (Challet et al., 1997; Kalsbeek et al., 1998). Na ausência de um Zeitgeber, ou seja, em condições constantes, o ritmo é expresso com seu período endógeno (τ), levemente diferente de 24h, e diz-se que está em livre-curso.

Com o avanço nos estudos anatômicos em busca da localização da maquinaria responsável pelo sistema oscilatório endógeno, os núcleos supraquiasmáticos (NSQ) hipotalâmicos foram identificados como a sede do relógio biológico central de mamíferos (Inouye e Kawamura, 1979). As bases moleculares desta maquinaria também foram desvendadas com a descoberta de alguns genes relacionados à geração de ritmos endógenos. O primeiro destes genes foi o gene *per*, de *period*, descrito em mutantes de *Drosophila melanogaster* que apresentavam alterações no período do ritmo de eclosão das pupas (Konopka e Benzer, 1971). Desde então, a lista de genes relacionados aos ritmos

circadianos vem aumentando cada vez mais. Esses genes foram denominados genes do relógio (do inglês clock genes), sendo que as proteínas codificadas por eles atuam como fatores de transcrição, regulando sua própria transcrição gênica e também a de outros genes alvos. Assim, diferentes complexos protéicos estão ativos em diferentes fases do dia, gerando uma oscilação endógena e auto-sustentada por alças de retroalimentação (revisto por Ko e Takahashi, 2006). Além de se auto-regularem, essas proteínas também atuam como fatores de transcrição de outros genes, os chamados clock controlled genes (ccg), através dos quais o relógio biológico central sincroniza as demais partes do organismo por vias eferentes neurais e humorais. Um exemplo de ccg é o neurotransmissor vasopressina, liberado ritmicamente pelos NSQ (Duffield, 2003).

O ritmo gerado nos NSQ é sincronizado diariamente à informação fótica ambiental proveniente da percepção retiniana e transmitida via trato retino-hipotalâmico. Os neurotransmissores glutamato (Ding et al., 1997) e PACAP (peptídeo ativador da adenilil ciclase na pituitária) (Hannibal et al., 1997; revisto por Fahrenkrug, 2006) são essenciais neste processo de sincronização, sendo capazes de alterar a fase do ritmo circadiano de disparos elétricos destes neurônios (revisto por Kalsbeek et al., 2006b).

Um dos principais ritmos endógenos sincronizados pelos NSQ é o de produção da melatonina pela glândula pineal. A liberação rítmica deste hormônio na corrente sanguínea corresponde, inclusive, à principal via humoral sinalizadora do fotoperíodo ambiental, sincronizando diversos outros ritmos biológicos (Reiter, 1993).

2.2. Características anatômicas e estruturais da glândula pineal

A glândula pineal é caracterizada como um transdutor neuroendócrino, capaz de converter sinalizações neurais em sinalizações endócrinas (Axelrod, 1974). Situada no epítalamo, origina-se a partir de uma evaginação do teto do III ventrículo, cavidade pertencente ao diencefalo, entre as comissuras habenular e posterior (Arendt, 1995). De modo geral, a pineal pode ser dividida em duas porções contíguas: uma profunda e outra mais superficial. A porção profunda localiza-se próximo às comissuras de onde se origina, enquanto que o corpo pineal pode localizar-se nesta mesma região ou mais superficialmente, dependendo da espécie considerada. No caso dos roedores, por exemplo, a pineal é bem superficial, tendo migrado na direção dorso-caudal e uma haste a comunica com a porção profunda (revisto por Simonneaux e Ribelayga, 2003).

Estruturalmente, a glândula pineal de mamíferos é composta por diversos tipos celulares (revisto por Møller e Baeres, 2002). As células predominantes são as neuroendócrinas, responsáveis pela produção de melatonina e denominadas de pinealócitos. Essas células são derivadas a partir de linhagens neuronais na ontogênese e correspondem a cerca de 80% da constituição da glândula pineal (Arendt, 1995; Ekström e Meissl, 2003). Também estão presentes macrófagos e células gliais, mais especificamente astroglia e microglia, sendo que esta última, assim como os macrófagos, pode ter função fagocitária (Pedersen et al., 1993; Sato et al., 1996). Por fim, a glândula pineal apresenta ainda células neuronais, responsáveis pela liberação de diversas substâncias atuantes nos pinealócitos (Møller, 1997), com destaque para os

neurônios simpáticos, que correspondem à principal inervação da glândula e a mais importante funcionalmente (Kappers, 1960).

2.2.1. Inervação simpática

Estudos anatômicos demonstraram que as fibras simpáticas que inervam a pineal são provenientes do gânglio cervical superior (Kappers, 1960). Suas terminações nervosas apresentam vesículas granulares que contém o neurotransmissor noradrenalina (Wolfe et al., 1962), e os neuromoduladores ATP (adenosina tri-fosfato) (Mortani-Barbosa et al., 2000) e neuropeptídeo Y (NPY) (Schon et al., 1985). A noradrenalina é o principal indutor da síntese de melatonina e sua liberação pelos terminais simpáticos é regulada por uma via proveniente dos núcleos supraquiasmáticos hipotalâmicos. Já o ATP atua via receptores purinérgicos P2Y₁, potenciando a síntese de melatonina induzida por noradrenalina (Ferreira et al., 1994, 2003). O NPY, por sua vez, parece exercer uma regulação na estimulação noradrenérgica, atuando tanto pré-sinápticamente (Olcese, 1991; Mikkelsen e Møller, 1999) quanto diretamente nos pinealócitos (Simonneaux et al., 1994; 1999).

2.2.2. Ineruações não-adrenérgicas

Embora em menor densidade que a inervação simpática, a pineal também recebe fibras nervosas provenientes de diversos locais, tais como do núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN), do folheto intergeniculado talâmico (IGL), do núcleo dorsal da rafe

(Leander et al., 1999), das comissuras habenular e posterior, e até mesmo do gânglio trigeminal (Reuss, 1999; revisto por Simonneaux e Ribelayga, 2003). As fibras peptidérgicas são abundantes e todas essas inervações permitem que os pinealócitos entrem em contato com uma grande variedade de substâncias, como ocitocina, substância P, PACAP, CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina), dopamina, serotonina (5-HT), peptídeo intestinal vasoativo (VIP), vasopressina (VP), acetilcolina, ácido gama-aminobutírico (GABA). A ação dessas substâncias geralmente está relacionada a uma modulação da transmissão sináptica, não exercendo papel isoladamente.

Um efeito colinérgico sobre a pineal também tem sido relatado. De modo geral, esse efeito é tido como inibitório, embora o mecanismo de ação ainda não seja bem compreendido. Essa inibição pode ocorrer tanto pré-sinápticamente (Drijfhout et al., 1996) quanto diretamente nos pinealócitos, através da ativação de receptores muscarínicos e nicotínicos (Stankov et al., 1993; Phansuwan-pujito et al., 1999; revisto por Wessler et al., 1997).

A importância de outras inervações na pineal, que não a simpática, pode ser exemplificada pelo relato de que um simples pulso de luz no meio da fase de escuro é suficiente para reduzir drasticamente os níveis de melatonina. Acredita-se que esse efeito inibitório imediato seja exercido pela inervação proveniente do IGL, que contém principalmente o neurotransmissor GABA (Cipolla-Neto et al., 1995; Sakai et al., 2001).

Esses dados em conjunto indicam que o controle fisiológico da glândula pineal deve ser exercido por uma rede complexa de aferências neurais, com liberação dos mais

variados neurotransmissores e neuromoduladores, cuja interação resulta no padrão rítmico e bem sincronizado da produção de melatonina.

2.3. Síntese de melatonina pela glândula pineal

O controle neural da síntese de melatonina pela glândula pineal é exercido pelo NSQ, sede do relógio biológico central, através de uma via polissináptica. Esta via inicia-se na retina, onde ocorre a conversão da informação fótica em sinais neurais que, por sua vez, são enviados pelo nervo óptico aos NSQ via trato retino-hipotalâmico. Os NSQ projetam-se aos neurônios autônomos do PVN, havendo liberação do neurotransmissor inibitório GABA sincronizadamente à presença de luz ambiental (Kalsbeek et al., 2000). Portanto, é neste ponto que a via sinalizadora à síntese de melatonina é inibida durante a fase de claro.

Na fase de escuro ambiental, a via prossegue dos neurônios do PVN à coluna intermediolateral da medula espinal (Teclerian-Mesbah et al., 1999), onde originam-se os neurônios pré-ganglionares que se projetam ao gânglio cervical superior. Por fim, os neurônios pós-ganglionares simpáticos inervam diretamente a pineal e há liberação de noradrenalina pelos terminais nervosos no parênquima da glândula, resultando na indução da produção de melatonina.

2.3.1. Cascata de sinalização noradrenérgica

A noradrenalina liberada pelos terminais simpáticos na fase de escuro atua sobre os adrenoceptores (Klein et al., 1983), principalmente do subtipo α_1 , que são receptores acoplados à proteína G estimulatória (Gs). Quando ativados, as subunidades α e γ da proteína G se separam da β , ainda na membrana plasmática, ativam a enzima adenilil ciclase (AC), convertora de AMP (monofosfato de adenosina) em AMP cíclico (AMPC). O aumento citoplasmático deste segundo mensageiro ativa a proteína quinase dependente de AMPC (PKA), responsável pela fosforilação de diversas proteínas, dentre as quais o fator de transcrição CREB (cyclic AMP response element-binding protein). Quando fosforilado, este fator forma homodímeros e liga-se a um coativador, o CBP (CREB-binding protein). Este complexo, por sua vez, liga-se a sequências de DNA específicas presentes na região promotora do gene da enzima arilalquilamina-N-acetiltransferase (AA-NAT) e induz sua transcrição, o que é essencial para completar a via biossintética da melatonina (Baler et al., 1997).

Além dessas sinalizações, a via ainda pode ser potenciada pela ativação de receptores α -adrenérgicos, pela noradrenalina, e P2Y₁ purinérgicos, pelo ATP liberado pelos mesmos terminais simpáticos. Os adrenoceptores α_1 são acoplados à proteína Gq, ativadora da enzima fosfolipase C que, por uma sequência de eventos, induz aumento de cálcio intracelular (Ca²⁺) e ativação da enzima quinase dependente de cálcio (PKC) (Tzavara et al., 1996). Essas últimas etapas também são observadas após ativação receptores P2Y₁ (Ferreira et al., 2003) e a regulação positiva de PKC sobre a enzima adenilil ciclase converge com a sinalização proveniente da ativação β -adrenérgica, aumentando os níveis de AMPC e

potenciando a via de sinalização necessária à transcrição de Aa-nat. Essas cascatas de sinalização encontram-se esquematizadas na figura 3.

A síntese de melatonina é iniciada pelo aminoácido triptofano, capturado da corrente sanguínea e hidroxilado a 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase. Em seguida, o 5-HTP é convertido a serotonina por uma descarboxilase de aminoácidos aromáticos (AAAD). Por sua vez, a serotonina é acetilada pela enzima AA-NAT à N-acetilserotonina (NAS), que é então metilada pela hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT), formando N-acetil-5-metoxitriptamina, também chamada de melatonina (fig. 3).

Além da via biossintética da melatonina, a serotonina serve de substrato em outros processos metabólicos como, por exemplo, de deaminação oxidativa pela enzima monoaminoxidase (MAO). Essa reação origina o composto 5-hidroxiacetaldeído, que é imediatamente reduzido a 5-hidroxitriptofol ou a ácido 5-hidroxiacético (5-HIAA). A ausência da enzima AA-NAT na fase de claro ambiental favorece a prevalência dessa via metabólica da serotonina (Simonneaux e Ribelayga, 2003).

A melatonina produzida e secretada pela pineal tem uma meia-vida curta na corrente sanguínea, de 30 a 60 minutos, sendo rapidamente metabolizada no fígado onde é primeiramente hidroxilada e, em seguida, conjugada a um sulfato formando 6-sulfatoximelatonina, composto secretado na urina (Arendt, 1995).

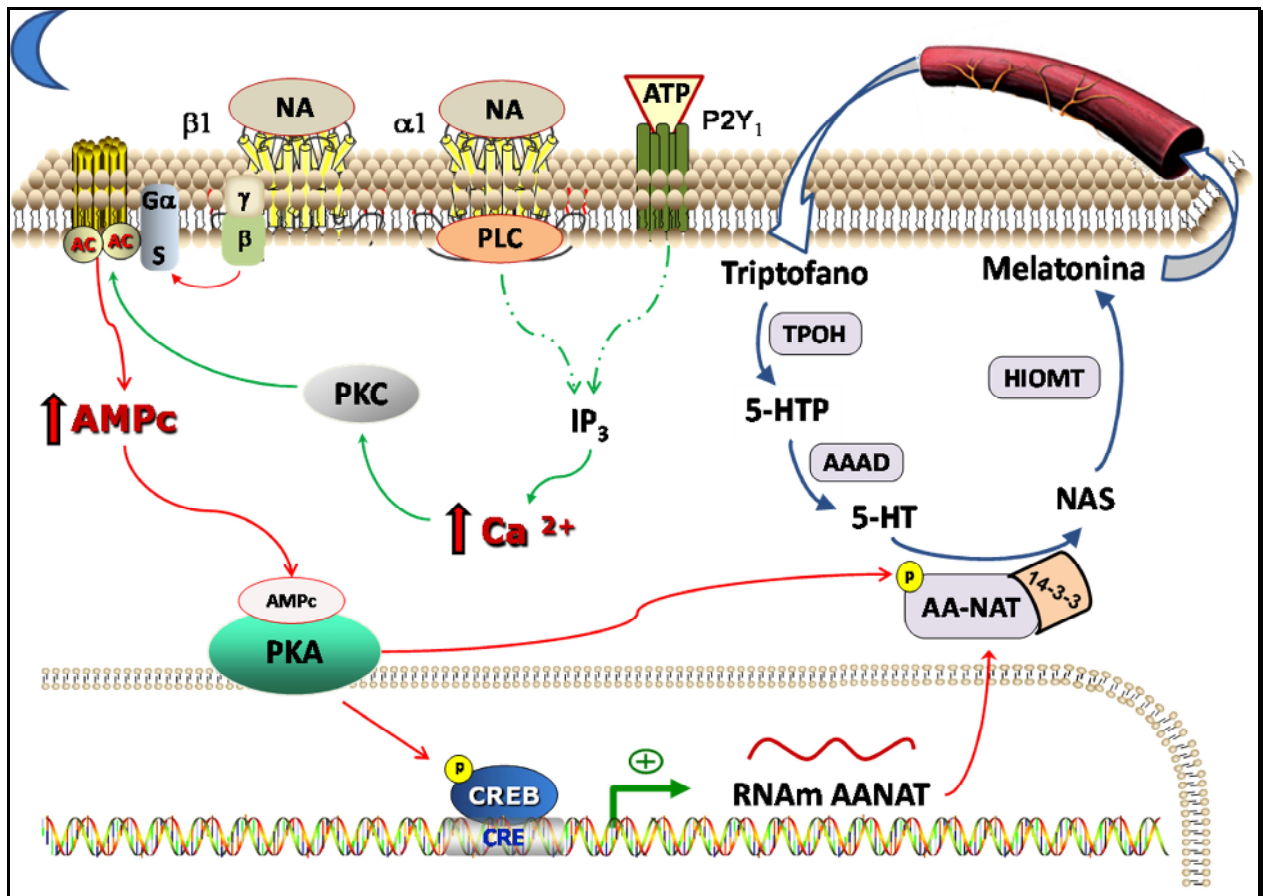


Figura 3 – Vias de sinalização na biossíntese de melatonina em glândulas pineais de ratos. A noradrenalina (NA) liberada noturnamente pelos terminais simpáticos ativa os receptores β e α adrenérgicos. Os receptores $\beta 1$ são acoplados à proteína G estimulatória (s) e sua ativação leva à ativação da enzima adenilil ciclase (AC) pela subunidade α da proteína G. Isso resulta em um aumento nos níveis intracelulares de AMP cíclico (AMPc), ativando PKA, que fosforila CREB, que induz a expressão gênica da enzima AA-NAT (setas vermelhas). A ativação dos receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos e P2Y₁ purinérgicos induz uma cascata de sinalização (setas verdes) que culmina em aumento de cálcio intracelular e ativação de PKC, cujo efeito positivo sobre AC potencia a cascata de sinalização iniciada pelos receptores β . Após a tradução da enzima AA-NAT, sua fosforilação por PKA e ligação à chaperona 14-3-3 estabilizam-a e a tornam ativa, sendo uma enzima-chave para a produção rítmica de melatonina. A síntese de melatonina encontra-se esquematizada no canto direito, iniciando com a captura do aminoácido triptofano da circulação. A descrição das etapas e das enzimas envolvidas está detalhada no texto. (PLC = fosfolipase C; IP₃ = inositol trifosfato; setas tracejadas = simplificação de uma sequência de eventos).

2.3.2. Regulação transcricional e pós-traducional da enzima AA-NAT

Em mamíferos roedores, o caráter rítmico na produção de melatonina é conferido pelo controle da expressão gênica de *Aa-nat*, descrito anteriormente e altamente relacionado à sinalização noradrenérgica. Acredita-se que o término da síntese também envolva uma regulação transcricional, mediada pelo fator inibitório ICER (inducible cAMP early repressor) que se acumula ao longo da noite também por indução noradrenérgica (Stehle et al., 1993).

Já em ungulados e primatas, o gene *Aa-nat* é transcrito continuamente ao longo do dia, porém, a proteína é continuamente degradada por proteassomas. Na fase de escuro, a cascata de sinalização noradrenérgica ativa a enzima PKA, que fosforila a enzima AA-NAT e possibilita sua ligação a uma proteína chaperona 14-3-3. Com isso, forma-se um complexo funcionalmente ativo e protegido contra ação proteassomal durante o escuro ambiental (Schomerus et al., 2000).

Além do sítio responsivo ao fator de transcrição CREB/CBP, estudos moleculares têm investigado outras sequências nucleotídicas presentes no promotor de *Aa-nat* que complementam a regulação gênica da síntese de melatonina. Já foram descritos os sítios gênicos exatos da região promotora que são responsivos ao AMPc, revelando inclusive a presença de sítios intrônicos essenciais para uma ativação máxima (Baler et al., 1997). De fato, os íntrons têm ganhado considerável atenção como importantes sítios regulatórios de muitos genes, e outras sequências regulatórias importantes já foram também encontradas no primeiro íntron de *Aa-nat*. É o caso das sequências responsáveis por conferir especificidade tecidual à expressão desta enzima,

de forma que somente a glândula pineal (e a retina, em alguns casos) manifeste este ritmo circadiano de transcrição de Aa-nat (Baler et al., 1999).

Outros complexos regulatórios transcricionais também estão presentes nos pinealócitos de roedores, embora suas funções exatas ainda não sejam bem compreendidas. É o caso dos genes do relógio que, assim como nos NSQ, também se expressam de forma rítmica. Apesar de o promotor do gene Aa-nat conter elementos E-box em seu promotor, que são responsivos às proteínas do relógio, não foi observada alteração na síntese de melatonina dependente destes fatores de transcrição nos mamíferos (Chen e Baler, 2000). Outro complexo presente é o de AP-1 (activator protein-1), formado por homo ou heterodímeros de membros da família FOS e JUN, incluindo FRA-2 (FOS-related antigen 2). Este complexo apresenta variação circadiana, com níveis aumentados no início da noite e que decaem ao final da fase de escuro, sendo estimulados adrenergicamente. O fator DREAM (downstream regulatory element antagonist modulator) é responsivo a alterações nos níveis de cálcio e sua ligação à região promotora de Aa-nat exibe um ritmo em oposição de fase ao de CREB, exercendo papel inibitório no controle circadiano da síntese de melatonina, assim como o ICER (revisto por Karolczak et al., 2005). Por fim, estudos iniciais indicam a possível presença de sequências consenso responsivas ao fator NFkB nas regiões promotoras e intrônicas de Aa-nat, cuja confirmação elucidará um importante mecanismo pelo qual NFkB modula a síntese de melatonina (Markus et al., 2007).

Conforme os estudos e as técnicas moleculares vão progredindo, novos fatores de transcrição, bem como seus respectivos sítios responsivos e funções, vão sendo

descobertos. De todo modo, o controle da transcrição gênica de Aa-nat parece ser o resultado de um equilíbrio dinâmico entre diversas proteínas presentes.

3. Funções da melatonina

A melatonina é uma molécula muito conservada filogeneticamente, sendo encontrada desde organismos unicelulares até plantas e vertebrados superiores (Pandi-Perumal et al., 2006). Conforme relatado, os primeiros efeitos descobertos da melatonina estão relacionados à mudança na coloração da pele de anfíbios e à ações pró ou anti-gonadotrófica, de acordo com a espécie considerada. A relação deste hormônio com as alterações sazonais observadas no sistema reprodutor de alguns animais logo revelou sua função cronobiótica, como sincronizadora dos ritmos biológicos às variações ambientais.

Além disso, diversas outras funções são atribuídas à melatonina, tais como antioxidante, oncostática, antienvelhecimento e imunomodulatória. Diversos são também seus mecanismos de ação, podendo atuar através de receptores de membrana acoplados à proteína G específicos (MT₁ e MT₂; revisto por Pandi-Perumal et al., 2006; Markus e Tamura, 2009), ou interagir diretamente com proteínas citosólicas e nucleares (Finocchiaro e Glikin, 1998), já que possui um alto coeficiente de partição óleo-água, passando facilmente pelas membranas (Shida et al., 1994). Dentre as moléculas intracelulares às quais a melatonina se liga estão a calmodulina, uma proteína reguladora de diversas enzimas quinases, e receptores nucleares da família do ácido retinóico (ROR 1, ROR 2, RZR , RZRβ) (revisto por Hardeland, 2009). As respostas

resultantes destas interações entre melatonina e proteínas intracelulares ainda são objetos de estudo das pesquisas atuais.

3.1. Efeito cronobiótico

Em todos os mamíferos, seja de hábito diurno ou noturno, a melatonina é encontrada na corrente sanguínea sinalizando a presença e a duração da fase de escuro ambiental. Além de atuar diretamente em todas as células do organismo, também exerce seu efeito cronobiótico sobre o próprio NSQ, contribuindo com a sincronização do relógio biológico (revisto por Pévet et al., 2002). Além de modular as alterações sazonais relacionadas à reprodução, também regula a manifestação de outros ritmos, como o de atividade/repouso e de alterações circadianas e/ou sazonais observadas no sistema imune, tais como a proliferação celular na medula óssea e no sistema linfóide (Haus et al., 1983). Em humanos, uma produção dessincronizada de melatonina tem sido relacionada a distúrbios como insônia e mal-estar causados por trabalho noturno ou pelo efeito "jet-lag", referente à adaptação a um novo fuso horário em viagens transmeridionais. O tratamento com administração de melatonina exógena tem sido promissor nestes casos (Brzezinski, 1997; Paul et al., 2010).

3.2. Efeito antioxidante

Como antioxidante, a melatonina possui capacidade tanto de sequestrar diretamente radicais livres quanto de potenciar a atividade de enzimas antioxidantes, auxiliando também na regeneração dessas enzimas pelos processos redox. A melatonina atende os pré-requisitos necessários para ser considerada um potente agente antioxidante, pois além de seu próprio efeito, os produtos que gera em sua cadeia oxidativa são tão ou mais antioxidantes quanto ela. Os compostos AFMK (N¹-acetil-N²-formil-5-metoxiquinuramina) e AMK (N¹-acetil-5-metoxiquinuramina), capazes de reagir com espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, são os principais exemplos dessa via (Hardeland et al., 2003, 2006, Silva et al., 2006).

3.3. Ações imunomodulatória, oncostática e antienvhecimento

A propriedade imunomodulatória da melatonina tem sido uma de suas funções mais estudadas nos últimos anos. Além de sua função cronobiótica sobre o sistema imune, a administração exógena e a sua produção extra-pineal também modulam os componentes desse sistema. A produção extra-pineal de melatonina ocorre em situações especiais, como na vigência de um quadro inflamatório, tendo sido verificada em diversas células como as epidérmicas (Slominski et al., 2005), no trato gastrointestinal, na retina e em células imunocompetentes como NK (natural killers), timócitos, linfócitos, macrófagos e endoteliais (revisado por Kvetnoy, 1999; Conti et al., 2000). Nestas condições, são produzidas grandes quantidades de melatonina, na faixa de μM a mM ,

contrastando com a produção pineal, que ocorre na faixa de nM. Estudos realizados com altas concentrações de melatonina, de origem extra-pineal ou exógena, revelaram diversas modulações na resposta imune (revisto por Carrillo-Vico et al., 2005), tais como aumento da proliferação de linfócitos-T, da apresentação de antígenos pelos macrófagos e da atividade fagocitária destes (Pontes et al., 2006); aumento na atividade de células do sistema linfóide, do baço e da medula óssea; estimulação da síntese de algumas citocinas, como IL-2, IFN- γ e IL-6 (revisto por Miller et al., 2006) e regulação da síntese de óxido nítrico pelas células endoteliais (Tamura et al., 2009). Por outro lado, a melatonina em concentrações compatíveis às encontradas no plasma em seu pico noturno parece exercer um efeito antiinflamatório, interferindo no processo de migração celular por inibir o rolamento e adesão de células imunocompetentes sobre a camada endotelial (Lotufo et al., 2001). Dessa forma, o efeito que a melatonina exerce sobre o sistema imune é dependente de seu local de produção e da quantidade produzida, não podendo ser caracterizada como um hormônio exclusivamente pró ou anti-inflamatório.

Já a sua ação oncostática está relacionada a suas propriedades anti-proliferativa e anti-angiogênica (Lissoni et al., 2001; Blask et al., 2005), provavelmente resultantes de seus efeitos imunomodulatórios. Essas características da melatonina têm sido estudadas mais a fundo em pesquisas que defendem a utilização dessa molécula como coadjuvante no tratamento de diversos tipos de câncer humanos (Vijayalaxmi et al., 2002; Anisimov et al., 2006; Jung e Ahmad, 2006).

Por fim, a ação antienvelhecimento da melatonina parece estar vinculada aos seus efeitos antioxidantes, uma vez em que o estresse oxidativo é uma das principais

causas dos danos moleculares que levam à degeneração celular e à disfunção sistêmica (Poeggeler, 2005). Muitos trabalhos relatam que os níveis de melatonina decaem de 20% a 80% com o avançar da idade (Skene et al., 1990; Reiter, 1995; Liu et al., 1999) e que a perda do efeito neuroprotetor dessa molécula pode estar correlacionada ao surgimento de doenças relacionadas ao envelhecimento (Wu et al., 2003). De fato, a reposição hormonal de melatonina tem-se mostrado efetiva em amenizar os déficits cognitivos e em diminuir a expressão de marcadores neurotóxicos em modelos animais e em pacientes com a doença de Alzheimer (Srinivasan et al., 2005; Cheng et al., 2006; Olcese et al., 2009).

Nota-se, portanto, que a melatonina tem sido considerada uma molécula multipotente e altamente promissora, dentro de cada uma de suas diferentes funções, e cujos estudos poderão levar à sua aplicação clínica de uma forma mais padronizada e consistente do que é verificado hoje em dia.

4. Eixo imune-pineal

A percepção da interação entre a melatonina e o sistema imune data da década de 1970, com os experimentos que buscavam compreender a função da pineal através de sua extirpação em animais em desenvolvimento. Essas primeiras observações revelaram que órgãos como o timo e glândula adrenal eram os mais afetados em decorrência da pinealectomia cirúrgica (Vaughan e Reiter, 1971; Csaba e Baráth, 1975). De fato, uma grande quantidade de estudos posteriores confirmou o papel imunomodulatório da melatonina (como descrito anteriormente), mas poucos

investigaram a modulação da atividade da pineal em decorrência da ativação do sistema imunológico. A existência dessa modulação foi primeiramente sugerida em um estudo de inflamação crônica em camundongos.

A injeção de BCG (Bacilo Calmette-Guerin) na pata de camundongos gera um inchaço local cujo tamanho varia de forma rítmica ao longo do dia, estando a pata maior na fase de claro do que na de escuro. O envolvimento da melatonina neste ritmo foi demonstrado pela pinealectomia desses animais. A extirpação da glândula pineal aboliu o ritmo de variação espessura da pata, enquanto que a reposição de melatonina na água de beber noturna desses animais foi suficiente para restaurá-lo (Lopes et al., 1997). Foi demonstrado, ainda, que a adrenalectomia (extirpação da glândula adrenal) também abolia o ritmo da espessura da pata e que esse efeito era decorrente de uma diminuição nos níveis circulantes de melatonina (Lopes et al., 2001). Tais resultados induziram ao questionamento sobre a existência de um efeito de substâncias envolvidas em um processo inflamatório sobre a pineal.

A existência de uma comunicação entre as glândulas adrenal e pineal na condição de inflamação foi confirmada e estudos posteriores demonstraram que a corticosterona é capaz de potenciar a síntese de melatonina pela glândula pineal, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. (Ferreira et al., 2005; Fernandes et al., 2009). O aumento nos níveis circulantes de corticosterona em decorrência de estresse moderado também potencia a síntese de melatonina (Couto-Moraes et al., 2009).

A resposividade da glândula pineal a outras substâncias envolvidas na resposta inflamatória também foi investigada. A incubação com TNF, uma citocina pró-inflamatória, gera uma supressão da produção de melatonina por inibição da expressão

gênica da enzima-chave AA-NAT (Fernandes et al., 2006). Esse efeito inibitório de TNF foi corroborado in vivo com um modelo de inflamação em humanos. Mulheres que desenvolveram mastite, um processo inflamatório não infeccioso causado pela sucção durante a amamentação, apresentaram altos níveis circulantes de TNF e abolição do ritmo diário de melatonina, sendo este ritmo restaurado somente após a resolução da inflamação, quando os níveis da citocina são zerados (Pontes et al., 2006). Dessa forma, substâncias anti e pró-inflamatórias (corticosterona e TNF, respectivamente) apresentam efeitos antagônicos quanto à modulação da atividade biossintética da glândula pineal.

Outros autores já admitiam a hipótese de a glândula pineal receber sinalizações periféricas provenientes do sistema imunológico (Skwarlo-Sonta, 1996, 2003; Tsai et al., 2001), alegando que isso constituiria um mecanismo de retroalimentação relevante para a manutenção da homeostase, já que a melatonina exerce importante papel modulatório nas células imunocompetentes. Entretanto, a análise conjunta dos dados obtidos por nosso grupo permitiu uma compreensão mais profunda a acerca dessa relação entre a pineal e o sistema imunológico, acarretando no desenvolvimento do conceito de “eixo imune-pineal” (Markus et al., 2007). As ações antagônicas entre TNF e corticosterona, foram as bases iniciais para a compreensão desta relação.

No início da montagem da resposta imune inata, os altos níveis de TNF produzidos inibem a síntese de melatonina pela pineal. Vale lembrar que, um dos efeitos imunomodulatórios da melatonina em concentrações fisiológicas é o de inibir o rolamento e a adesão de leucócitos sobre a camada endotelial, limitando a migração celular (Lotufo et al., 2001, 2006). Portanto, a inibição transiente de melatonina circulante

na circunstância de uma inflamação pode ser benéfica no sentido de permitir uma ativação mais eficaz do sistema imune. Concomitantemente, as células imunocompetentes ativadas passam a produzir melatonina em altas concentrações no local, o que auxilia na proliferação, atividade fagocitária e apresentação de antígenos por essas células (comentado anteriormente no item 3.3). Já na fase antiinflamatória da resposta e com a resolução da inflamação, a síntese pineal de melatonina é restaurada. Isso ocorre tanto pela diminuição na concentração dos fatores inibitórios, quanto pelo aumento da corticosterona circulante, que potencia a atividade biossintética da pineal.

Assim, em condições de ativação do sistema imunológico, o mecanismo clássico de regulação da glândula pineal pela informação fótica ambiental deixa de ser predominante e possibilita que a melatonina seja produzida em concentrações e em locais condizentes com as necessidades do organismo.

Novos estudos vêm sendo desenvolvidos para fortalecer esse conceito. A glândula pineal tem sido amplamente caracterizada quanto aos mecanismos que a torna responsável às substâncias envolvidas na resposta inflamatória. Na membrana dos pinealócitos já foram detectados receptores para TNF (TNFR1) (Sousa et al., 2009), para LPS (TLR4) (Armelin, 2009) e para glicocorticóides (GR) (Ferreira et al., 2005), o que demonstra a capacidade dessas células em responder diretamente a estas substâncias.

5. NFkB e a glândula pineal

Conforme já mencionado, a via NFkB é central na mediação dos efeitos modulatórios do sistema imune sobre a atividade da pineal, sendo que sua indução por TNF causa uma inibição na síntese de melatonina, enquanto que o bloqueio da sua translocação nuclear ou da sua ligação ao DNA por corticosterona potencia a atividade biossintética da pineal (Ferreira et al., 2005; Fernandes et al., 2006). Dessa forma, a presença da via NFkB nos pinealócitos constitui um elo essencial entre o sistema imune e a modulação da síntese de melatonina.

A constatação desta importante capacidade de NFkB em mediar os mecanismos modulatórios da síntese de melatonina levou ao questionamento da importância dessa via para a glândula pineal em situações fisiológicas. Além disso, o primeiro trabalho demonstrando a presença da via NFkB em pineais detectou que mesmo as glândulas que não receberam nenhum tratamento também apresentavam níveis quantificáveis de NFkB nuclear, indicando sua ativação constitutiva (Ferreira et al., 2005).

O número crescente de relatos indicando a importância fisiológica de NFkB nos mais diversos tipos celulares, aliado à capacidade efetiva deste fator em modular a síntese de melatonina, foram as bases que nortearam a pesquisa realizada na presente dissertação. A compreensão dos aspectos fisiológicos desta via na pineal é essencial ao entendimento dos mecanismos modulatórios sofridos na vigência de uma resposta imune, bem como à identificação de novos componentes moleculares envolvidos no controle da síntese basal de melatonina.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

O objetivo geral foi caracterizar, em condições fisiológicas, o fator de transcrição NFkB em glândulas pineais de rato. Para isso, foram analisados:

- o padrão de translocação nuclear do fator NFkB em glândulas pineais ao longo do dia;
- as subunidades que compõem o complexo NFkB na pineal;
- a relação entre a translocação nuclear de NFkB e a informação fotoperiódica;
- a influência de vias humorais e neurais que atingem a pineal sobre o ritmo de ativação deste fator de transcrição.

MATERIAL E MÉTODOS

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Em todos os experimentos foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) machos, da linhagem Wistar, pesando entre 180 e 210g, criados no biotério do Instituto de Biociências – USP, com matrizes procedentes do biotério central da Universidade Federal do Estado de São Paulo (UNIFESP). Os animais foram mantidos com água e ração ad libitum, em ciclo claro/escuro 12/12 h (luzes acesas 07h00 – 19h00; luzes apagadas 19h00 – 07h00), ou conforme especificado nos protocolos experimentais, sendo que o horário de acender as luzes corresponde ao Zeitgeber Time 0 (ZT 0). Na fase de claro, lâmpadas fluorescentes proviam cerca de 200 lux às gaiolas. Experimentos realizados no escuro foram feitos sob luz vermelha (red safe light filter Kodak 1A, cat. 1521517; Rochester, NY, USA), de intensidade menor que 0,1 lux.

Em todos os experimentos os animais foram sacrificados por decapitação sem a administração de anestésicos e as glândulas pineais foram imediatamente colocadas em cultura ou armazenadas a -80°C. Em alguns casos, o sangue do animal também foi coletado para dosagens hormonais.

Todos os procedimentos animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto de Biociência da USP (nº de licença 047/2007).

1.1. Animais em livre-curso

Grupos de animais foram mantidos em condição de escuro constante para a realização dos experimentos com animais em livre-curso, ou seja, que expressam seus ritmos com períodos endógenos, não sincronizados à informação fótica ambiental. Cada animal foi mantido isoladamente em uma gaiola permanecendo por 10 dias sob a condição de claro/escuro 12/12h. As caixas foram então transferidas para uma sala escura (equipada com luz vermelha e à prova de som), na qual permaneceram por cerca de 20 dias. A limpeza das caixas e reposição de água e comida foram feitas em horários aleatórios, sob luz vermelha.

O período endógeno (τ) dos ritmos circadianos de cada animal foi determinado com base no ritmo de atividade/repouso. Este, por sua vez, foi aferido indiretamente através do registro da ingestão líquida dos animais (Moraes et al., 1997). A caixa de cada animal apresenta dois eletrodos: um localizado na garrafa de água e outro em uma plataforma no piso da caixa, na mesma direção da garrafa. As grades das caixas são altas, de modo que o animal tenha que ficar na posição ereta para beber água. Dessa forma, a cada ingestão líquida o animal necessariamente faz contato simultâneo com o eletrodo da plataforma (onde pisa) e o da garrafa de água, fechando o circuito elétrico e emitindo um sinal registrado em computador (aparato esquematizado na figura 4A). Os registros foram utilizados para a construção de actogramas (registro do ritmo de atividade/repouso) para cada animal, o que permitiu calcular o horário circadiano em que estavam (Circadian Time – CT, sendo CT 12 definido como o horário do início da fase de atividade do animal). Um actograma representativo consta na figura 4B, na qual pode ser observada a fase inicial, em que os animais ainda são mantidos em ciclo

claro/escuro (fig. 4B, C/E) para adaptação à condição de isolamento; uma fase transiente, nos primeiros dias sob a condição de escuro constante, em que ainda não há uma diferenciação nítida da fase de atividade e de repouso; e, por fim, a situação de livre-curso, em que o ritmo de atividade/repouso é facilmente visualizado e manifesta-se com o período endógeno do animal, que é ligeiramente maior que 24h, o que implica em o horário de início da atividade ser um pouco mais tarde a cada dia (fig. 4B, barra em diagonal). Os cálculos foram realizados pelo programa computacional para cronobiologia “El Temps” (A. Díez-Noguera, University of Barcelona, 1999; www.el-temps.com).

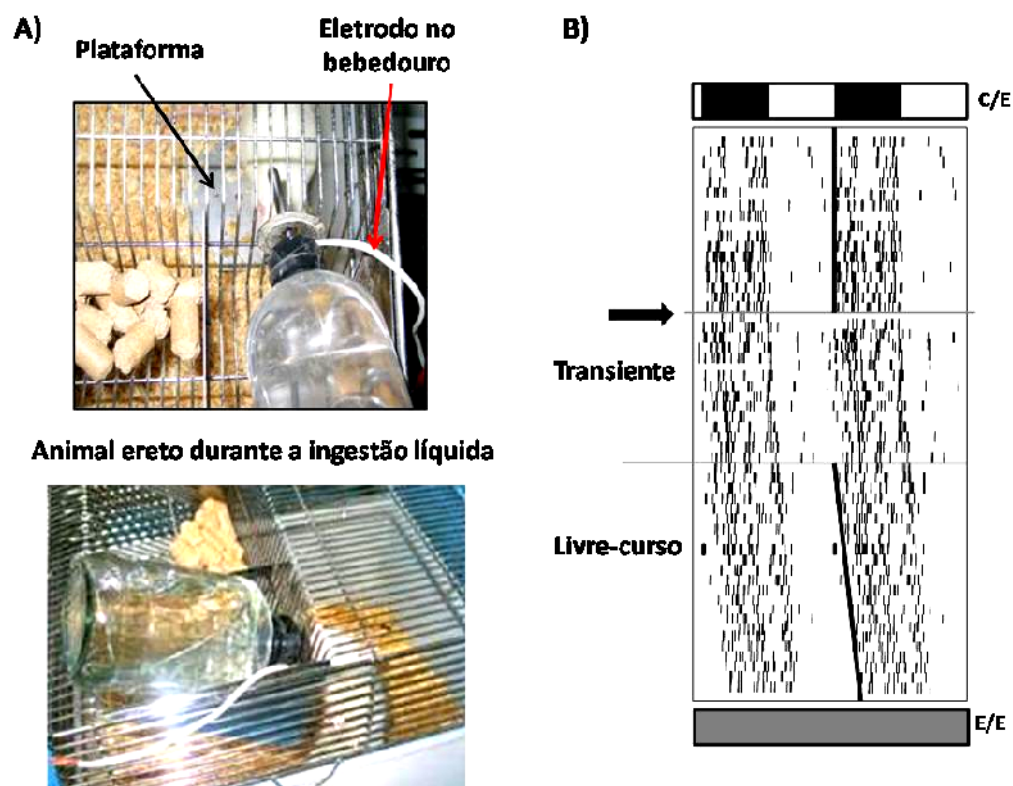


Figura 4 – A) Aparato utilizado para registrar a ingestão líquida de cada animal. B) Exemplo de actograma de um único animal construído a partir dos registros da ingestão líquida. A seta indica o momento em que os animais foram transferidos do ciclo claro/escuro (C/E) 12h/12h (barra superior) para a condição de escuro constante (E/E; barra inferior). Os termos “transiente” e “livre-curso” estão explicados no texto.

2. Drogas e reagentes

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

- Amershan Biosciences (Buckinghamshire, Reino Unido): poli(dIdC) double strand.
- Bio-Rad (Richmond, CA, EUA): acrilamida.
- Calbiochem (Darmstadt, Alemanha): NP40 (Nonidet-P40)
- GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido): coluna microSpin Sefadex G-25.
- Gibco BRL (Grand Island, NY, EUA): estreptomicina, glutamina, penicilina.
- Invitrogen Life Technology (Carlsbad, CA, EUA): ditioneitol (DTT), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), T4 polinucleotídeo quinase.
- Perkin Elmer (Boston, MA, EUA): Easy Tides® Adenosine 5'- triphosphate, [γ -³²P].
- Promega (Madison, WI, EUA): oligonucleotídeo consenso para NFkB (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3').
- Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA): anticorpos para as subunidades de NFkB p50 (C-19)X; p65 (C-20)X, p52 (K-27)X, c-REL (N)X.
- Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA): noradrenalina [(-) arterenol bitratate salt]; meio de cultura BGJb; melatonina; suramina, propranolol, prazosin, glicerol, bisacrilamida (N,N'-methylenebisacrylamide).

Os demais reagentes utilizados apresentavam grau de pureza analítico.

2.1. Preparo das drogas

O meio de cultura BGJb foi diluído em água deionizada, conforme instruções do fabricante, e foi adicionado HEPES (0,24 %), albumina bovina (1 mg/mL), glutamina (1%) e antibiótico (estreptomicina e penicilina, 1%).

A noradrenalina foi diluída em ácido clorídrico 0,01 M para o preparo de uma solução estoque (10 mM). As diluições seguintes foram feitas em solução aquosa de ácido ascórbico (50 mg/l).

Propranolol foi diluído em solução salina (0,9% NaCl) a uma concentração de 20 mg/mL; prazosin foi diluído em solução salina contendo 0,5% de etanol a 1mg/mL e suramina foi diluída em solução salina a 50 mg/mL. Todas essas soluções, inclusive a solução veículo (salina), foram administradas aos animais intraperitonealmente, em volume proporcional ao peso do animal (μl de droga = mg de peso).

A solução estoque de melatonina foi feita com etanol (10 mM em etanol 10%) e as diluições seguintes em água deionizada.

As demais drogas utilizadas e listadas anteriormente foram, quando necessário, diluídas em água deionizada purificada por sistema Milli-Q (Millipore[®]).

3. Cultura de Glândulas Pineais

Glândulas pineais recém retiradas dos animais foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços (TPP[®]) contendo 200 μl de meio de cultura BGJb, pH7,4, acrescido de glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 μg /mL) e mantidas à 37° C em uma atmosfera saturada de carbogênio (95% O₂ - 5% CO₂). Após o

tratamento em cultura, as glândulas pineais foram imediatamente armazenadas a -80°C para posterior dosagem de NF κ B nuclear.

4. Tratamentos in vitro

Para análise do efeito de diferentes substâncias sobre a translocação nuclear de NF κ B, glândulas pineais foram retiradas de animais sacrificados ao final da fase de claro (ZT 12), e foram imediatamente colocadas em cultura, conforme as condições descritas no item 5. Após um período de 30 minutos para estabilização das glândulas na condição de cultura, foi acrescentado meio de cultura contendo as substâncias cujo efeito sobre a pineal foi testado. Essas substâncias foram: noradrenalina (100 nM, de 30 seg a 15 min) e melatonina (1 mM, 3h), ambas em 200 μl de meio. Ao final dos tratamentos, as glândulas foram coletadas e processadas para análise de NF κ B.

5. Tratamentos in vivo

Para avaliar o efeito de diferentes neurotransmissores sobre a translocação nuclear de NF κ B, grupos de animais foram tratados com antagonistas de receptores dos tipos β -adrenérgico (propranolol, 20 mg/Kg), α -adrenérgico (prazosin, 1 mg/Kg) e P2 purinérgico (suramina, 100 mg/Kg). Todas as drogas foram diluídas em salina e administradas por injeção intraperitoneal, uma hora antes do início da fase de escuro (ZT 11). Animais controle receberam injeção de salina, seguindo o mesmo protocolo de administração. Os grupos de animais foram sacrificados nas fases de claro e de escuro, em torno do ZT 12, ou seja, imediatamente antes ou imediatamente após o apagar das luzes. No caso do propranolol, também foram realizados experimentos utilizando

protocolo de duas injeções deste antagonista, administradas em dois dias consecutivos no mesmo horário (ZT 11). Os animais injetados com propranolol ou salina foram sacrificados nos horários correspondentes ao ZT 9 (fase de claro) e ZT 18 (meio da fase de escuro).

6. Extração de proteína nuclear

Para a extração de proteína nuclear total, as glândulas pineais 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 homogenizador e pistilo para tubo plástico de 1,5 mL de volume. Em seguida, foram adicionados 12,5 μ l de NP40 (10%), um composto detergente para auxiliar no processo de lise. Após breve agitação em vórtex e incubação em gelo por 15 minutos, as amostras foram centrifugadas (12000 x g; 1 min; 4 °C) e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuspensão em 50 μ l do mesmo tampão de lise e seguiu-se uma nova centrifugação (12000 x g; 1 min; 4 °C). Novamente o sobrenadante foi descartado e as amostras foram ressuspensas em 20 μ l de tampão de extração nuclear (HEPES 10 mM, KCl 0,5 M, EDTA 1 mM pH 8,0; glicerol 10%, DTT 1 mM e PMSF 0,1 mM). Após incubação de 15 minutos em gelo, sob agitação, as amostras foram centrifugadas (20000 x g; 5 min; 4°C) e o sobrenadante contendo o extrato protéico nuclear foi transferido para um novo tubo e armazenado a -20°C. O conteúdo de proteína foi quantificado pelo espectrofotômetro Nanodrop a 280 nm (Uniscience, São Paulo, Brasil).

7. Ensaio de Eletromobilidade em Gel (EMSA ou Gel-Shift) e Super-Shift

Este ensaio foi utilizado para análise do conteúdo nuclear de NFkB em glândulas pineais. Os extratos de proteína (4 – 8 µg) foram primeiramente incubados com tampão de ensaio (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 1 mM, NaCl 50 mM, DTT 0,5 mM, EDTA 0,5 mM pH 8,0, 4% glicerol e 1 µg de poli(dIdC) por 20 minutos à temperatura ambiente, e em seguida adicionou-se 1 µl de uma sonda de oligonucleotídeo dupla-fita correspondente ao consenso para NFkB (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') marcada radioativamente. Essa marcação foi realizada pela incubação do oligonucleotídeo com a enzima T4 polinucleotídeo quinase (10 U) e 1 µl de [³²P]-ATP por 10 min à 37°C. A enzima substitui os fósforos do oligonucleotídeo por fósforo radioativo e o que não foi incorporado é removido por uma coluna de Sefadex G-25. Os extratos ficam incubados com a sonda (cerca de 40.000 c.p.m.) por 30min à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 2 µl de tampão de corrida (Tris HCl 250 mM pH 7,5, 4% glicerol e azul de bromo-fenol 0,2%, este presente somente no controle negativo para acompanhar a corrida) e as amostras foram aplicadas em gel de poli(acrilamida não-desnaturante, 6% de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1). Após a eletroforese (a 150 V, 1h30min) em tampão 0,25x de Tris-borato/EDTA (TBE), o gel é seco a vácuo (Gel Dryer Vacuum System – Fisher Biotech, Wembley, Austrália), exposto ao filme XAR-5 (Kodak – Rochester, NY, EUA) em um cassete, que fica por 48h a -70°C. Após esse período, o filme é revelado por imersão em solução reveladora (Kodak; 10 min) e fixadora (Kodak; 5 min) e os complexos de proteína-DNA podem ser visualizados e quantificados densitometricamente.

A especificidade da sonda utilizada foi testada em ensaio de competição, com a adição de concentrações crescentes do oligonucleotídeo não marcado radioativamente (oligo frio, fig. 5). Tanto o complexo C1 quanto o C2 de proteína-DNA gradualmente desaparecem conforme aumenta o excesso da sonda fria, indicando especificidade do complexo à sequência nucleotídica utilizada. O complexo C1 parece ser mais específico quanto a ligação à sonda do que C2, já que mesmo nas condições de excesso de oligo frio C2 ainda aparece ligado à sonda radioativa.

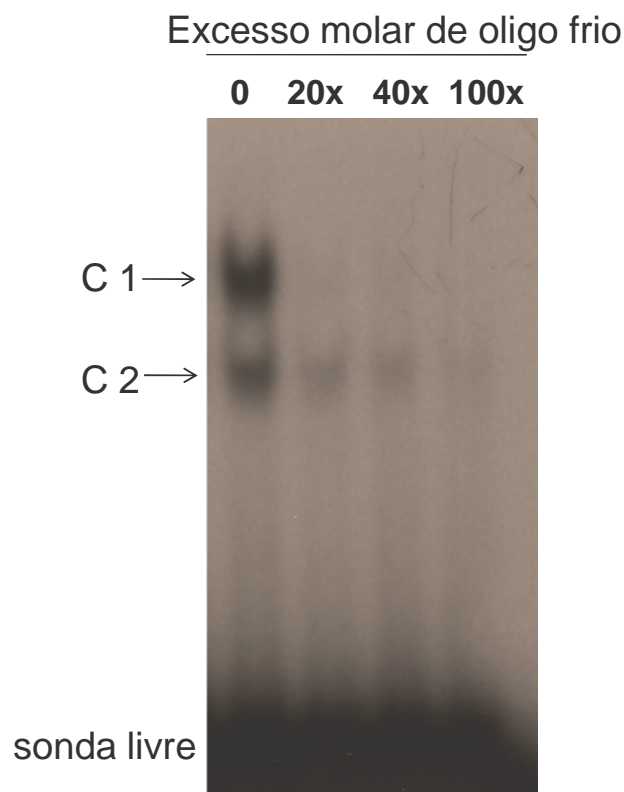


Figura 5 – Gel-shift de extratos protéicos nucleares de glândulas pineais na ausência (0) ou presença de excesso de oligonucleotídeo frio, ou seja, não-marcado radioativamente (excesso molar de 20x, 40x ou 100x com relação ao oligonucleotídeo radioativo). Sonda livre = oligonucleotídeo marcado que não formou complexos protéicos e, por isso, não teve sua mobilidade retardada no gel.

Para os ensaios de Super-Shift, o mesmo protocolo foi seguido, com a inclusão de uma etapa de incubação dos extratos protéicos com anticorpos específicos para as subunidades de NF κ B (2 μ g/ μ l, 2 μ l por amostra). Esta incubação foi de 20 min, à temperatura ambiente, antes da incubação com o tampão de ensaio, e as demais etapas seguiram sem alterações.

8. Dosagem de melatonina plasmática

O conteúdo de melatonina plasmática foi determinado a partir do sangue coletado dos animais no momento da decapitação, em tubos heparinizados. As dosagens foram realizadas pelo método de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) utilizando-se kits comerciais (Genway Biotech Inc, San Diego, CA, EUA). Este ensaio baseia-se na competição entre a melatonina das amostras e melatonina biotinizada pelo anticorpo específico presente na placa. A quantidade de melatonina biotinizada ligada ao anticorpo é determinada pela adição de um anticorpo anti-biotina acoplado a uma enzima fosfatase alcalina, cuja atividade forma um produto colorimétrico, detectado por espectrofotômetro a 405 nm (SpectraMax 250, Molecular Devices, CA, EUA). A quantidade de melatonina biotinizada presente (ou seja, a quantidade de produto da fosfatase formado) é inversamente proporcional à quantidade de melatonina presente nas amostras. A quantificação das amostras é realizada por interpolação dos valores em uma curva-padrão. O limite de detecção de kit é de 1,6 pg/mL.

9. Dosagem de corticosterona plasmática

O conteúdo de corticosterona presente no plasma dos animais foi dosado por radioimunoensaio (RIA) através de kit comercial (ImmuChem, MP Biomedicals, NY, EUA). Este ensaio baseia-se na competição entre a corticosterona das amostras e corticosterona marcada radioativamente (^{125}I) pelo anticorpo específico, de modo que quanto mais corticosterona na amostra, menor será sua dosagem radioativa. Os valores são obtidos pela interpolação da quantificação radioativa em uma curva-padrão. O limite de detecção do kit é de 7,7 ng/mL.

10. Análise dos resultados

Os resultados estão apresentados como média dos valores amostrais acompanhados dos respectivos erros padrão (e.p.m.). As médias foram obtidas a partir de, no mínimo, 3 (três) amostras em cada grupo experimental. A comparação entre duas médias foi feita pelo teste t de student, enquanto que a comparação entre mais de duas médias foi realizada por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. Os grupos foram considerados significativamente diferentes para probabilidades de erro menores que 5% ($p < 0,05$). Todas as análises foram feitas utilizando-se o programa de computador GraphPad Prism[®] versão 4.00 (GraphPad Software[®]).

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. Ativação constitutiva de NFkB na glândula pineal

Inicialmente, foram realizados ensaios de super-shift para a identificação das subunidades de NFkB presentes no núcleo dos pinealócitos, em glândulas recém retiradas de animais hígidos. A ativação constitutiva de NFkB foi investigada analisando-se o conteúdo de NFkB nuclear em glândulas pineais obtidas em diferentes horários ao longo do dia. Assim que retiradas, as glândulas foram imediatamente congeladas para posterior extração de proteína total e ensaio de gel-shift.

1.1. Identificação das subunidades de NFkB presentes

Os complexos observados no EMSA foram analisados na presença de anticorpos específicos para cada subunidade da família NFkB (Super-shift). Quando há a ligação do anticorpo à subunidade de NFkB, forma-se um complexo anticorpo-proteína-DNA, o que causa um retardo ainda maior na migração no gel. Como observado na figura 6, esse retardo maior foi obtido somente na presença do anticorpo para a subunidade p50. Pelo fato do NFkB atuar no núcleo sempre sob a forma de homo- ou heterodímeros, conclui-se que o complexo 1 refere-se a homodímeros de p50.

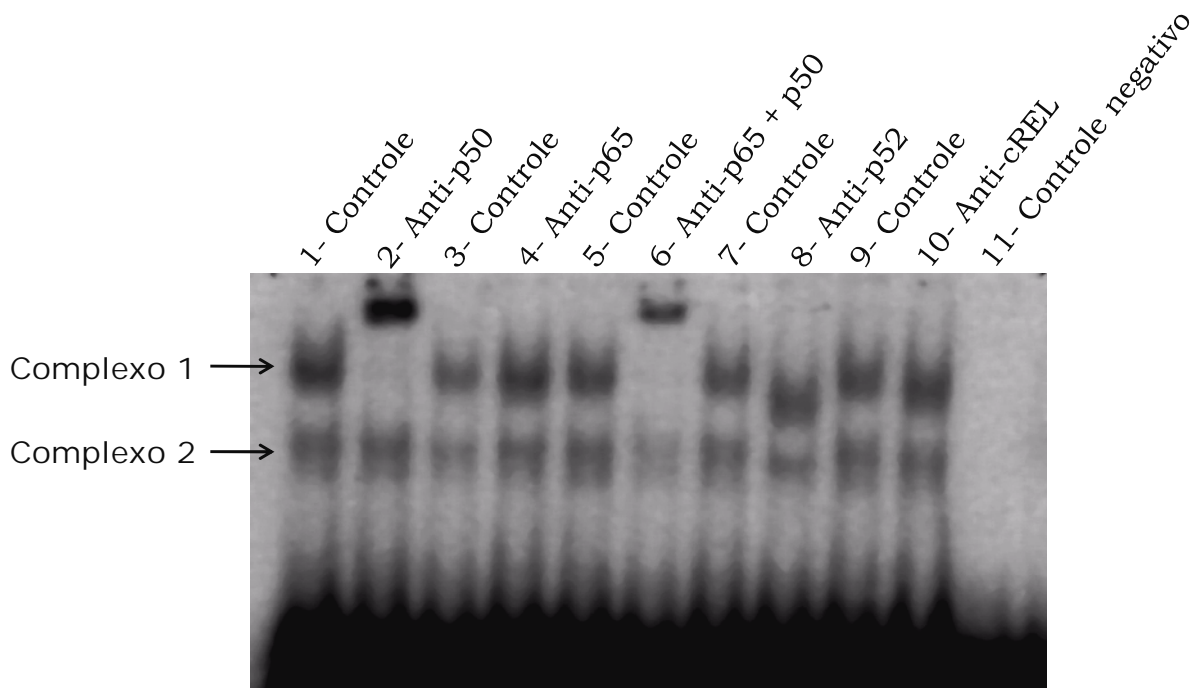


Figura 6 – Expressão das subunidades de NFkB nuclear em glândulas pineais, detectada por gel-shift na ausência (controles) ou na presença (Super-shift) de anticorpos específicos contra as subunidades que constituem a família do NFkB (p50 – linha 2 e 6; p65 – linha 4 e 6; p52 – linha 8; cRel – linha 10; controle negativo = ausência de extrato protéico).

Apesar de haver uma aparente modificação no padrão de corrida na presença de anticorpo para a subunidade p52 (fig.6 – linha 8), isso não se repetiu em ensaios posteriores, o que indica tratar-se de um artefato deste gel, especificamente. A ausência de um efeito nítido dos anticorpos sobre o complexo 2 em experimentos repetitivos levou-nos a considerá-lo como inespecífico.

Os resultados apresentados de agora em diante referem-se exclusivamente à análise do complexo 1, ou seja, dos níveis de p50:p50 encontrados no núcleo das glândulas pineais nas diferentes condições ou tratamentos.

1.2. Variação rítmica no conteúdo nuclear de NFKB

Foi previamente observada uma diferença significativa entre o conteúdo nuclear de NFKB de glândulas retiradas dos animais na fase de claro e de glândulas retiradas na fase de escuro. Para comprovar essa observação, foi realizada uma análise temporal da ativação constitutiva de NFKB.

A análise do conteúdo de NFKB nuclear presente em glândulas pineais retiradas a cada 3 horas ao longo do dia revelou a existência de um ritmo na translocação nuclear deste fator (fig. 7).

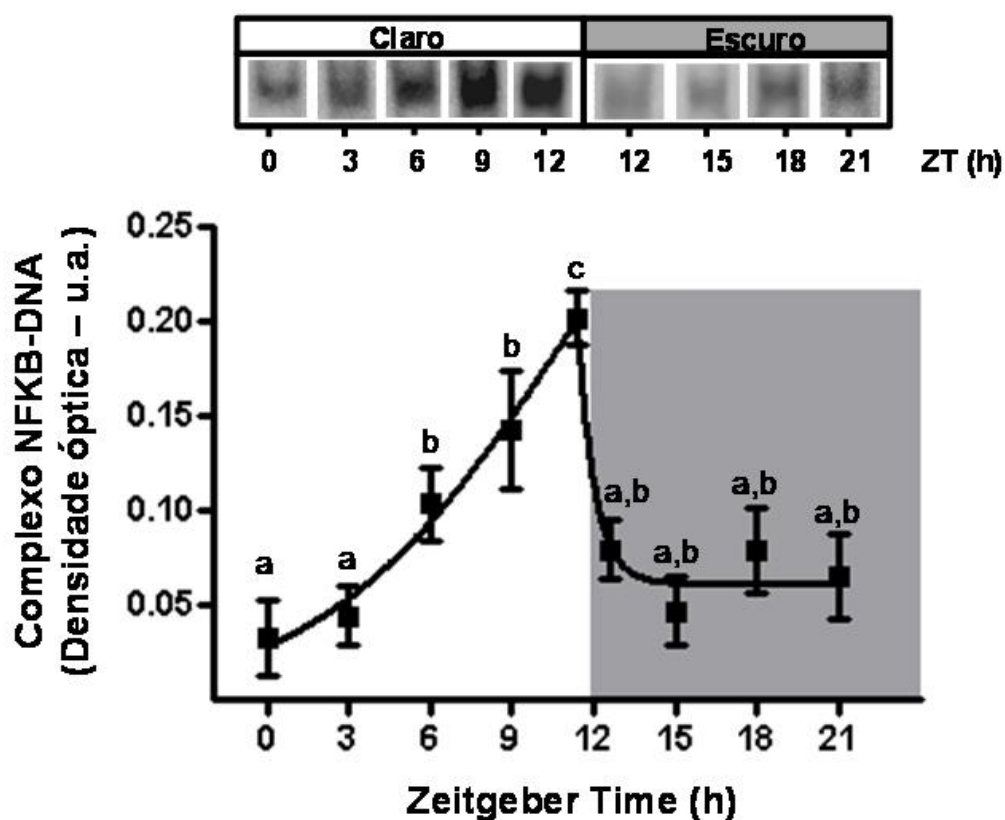


Figura 7 – Ritmo no conteúdo nuclear de NFKB de glândulas pineais, obtidas de ratos mantidos em ciclo claro/escuro 12h00/12h00 e sacrificados a cada três horas ao longo do dia. Acima do gráfico estão os complexos formados no EMSA, representativos de cada ponto da curva. O gráfico refere-se à média \pm e.p.m. de 4 a 12 glândulas por ponto (a b c; $p < 0,05$ por ANOVA, seguida de Newman-Keuls; u.a. = unidades arbitrárias).

Durante a fase de claro ambiental, os níveis de NFκB elevam-se de forma crescente até atingir o pico máximo, próximo de ZT 12. Assim que se inicia a fase de escuro, nos primeiros minutos de ZT 12, ocorre uma queda abrupta no conteúdo de NFκB nuclear. Os níveis de NFκB são mantidos relativamente baixos durante toda a fase de escuro, até que se reinicie um novo ciclo.

2. Regulação da ativação constitutiva de NFκB pelo ciclo claro/escuro

A observação de que há uma translocação ao núcleo diferencial de NFκB dependendo da fase do dia analisada levou à investigação de quais seriam os mecanismos atuantes no controle deste ritmo, em especial na fase de transição claro/escuro ambiental. Para isso, os primeiros experimentos realizados foram de manipulação da condição de luminosidade nas quais os animais são mantidos.

2.1. Efeito da transição claro/escuro sobre o ritmo de NFκB

Para testar a importância da transição claro/escuro na manutenção do ritmo de NFκB, foram utilizados animais mantidos em ciclo claro/escuro 12h/12h (apagar das luzes em ZT 12), porém, no dia experimental, alguns grupos permaneceram com as luzes acesas além do ZT 12, até o horário do sacrifício (ZT 12, ZT 15 ou ZT 18). Os grupos controles referem-se a animais mantidos em ciclo claro/escuro 12h/12h e sacrificados no ZT 12, tanto no fim da fase de claro quanto no início da fase de escuro (fig. 8).

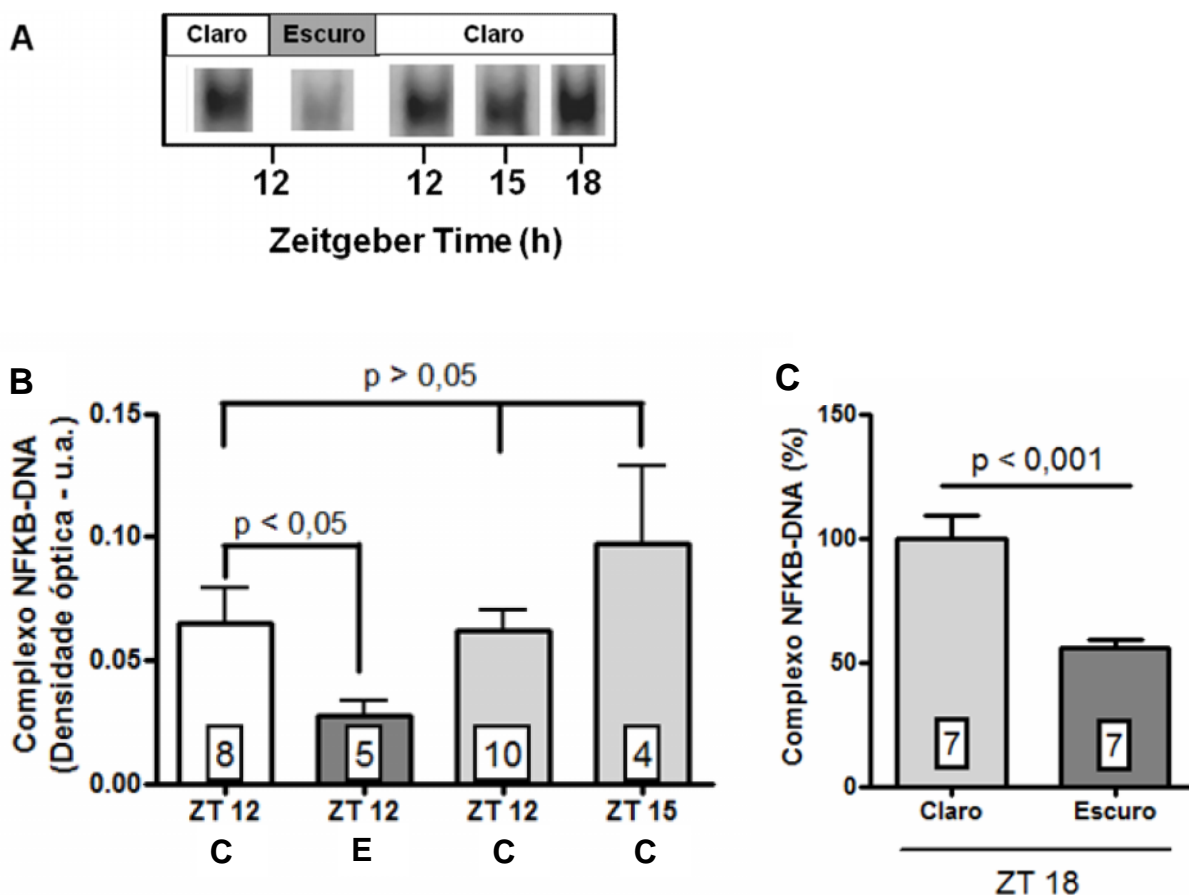


Figura 8 – A redução nos níveis de NFKB é dependente do início da fase de escuro. A) Gel-shift representativo de NFKB nuclear de glândulas retiradas no ZT 12, tanto na fase de claro quanto na de escuro, e em ZT 12, 15 e 18 de animais mantidos em claro no dia experimental. B) Quantificação densitométrica de A, com média \pm e.p.m. C) Comparação entre glândulas retiradas no ZT 18 de animais mantidos no claro no dia experimental (claro) e animais mantidos em claro/escuro 12h00/12h00 (escuro). Os números amostrais de cada grupo consta dentro das barras; u.a. = unidades arbitrárias. Análise estatística por ANOVA seguida de Newman-Keuls em B e por teste t de student em C.

Conforme esperado, a diferença no conteúdo nuclear de NFKB entre glândulas de ZT 12 retiradas no claro e no escuro foi mantida. Já nas glândulas provenientes dos animais que permaneceram com a luz acesa até ZT 12, ZT 15 ou ZT 18, a redução de NFKB nuclear não ocorreu (fig. 8A e 8B). Para certificar que a manutenção de altos níveis de NFKB nuclear nestes grupos era somente devido à manipulação da

informação fótica, e não devido a algum fator estressante no ambiente, um grupo de animais mantidos em ciclo claro/escuro 12h/12h foi sacrificado ao final do experimento no ZT 18, no escuro, e comprovou-se a diferença existente entre essas glândulas e as retiradas no mesmo ZT, porém no claro (fig. 8C).

2.2. NFkB em glândulas pineais de animais em livre-curso

O conteúdo de NFkB de glândulas pineais obtidas de animais mantidos em condição de escuro constante foi avaliado com o intuito de verificar se o ritmo na translocação de NFkB seria um legítimo ritmo circadiano (endógeno, controlado pelo relógio biológico) ou um efeito decorrente da sinalização da informação fótica ambiental que atinge a pineal. Em escuro constante o animal encontra-se em livre-curso, ou seja, seus ritmos endógenos são manifestados sem a sincronização aos ciclos ambientais, apresentando período levemente diferente de 24h. A determinação do horário circadiano de cada animal é feita analisando-se o período do seu ritmo de atividade/repouso (como detalhado em material e métodos). Sabendo a duração do dia subjetivo de cada animal, sabemos também a duração de cada hora subjetiva e podemos identificar em qual ponto do ritmo endógeno o animal está. O ponto de início dos cálculos é sempre o CT 12, que corresponde ao momento do início da fase de atividade de cada animal, já que se trata de roedores de hábito noturno.

A mesma análise temporal do NFkB nuclear apresentada na figura 7 foi realizada com esses animais, coletando as glândulas a cada 3 horas circadianas (fig. 9).

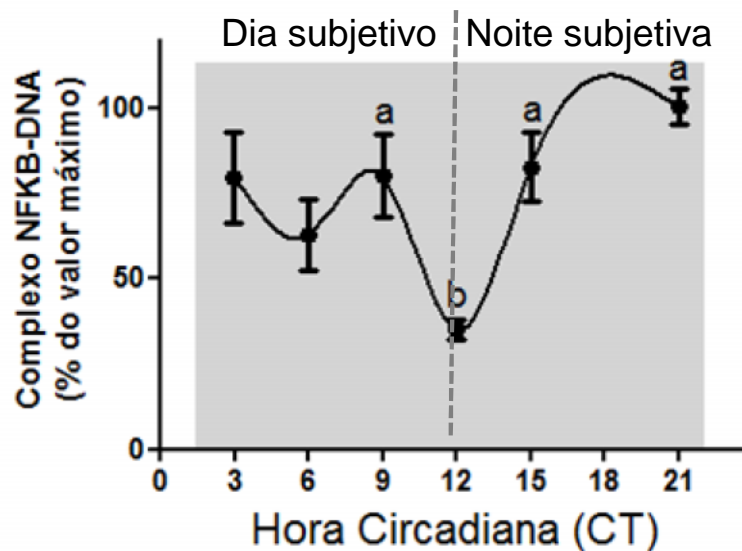


Figura 9 – Análise temporal do conteúdo nuclear de NFKB em glândulas pineais de animais mantidos em escuro constante. Valores representam média \pm e.p.m. de 3 a 6 glândulas por ponto; análise estatística por ANOVA seguida de Newman-Keuls (a b, $p < 0,05$).

Nesta condição de livre-curso, o ritmo de NFKB foi abolido, não havendo diferença estatística significativa entre os pontos. Entretanto, nota-se a persistência da queda no conteúdo nuclear de NFKB no CT 12, com valores significativamente diferentes dos CT 9, 15 e 21. Já a manutenção dos baixos níveis de NFKB durante toda a fase de escuro é prejudicada nesta condição de escuro constante, ao contrário do observado nos animais sincronizados. Com este dado, nota-se o papel essencial do ciclo claro/escuro para que ocorra o ritmo na translocação do NFKB.

Dessa forma, a etapa seguinte foi analisar o efeito sobre a translocação nuclear do NFKB exercido pelas vias aferentes relacionadas à sinalização da informação fótica que atingem a pineal.

3. Efeito da estimulação noradrenérgica sobre o ritmo de NFkB

A via aferente mais relevante à glândula pineal é a simpática, proveniente do gânglio cervical superior e responsável por sinalizar à glândula a presença da fase de escuro ambiental. Dessa forma, foi investigado se o principal neurotransmissor envolvido no controle da síntese de melatonina – a noradrenalina – seria também atuante sobre o ritmo de NFkB.

O evento necessário à indução da síntese de melatonina é a estimulação de receptores β -adrenérgicos. Para investigarmos se essa mesma cascata de sinalização da síntese de melatonina está envolvida com o ritmo de NFkB nuclear, foi administrado um antagonista de receptores β -adrenérgicos – propranolol a dois grupos de animais. Um desses grupos foi sacrificado na fase de claro (ZT 9) e o outro, no meio da fase de escuro (ZT 18), objetivando verificar se a diferença dia/noite de NFkB ainda persistia. (fig. 10). O gráfico mostra que a administração de propranolol resultou na perda da diferença dia/noite quanto ao conteúdo nuclear de NFkB, indicando a necessidade da ativação de β -adrenoceptores para a ocorrência dos baixos níveis de NFkB na fase de escuro.

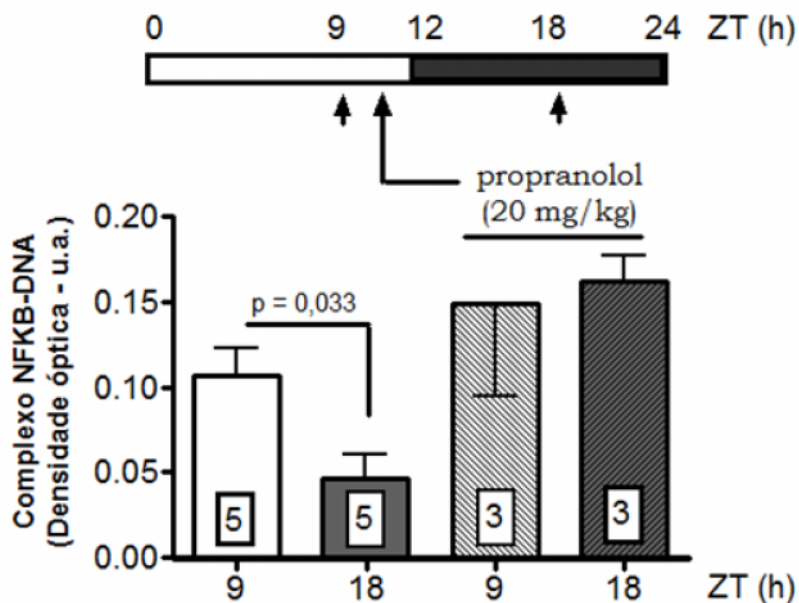


Figura 10 – Propranolol reverte os baixos níveis de NFKB encontrados no meio da fase de escuro. Conteúdo nuclear de NFKB em pineais de ratos sacrificados no ZT 9 ou ZT 18 (barras brancas e cinzas, respectivamente) na ausência ou presença (barras hachuradas) de propranolol (20 mg/kg, i.p.) administrado em dois dias consecutivos no ZT 11. Dados representam média \pm e.p.m. do número amostral dentro de cada barra; teste t de student.

Complementarmente, foi testada a hipótese de que a sinalização simpática do início da fase de escuro também seria responsável pela queda abrupta de NFKB que ocorre logo nos primeiros minutos de escuro. Esta hipótese foi testada através de experimentos realizados tanto in vitro quanto in vivo. Glândulas pineais retiradas de animais sacrificados ao final da fase de claro foram imediatamente colocadas em cultura e estimuladas com noradrenalina (100 nM) por curto período de tempo, objetivando avaliar os efeitos imediatos desse neurotransmissor sobre a translocação nuclear de NFKB (fig. 11).

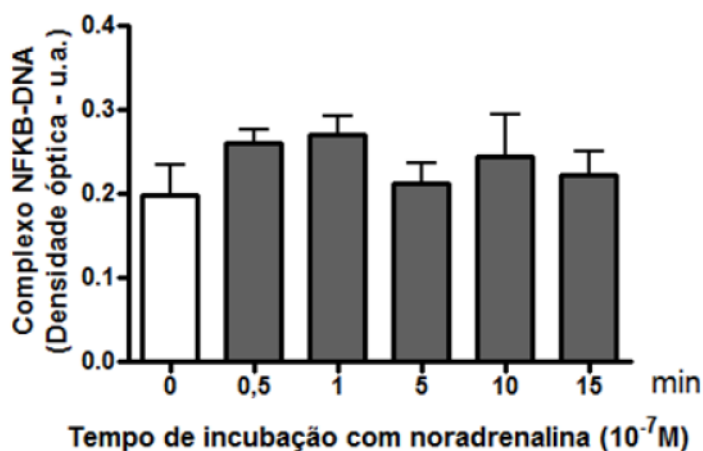


Figura 11 – Conteúdo de NFKB nuclear em glândulas estimuladas com noradrenalina. Glândulas pineais em cultura foram incubadas de 30 segundos a 15 minutos com noradrenalina (100 nM, barras cinzas). Conteúdo de NFKB analisado por gel-shift (u.a. = unidades arbitrárias). Valores representam média \pm e.p.m. de 6 glândulas por grupo.

Conforme observado, em nenhum dos tempos testados houve alteração no conteúdo basal de NFKB. Para a confirmação deste dado foram realizados experimentos in vivo, nos quais os animais foram tratados com propranolol e sacrificados logo no início da fase de escuro, em ZT 12 (fig. 12).

Em contraposição ao primeiro experimento in vivo, propranolol não foi efetivo em reverter os baixos níveis de NFKB no início da fase de escuro. O conteúdo nuclear de NFKB dos animais tratados e sacrificados imediatamente após o apagar das luzes foi igual ao dos animais que receberam salina, e ambos foram significativamente diferentes do grupo salina sacrificado na fase de claro. Portanto, a queda abrupta deste fator no ZT 12 continua ocorrendo mesmo com o bloqueio dos receptores β -adrenérgicos.

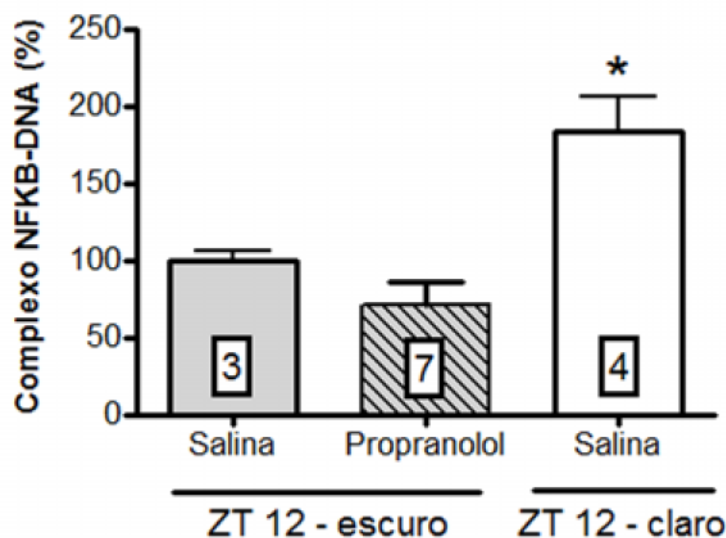


Figura 12 – Propranolol não reverte os baixos níveis de NFKB na transição claro/escuro (ZT 12). Conteúdo nuclear de NFKB de glândulas retiradas de animais sacrificados em ZT 12 imediatamente antes (barra branca) ou depois (barras cinzas) do apagar das luzes, na ausência ou presença (barra hachurada) do tratamento prévio com propranolol (20 mg/kg, i.p.). Valores representam média \pm e.p.m. do número amostral dentro das barras; * $p < 0,001$, ANOVA seguida de Newman-Keuls.

A estimulação simpática é de fato a mais relevante para a sincronização da glândula pineal à informação fótica ambiental. Entretanto, a ação desta sinalização sobre o ritmo de NFKB pode se dar através de outros mecanismos, que não a ativação β -adrenérgica. A noradrelina também ativa receptores do tipo α -adrenérgicos e, além disso, os terminais simpáticos que a liberam também contêm o neuromodulador ATP. Dessa forma, essas vias de sinalização também foram investigadas, tratando-se os animais com antagonistas específicos. Além do propranolol, foram utilizados prazosin (antagonista de receptor α -adrenérgico) e suramina (antagonista de receptor P2 purinérgico), todos diluídos em salina e administrados uma hora antes do apagar das luzes (ZT 11). Os animais tratados foram sacrificados no início da fase de escuro, em ZT

12, e os grupos controles (veículo) foram sacrificados tanto no final da fase de claro quanto no início da fase de escuro, em ZT 12 (fig. 13).

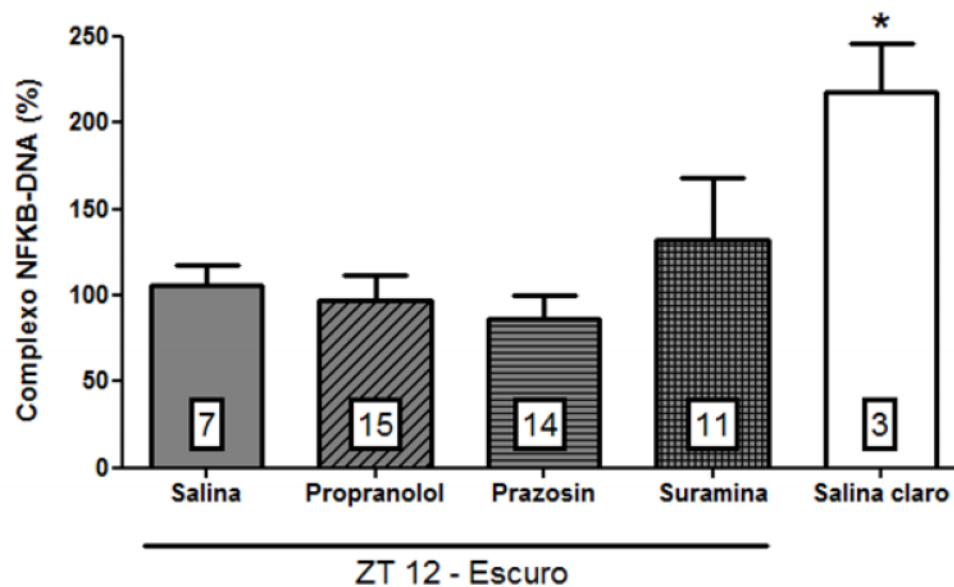


Figura 13 – Efeito dos antagonistas sobre a translocação nuclear de NFKB. Conteúdo nuclear de NFKB de glândulas pineais retiradas de animais tratados e sacrificados no ZT 12 no escuro, imediatamente após o apagar das luzes (barras cinzas hachuradas). Grupos controle receberam salina (barras lisas) e foram sacrificados tanto no escuro (barra cinza) quanto no claro (barra branca). Valores representam média \pm e.p.m. do número de glândulas mostrado dentro de cada barra. Análise estatística pelo teste t de student, comparando-se cada grupo ao grupo salina escuro; * $p < 0,005$.

Observa-se, portanto, que nenhum antagonista foi efetivo em reverter a redução de NFKB nuclear que ocorre na transição da fase de claro para a de escuro, não diferindo estatisticamente dos níveis encontrados no grupo salina escuro.

Assim, os dados em conjunto indicam que a estimulação simpática não é a responsável pela queda imediata dos níveis de NFKB quando inicia-se a fase de escuro ambiental, porém, a ativação dos receptores β -adrenérgicos é importante para que os níveis deste fator mantenham-se baixos nas demais horas de escuro.

Na glândula pineal, a principal consequência da ativação noradrenérgica é a indução da síntese de melatonina. Portanto, o bloqueio de tais receptores resulta também no bloqueio da produção hormonal da pineal. Pelo fato de o propranolol ter sido efetivo em reverter os baixos níveis de NFkB somente no ZT 18, momento em que já haveria grandes quantidades de melatonina produzida, a etapa seguinte foi verificar se a manutenção dos níveis baixos de NFkB na fase de escuro seria dependente da síntese de melatonina. Essa hipótese foi subsidiada por dados da literatura que relatam um efeito inibitório da melatonina sobre a translocação nuclear de NFkB em outros tecidos (Gilad et al., 1998; Tamura et al., 2009).

4. Controle hormonal da translocação nuclear de NFkB

4.1. Ação autócrina de melatonina

Glândulas pineais retiradas de animais sacrificados no final da fase de claro foram colocadas em cultura e incubadas com melatonina, em concentração compatível à observada dentro da própria glândula pineal no horário de seu pico noturno (Fernandes et al., 2009). Após 3 horas de incubação, as glândulas foram processadas para análise do conteúdo nuclear de NFkB por EMSA.

As glândulas tratadas com melatonina apresentaram níveis de NFkB nuclear significativamente menores do que as glândulas tratadas somente com veículo (fig. 14).

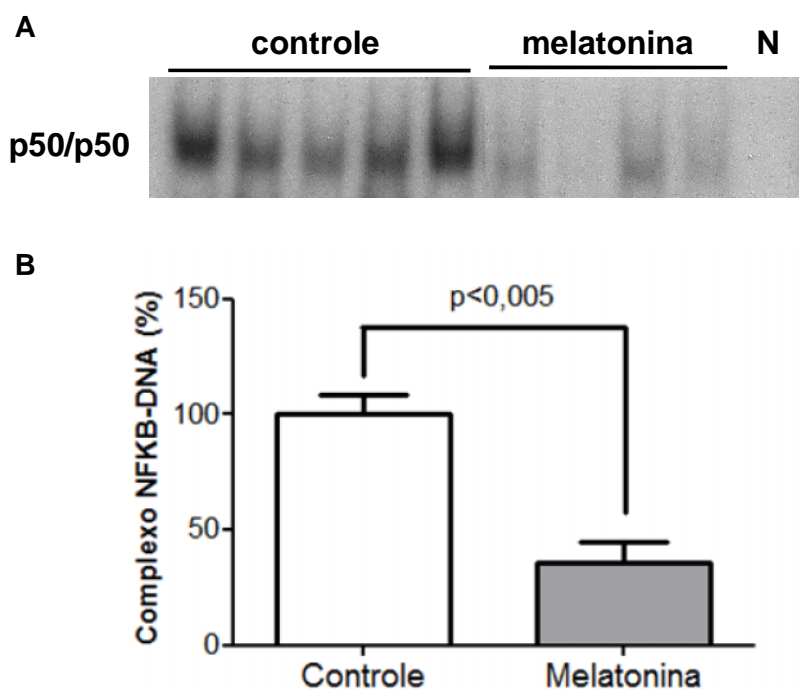


Figura 14 – Melatonina inibe a translocação nuclear de NFKB. Conteúdo de NFKB nuclear de glândulas pineais de ratos em cultura incubadas com melatonina (1 mM, 3h). A) Gel-shift representativo de NFKB de glândulas estimuladas ou não com melatonina; N = controle negativo (ausência de extrato protéico). B) Quantificação densitométrica de A. Dados representam a média \pm e.p.m. de 4 a 5 glândulas por grupo, comparadas por teste t de student.

Este dado corrobora a hipótese de que a própria melatonina produzida pela pineal é responsável por inibir a translocação de NFKB ao núcleo, mantendo seus níveis baixos durante toda a fase de escuro.

Em contrapartida, este resultado não explica a ausência do ritmo de NFKB observada nos animais em livre-curso (fig. 9), pois o ritmo endógeno de produção de melatonina deles não deveria ser alterado pela condição de escuro constante. Essa premissa foi confirmada pela dosagem do conteúdo de melatonina presente no plasma dos animais em livre-curso (fig. 15).

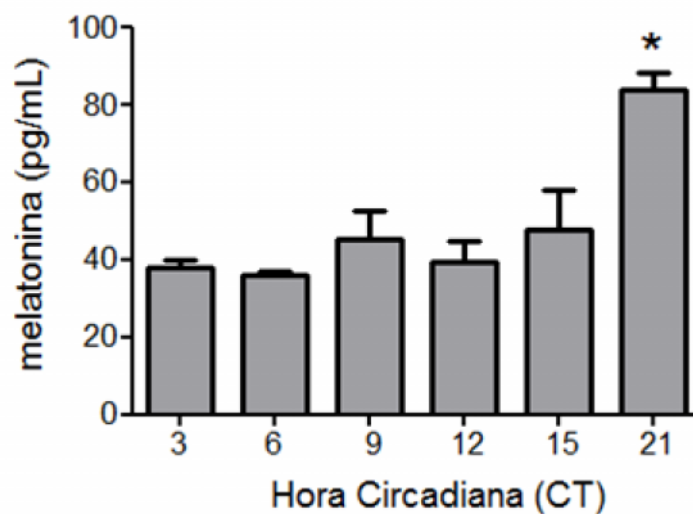


Figura 15 – Ritmo de produção de melatonina em animais em livre-curso. O conteúdo de melatonina foi dosado no plasma de animais mantidos em escuro constante. Valores representam média \pm e.p.m. de 3 a 6 animais por ponto. * $p < 0,05$; ANOVA seguida de teste de Newman-Keuls.

Conforme o esperado, os animais mantidos em escuro constante expressam o ritmo endógeno de produção de melatonina, apresentando concentrações plasmáticas significativamente maiores em CT 21, o que corresponde ao meio da fase de escuro subjetiva. Porém, ao compararmos os valores de melatonina obtidos nestes animais e em animais sincronizados ao ciclo claro/escuro ambiental (12h/12h), observa-se que o ritmo de produção de melatonina nos animais em livre-curso apresenta uma amplitude menor do que nos sincronizados (fig. 16).

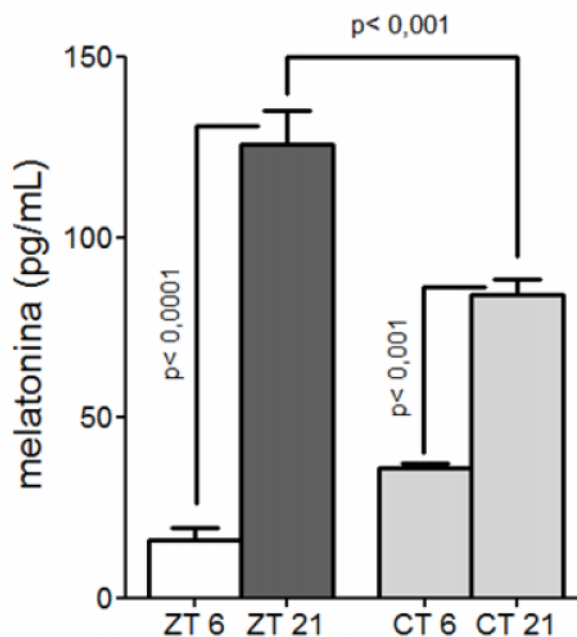


Figura 16 – O pico na produção rítmica de melatonina é menor em animais em livre-curso. Comparação dos níveis plasmáticos de melatonina nas fases de dia (ZT 6) e noite (ZT 21) em animais mantidos em ciclo claro/escuro 12h/12h e em animais mantidos em escuro constante (CT 6 e CT 21). Valores representam média \pm e.p.m. de 3 a 6 animais por ponto. Diferenças entre os grupos foram detectadas por ANOVA seguida de teste de Newman-Keuls.

Assim, apesar de o ritmo da síntese de melatonina persistir em livre-curso, ele encontra-se diminuído quanto à amplitude com relação aos animais sincronizados. Essa defasagem na produção de melatonina justifica então o fato de, nestes animais, os níveis de NF κ B não manterem-se baixos durante toda a noite (fig. 9).

A elucidação do mecanismo pelo qual são encontrados baixos níveis de NF κ B na fase de escuro ambiental não explicava, porém, a redução imediata que ocorre logo nos primeiros minutos de escuro. O mecanismo regulador de NF κ B nessa transição claro/escuro está relacionado com a informação fótica, e está presente tanto nos animais sincronizados quanto nos animais mantidos em escuro constante, nos quais também foi observada a queda no CT 12. Um dos fenômenos comum entre esses animais é a

entrada na fase de atividade, o que ocorre justamente no início da fase de escuro por serem animais noturnos.

Em roedores, a corticosterona é o principal hormônio relacionado à preparação do organismo para a entrada em atividade. De fato, seu ritmo endógeno é dependente do hábito de vida da espécie. Animais de hábito noturno, como os ratos, apresentam pico plasmático de corticosterona no início da fase de escuro (Kalsbeek et al., 1996), enquanto que nos animais de hábito diurno, como macacos e humanos, o pico hormonal de glicocorticóides ocorre no início da fase de claro (Lemos et al., 2006). A etapa seguinte foi avaliar se o ritmo endógeno de corticosterona está relacionado ao ritmo de translocação nuclear de NFκB.

4.2. Correlação entre o ritmo endógeno de corticosterona e o de NFκB

A dosagem de corticosterona no plasma dos animais mantidos em escuro constante demonstrou a manutenção do ritmo de secreção deste hormônio, com pico em CT 12, isto é, na transição repouso/atividade (fig. 17). Além disso, pode ser observado que o conteúdo plasmático de corticosterona decai a um patamar acima dos níveis basais durante a manutenção da fase de atividade e que a entrada na fase de repouso implica em uma queda abrupta a concentrações abaixo das detectadas pelo método de dosagem. Desta forma, foi considerado que em CT3 a concentração plasmática de corticosterona era zero.

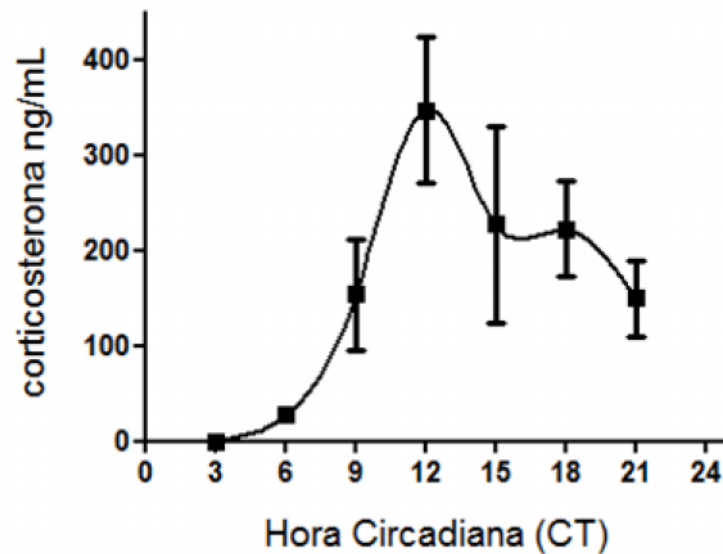


Figura 17 – Ritmo endógeno de corticosterona, dosada no plasma de animais em livre-curso. Valores representam média \pm e.p.m. de 3 a 6 animais por CT.

Sobrepondo-se a curva do ritmo de corticosterona ao gráfico do conteúdo de NFkB nuclear destes mesmos animais, podemos observar uma alta correlação no ponto de CT 12 (fig. 18). O início da fase de atividade de cada animal, registrado em actogramas, corresponde ao momento exato em que os níveis de corticosterona atingem seu máximo. Simultaneamente, os altos níveis de corticosterona plasmática correlacionam-se ao momento em que os níveis de NFkB são imediatamente reduzidos no núcleo das células da pineal, sugerindo uma conexão entre essas vias, conforme discutido mais adiante.

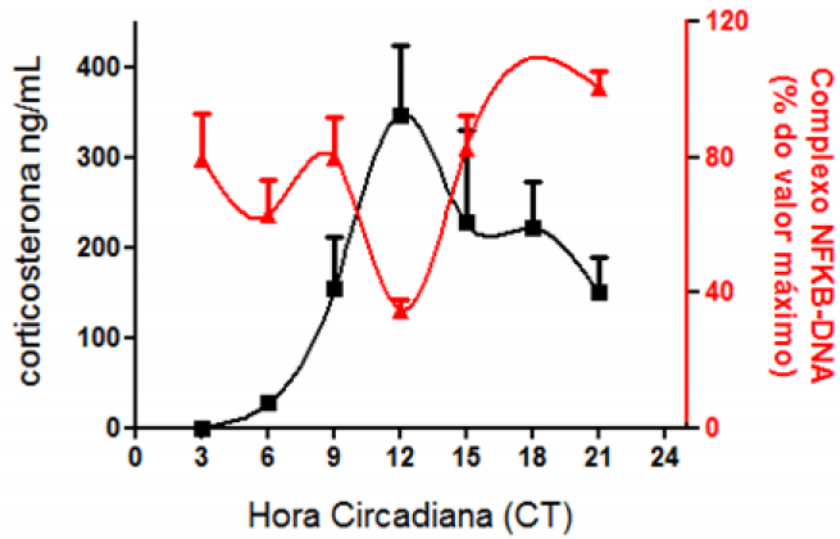


Figura 18 – Correlação entre os ritmos de corticosterona e NFKB. Ritmos de corticosterona plasmática (em preto) e de NFKB nuclear de glândulas pineais (em vermelho) de animais mantidos em escuro constante. Valores representam média \pm e.p.m. de 3 a 6 glândulas ou plasma por ponto.

DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

O fator de transcrição NFκB constitui uma das vias de sinalização intracelular de relevância inestimável ao organismo. Inicialmente descrito como peça fundamental ao desenvolvimento de uma resposta imune adequada, este fator vem paulatinamente ganhando espaço nos mais diversos mecanismos fisiológicos, garantindo um bom funcionamento celular. Um dos exemplos mais relevantes da crescente atenção dada a este fator refere-se aos estudos de sua ação em células neuronais. Seus efeitos antagônicos, mediando tanto neuroproteção quanto neurodegeneração, desafiam os estudiosos a compreender as diferentes facetas desta via de sinalização.

Ainda com relação às células neuronais, a importância do ajuste fino dos níveis nucleares constitutivos de NFκB já é bem descrita e bem aceita (Mattson e Camandola, 2001; Tergaonkar, 2006; Sun e Zhang, 2007). Similarmente, o conjunto de evidências dentro do qual consta a presente dissertação também aponta para a ocorrência desse fenômeno nas células neuro-endócrinas que compõem a glândula pineal. Glândulas em condições fisiológicas apresentam uma ativação basal de NFκB, conforme observado nos grupos controle (Ferreira et al., 2005). Por outro lado, alterações no conteúdo nuclear de NFκB, seja por estímulo extracelular ou por inibição da via, acarretam em modulação da atividade biossintética da glândula pineal, para mais ou para menos (Ferreira et al., 2005; Fernandes et al., 2006). Dessa forma, a funcionalidade fisiológica da glândula requer mecanismos rígidos de controle da ação nuclear de NFκB devido a sua grande capacidade modulatória.

A presente dissertação demonstrou que a ativação constitutiva de NF κ B é finamente controlada em glândulas pineais de rato e apresenta uma variação rítmica ao longo das 24 horas do dia.

1. Ativação constitutiva de p50:p50

A subunidade de NF κ B detectada nas pineais em condições fisiológicas corresponde à p50, subunidade tida como repressora da transcrição gênica (Hayden e Ghosh, 2008). Isso foi comprovado também na glândula pineal, pois a inibição do NF κ B basal por agentes específicos como o PDTC e ALLN promove um efeito potencializador sobre a síntese de melatonina (Ferreira et al., 2005), indicando um papel funcional do homodímero de p50 em limitar a atividade biossintética da pineal em condições fisiológicas.

Como já mencionado, esta é uma subunidade amplamente distribuída entre os diversos tipos celulares, sendo inclusive o dímero mais encontrado ligado ao DNA em células em condições fisiológicas (Hou et al., 2003). Os homodímeros de p50 podem ser formados constantemente através do processamento de p105 pelo proteassoma 20S, por mecanismo independente de ubiquitinação (Moorthy et al., 2006). Já na vigência de um estímulo celular, a formação de p50:p50 é dependente da formação prévia de p105:p50 e posterior processamento de p105 pelo proteassoma 26S, mediante sinalização (Pereira e Oakley, 2008).

O mecanismo pelo qual o homodímero de p50:p50 regula negativamente a transcrição gênica ainda é objeto de estudo nesta área. Uma das possibilidades já

demonstrada é através do recrutamento de complexos de correpressores, contendo enzimas deacetilases de histonas (HDAC) (Zhong et al., 2002). A desacetilação das histonas por essas enzimas gera um aumento na carga positiva destas proteínas, o que aumenta sua afinidade de ligação ao DNA, compactando-o e impedindo a transcrição gênica. A interação entre p50:p50 e HDAC é dependente de fosforilação de p50 em determinados sítios, sendo que essa fosforilação ocorre de maneira constitutiva (Guan et al., 2005), o que justifica a predominância de homodímeros de p50 associados à HDAC no núcleo de células não-estimuladas (Zhong et al., 2002).

A predominância diferencial quanto às subunidades de NF κ B presentes em situações fisiológicas e em situações de ativação celular também foi observada na glândula pineal. A estimulação da glândula com LPS (Cruz-Machado et al., 2009) ou TNF (dados não publicados) induz a translocação nuclear de p50:RelA, além de p50:p50. Nestas condições, o favorecimento do dímero p50:RelA pode ser explicado pela necessidade de induzir a transcrição de pacotes gênicos relacionados ou à proteção celular ou à geração de uma resposta imune no local, tal como observado nos neurônios. Entretanto, a ação de NF κ B sobre a síntese de melatonina pela pineal também é inibitória neste caso, tal como na condição fisiológica. Isso pode ser explicado pelo fato de LPS também induzir aumento no conteúdo nuclear de p50:p50 (Cruz-Machado et al., 2009), provavelmente via processamento de p105:p50, reforçando a inibição transcricional basal. Outra possibilidade é uma atuação repressora do dímero p50:RelA em determinados genes-alvos, o que é possível já que esse dímero também é capaz de se ligar à HDAC em certas condições (Ashburner et al., 2001).

O caráter inibitório de p50:p50 e a existência de mecanismos distintos para sua ativação constitutiva e sua ativação induzida, conferem um importante papel deste homodímero na regulação da taxa de transcrição basal e de genes induzidos. Essa importância pode ser exemplificada pelos casos de tolerância ao LPS nas células B, em que a ativação da via clássica de NFκB induz um aumento no conteúdo nuclear de p50:p50, cuja ação repressora impede a reativação da via clássica. Esse tipo de indução de p50:p50 também está relacionado à fase de resolução da inflamação em modelos de inflamação renal por indução de nefrite pelo LPS (Ziegler-Heitbrock, 2001; Panzer et al., 2009). De fato, um dos mecanismos pelo qual a citocina IL-10 exerce seu efeito anti-inflamatório é pela inibição dos genes transcritos por NFκB (p50:RelA), o que é obtido através do aumento de p50:p50, como demonstrado em células mononucleares humanas (Driessler et al., 2004).

Interessantemente, além da ativação constitutiva de NFκB nas glândulas pineais de animais hípidos, também foi observada que essa ativação constitutiva é diferencial ao longo do dia. A análise temporal do conteúdo nuclear de p50:p50 demonstrou a existência de um ritmo diário na translocação nuclear deste fator. Na fase de claro ambiental há um crescente acúmulo de NFκB no núcleo celular, atingindo seu auge minutos antes do apagar das luzes. Assim que se inicia o escuro, há uma redução drástica nos níveis de NFκB nuclear logo nos primeiros minutos desta fase, e esses valores baixos são mantidos durante toda a noite.

A glândula pineal consiste num importante órgão fototransdutor, mesmo tendo perdido sua capacidade de fotorrecepção observada em alguns grupos de vertebrados, como nos pássaros e répteis (revisto por Falcón et al., 2009). Os mecanismos

moleculares responsáveis pela produção rítmica de melatonina são bem descritos e parece não restar lacunas a serem preenchidas nesse cenário. No caso dos roedores, o ritmo de melatonina está condicionado à expressão gênica rítmica da enzima AA-NAT, dependente da ação também rítmica do fator de transcrição CREB (revisto por Simonneaux e Ribelayga, 2003). Conforme apresentado na introdução, outros fatores de transcrição também atuam ritmicamente na pineal, mas nenhum demonstrou ser tão relevante quanto o CREB. A detecção de que o fator de transcrição NFkB apresenta-se ativado de forma rítmica e constitutiva na pineal suscitou um grande interesse na compreensão deste fato, ainda mais por se tratar de um fator comprovadamente eficaz em modular a atividade biossintética da glândula pineal.

2. Mecanismos regulatórios do ritmo de NFkB

Após a detecção da ritmicidade na translocação nuclear constitutiva de NFkB, uma série de experimentos foi realizada com o objetivo de compreender a geração deste padrão rítmico. Primeiramente foi observado que a informação fótica está altamente correlacionada ao ritmo de NFkB nuclear. Isso porque a queda brusca que ocorre nos níveis de NFkB nuclear logo que se inicia o escuro é dependente do início dessa fase do ciclo claro/escuro ambiental. Quando as luzes permanecem acesas além das 12h de claro, os níveis de NFkB permanecem elevados.

Uma vez detectada essa dependência do ritmo de NFkB com relação à sinalização da fase de escuro, a hipótese mais plausível era a de que a mesma sinalização que induz a síntese de melatonina estaria também induzindo a alteração na

translocação nuclear de NFkB. A informação de escuro ambiental é sinalizada à glândula pineal pelo grande aumento na transmissão simpática. Esses terminais simpáticos liberam noradrenalina e ATP (Wolfe et al., 1962; Mortani-Barbosa et al., 2000), sendo que a ativação de receptores β -adrenérgicos é essencial à síntese de melatonina, enquanto que a ativação de receptores α -adrenérgicos ou P2Y₁ purinérgicos exerce efeito modulatório positivo. Entretanto, tanto experimentos in vitro quanto in vivo refutaram a hipótese de que a sinalização simpática regularia o ritmo de NFkB no início da fase de escuro ambiental.

A incubação de glândulas pineais com noradrenalina não resultou em alteração nos níveis de NFkB nuclear. Complementarmente, a administração de bloqueadores de receptores adrenérgicos (α e β) e purinérgicos (P2) não impediu que os níveis de NFkB fossem reduzidos no início da fase de escuro, indicando que a ativação destes receptores pela inervação simpática não está relacionada ao ritmo de NFkB.

O efeito noradrenérgico sobre a via NFkB é um assunto bastante controverso na literatura. Em células gliais, a ativação de receptores β -adrenérgicos é tida como inibitória sobre a via NFkB, induzindo a localização nuclear de I κ B e a rápida exportação de NFkB ao citoplasma (Gavrilyuk et al., 2002). Já em células mononucleares e hepáticas, foi descrito que a ativação de receptores β e α -adrenérgicos por noradrenalina ativa a via NFkB e a transcrição de genes inflamatórios por ele regulados (Bierhaus et al., 2003; Sancho-Bru et al., 2006). Esses relatos contraditórios e a ausência de efeito noradrenérgico observada na pineal indicam que a noradrenalina atua sobre a via NFkB de acordo com o tipo celular e o estímulo recebido.

2.1. Melatonina e NFkB

Ainda com relação aos ensaios com antagonistas de receptores adrenérgicos, foi observado que o propranolol atua sobre NFkB em glândulas retiradas no meio da fase de escuro (ZT 18). Apesar deste antagonista não ter sido eficaz em impedir a queda nos níveis nucleares de NFkB nos primeiros minutos da fase de escuro, ele impediu a manutenção desses baixos níveis ao longo da noite. Glândulas retiradas de animais tratados com propranolol e sacrificados e ZT 18 apresentaram o mesmo conteúdo nuclear de NFkB que as glândulas de animais sacrificados no claro (ZT 9). Sabendo que o bloqueio de receptores β -adrenérgicos na pineal tem como principal consequência o bloqueio da síntese de melatonina, a hipótese formulada foi a de que a própria melatonina sintetizada pela pineal estaria contribuindo para a manutenção dos baixos níveis de NFkB durante a fase de escuro.

A capacidade da melatonina em inibir a translocação nuclear de NFkB foi confirmada em glândulas em cultura, incubadas com o hormônio em concentrações compatíveis às encontradas dentro da própria pineal, detectadas pela técnica de microdiálise (Fernandes et al., 2009). Esse resultado está de acordo com os relatos da literatura, pois diversos estudos comprovaram esta capacidade da melatonina ao investigar os efeitos imunomodulatórios deste hormônio. Dentre os diversos tipos celulares nos quais essa inibição já foi descrita, constam as células da linhagem HeLa, neurônios, macrófagos, células endoteliais e células dos tecidos pulmonar e hepático (Mohan et al., 1995; Lezoualc'h et al., 1998; Gilad et al., 1998; Beni et al., 2004; Wang et al., 2004; Bruck et al., 2004; Tamura et al., 2009). Assim como na pineal, foi

demonstrado que o conteúdo nuclear de NFkB nas células do baço apresenta-se diminuído na fase de escuro ambiental e esta diminuição é causada pela melatonina endógena circulante (Chuang et al., 1996). Na ausência de melatonina endógena, como no caso dos animais tratados com propranolol, os níveis de NFkB encontrados no núcleo dos pinealócitos no ZT 18 são tão altos quanto os valores encontrados durante o dia.

Da mesma forma, uma defazagem na produção de melatonina pode acarretar em níveis altos de NFkB em toda a fase de escuro, conforme observado nos animais em livre-curso. A diferença entre os níveis de melatonina produzidos por animais sincronizados e animais em livre-curso já foi anteriormente relatada (Fukuhara et al., 2005; Aguzzi et al., 2006). Estes trabalhos indicam que a redução da razão dia/noite em relação ao conteúdo plasmático de melatonina é consequência de um efeito da luz vermelha utilizada nos experimentos com animais em escuro constante. Mesmo de baixa intensidade, essa luz consegue alterar a ritmicidade de algumas subpopulações de neurônios dos NSQ, dessincronizando o ritmo de melatonina de outros ritmos endógenos, como o de atividade/repouso ou o de temperatura corpórea, que se manifestam adequadamente em livre-curso. Com isso, são produzidas menores quantidades de melatonina durante a noite subjetiva, e há um aumento na melatonina produzida durante o dia subjetivo, o que reduz a amplitude desse ritmo hormonal. Tais relatos vão ao encontro de nossas observações, indicando a necessidade de precaução ao utilizar a condição de escuro constante como ferramenta para avaliar ritmicidades biológicas.

O mecanismo pelo qual a melatonina inibe a translocação nuclear de NFkB ainda não está totalmente elucidado. Uma das possibilidades mais aceitas é a de que os efeitos antioxidantes da melatonina estariam relacionados com essa inibição. A via NFkB é sensível ao estado redox da célula, sendo sabidamente ativada por estresse oxidativo. Nestas condições, melatonina demonstrou ser efetiva em reduzir o estresse oxidativo em células do músculo esquelético e a via do NFkB foi inibida ao nível de IKB α , que teve sua degradação diminuída na presença do hormônio (Alonso et al., 2006). Entretanto, a grande capacidade da melatonina de interagir com diversas moléculas intracelulares também deve ser considerada na busca por estes mecanismos. Os receptores ROR, por exemplo, são passíveis de ligação à melatonina e também exercem efeito inibitório sobre NFkB, aumentando os níveis de IKB α (Delerive et al., 2001).

Por fim, a presente dissertação sugere ainda a existência de um mecanismo autócrino pelo qual a melatonina controla o conteúdo nuclear de NFkB na própria glândula pineal. A possibilidade desta ação autócrina já havia sido reportada há muitos anos por um estudo que registrou respostas elétricas excitatórias em glândulas pineais incubadas com melatonina (Semm et al., 1981). Dessa forma, o presente estudo corrobora o conceito de que a melatonina exerce ações autócrinas na manutenção das condições fisiológicas da glândula pineal.

2.2. Corticosterona e NFkB

De modo geral, os dados obtidos com os animais em livre-curso foram de grande valia à compreensão dos mecanismos envolvidos no controle do ritmo de NFkB na pineal. Os experimentos com propranolol permitiram a detecção da melatonina como o agente capaz de manter os baixos níveis de NFkB nuclear ao longo de toda a fase de escuro, porém, não explicaram o mecanismo indutor da queda inicial de NFkB logo nos primeiros minutos de escuro. A manutenção de animais na condição de escuro constante foi a metodologia utilizada para complementar o estudo da importância da transição claro/escuro ao ritmo de NFkB, investigando a endogenicidade deste ritmo.

Inicialmente, observamos que esses animais não apresentavam mais o ritmo diário de NFkB, apresentando níveis constantemente elevados durante todo o período de 24 horas. Entretanto, a queda abrupta nos níveis nucleares deste fator no início da fase de escuro subjetiva continuou ocorrendo. Com este dado, nossa atenção voltou-se para a identificação dos fenômenos que acontecem em comum entre animais mantidos em ciclo claro/escuro e animais em escuro constante. Embora a ativação simpática seja um ritmo endógeno, ou seja, continua a ocorrer de forma rítmica mesmo na ausência da informação fótica ambiental, a hipótese de que a noradrenalina ou o ATP seriam os agentes indutores desta queda foi refutada pelos experimentos com antagonistas específicos de cada receptor.

Outro fenômeno compartilhado pelos dois grupos de animais (sincronizados e não-sincronizados) refere-se ao início da fase de atividade do ciclo de

atividade/repouso que, no caso dos roedores, ocorre no início da fase de escuro. Mais especificamente, este é um fenômeno que ocorre de maneira similar nos dois grupos, sendo detectável o momento exato de seu início. Nos animais sincronizados, o apagar das luzes já induz atividade perceptível pela simples observação comportamental. Nos animais em escuro constante, o CT 12 corresponde ao momento do primeiro registro de atividade de cada animal, sendo o ponto de referência para o cálculo de todos os outros CTs. Em outras palavras, há absoluta certeza de que tanto no início do ZT 12 quanto no início de CT 12 os animais encontram-se em atividade.

Como mencionado nos resultados, o principal hormônio relacionado ao ritmo de atividade/repouso nos roedores é a corticosterona. De modo geral, os corticóides estão relacionados à preparação do organismo para o início da fase de atividade, tanto em animais de hábito noturno quanto de hábito diurno. A dosagem de corticosterona plasmática nos animais em livre-curso confirmou a relação entre o ritmo endógeno deste hormônio e o ritmo de atividade/repouso, pois os valores máximos de corticosterona foram obtidos em CT 12. Esta dosagem detectou níveis plasmáticos de corticosterona considerados acima dos níveis basais por alguns estudos na literatura, que relatam que o pico de corticosterona seja na ordem de 100 a 200 ng/mL (Buijs et al., 1999, 2003; Kalsbeek et al., 2003; Malek et al., 2008). Entretanto, outros estudos que também trabalharam com ratos em condições fisiológicas, obtiveram valores semelhantes aos apresentados na presente dissertação, com picos em torno de 350 ng/mL (Cavigelli et al., 2005; Perelló et al., 2006; Salgado-Delgado et al., 2008; Thanos et al., 2009). Essa concordância é importante para a certificação de que os níveis dosados refletem fidedignamente os níveis hormonais circulantes, não sendo um reflexo da

ativação do eixo HPA (hipotálamo-pituitária-adrenal) por estresse. Adicionalmente, a presença de um ritmo na concentração plasmática de corticosterona ao longo das 24h circadianas já indica, por si só, que os valores dosados referem-se aos níveis basais desse hormônio. Um estudo metodológico comparativo demonstrou que, nos casos onde o eixo HPA foi ativado durante a coleta amostral, os níveis circulantes de corticosterona são mantidos constantemente elevados, não sendo mais detectável sua ritmicidade. Este mesmo estudo mostrou ainda que o método de decapitação sem anestésicos para a coleta de amostras sanguíneas é o mais indicado para que se obtenha um menor efeito estressor de ativação do eixo HPA (Vahl et al., 2005).

A apresentação conjunta dos dados de corticosterona e NFkB obtidos em animais na condição de livre-curso revelou uma alta correlação entre as curvas, pois o momento em que a corticosterona atinge seu pico máximo é o mesmo momento em que a queda no conteúdo nuclear de NFkB é observada. Isso nos levou a propor que o ritmo endógeno de corticosterona atua diretamente sobre a glândula pineal e seu pico máximo induz a redução abrupta de NFkB no núcleo dos pinealócitos. Essa hipótese é corroborada pelos dados da literatura que comprovam tanto a existência da relação entre as glândulas adrenal e pineal (Lopes et al., 2001; Fernandes et al., 2009), quanto a existência de uma ação inibitória de corticosterona sobre NFkB (Smoak e Cidlowski, 2004; Ferreira et al., 2005).

Os relatos da interação entre a glândula adrenal e a glândula pineal remontam aos primeiros estudos acerca da função da pineal (Neri-Serneri e Bartoli, 1957; Vaughan e Reiter, 1971). Mais recentemente, essa relação foi demonstrada em situações de inflamação crônica (Lopes et al., 2001) e o efeito potenciador de

corticosterona sobre a pineal foi verificado *in vitro* e *in vivo* (Ferreira et al., 2005; Fernandes et al., 2009). Este mesmo estudo de 2005 demonstrou ainda a presença de receptores para glicocorticóides (GR) nos pinealócitos e a capacidade da corticosterona em inibir a translocação nuclear de NFkB via ativação de GR.

A relação antagônica entre a ativação de receptores para glicocorticóides (GR) e a via NFkB é conhecida no sistema imune há mais de uma década (Mckay e Cidlowski, 1998). O GR corresponde a uma família de receptores intracelulares, que translocam ao núcleo após ativação e atuam na regulação da transcrição gênica. Dentre os efeitos antiinflamatórios dos glicocorticóides está a inibição dos genes pró-inflamatórios induzidos pelo fator NFkB. Isso ocorre por uma interação direta entre NFkB e GR e compõe um importante mecanismo de antagonismo mútuo (revisto por Smoak e Cidlowski, 2004).

Retomando aos dados apresentados sobre a relação da transição claro/escuro com o conteúdo nuclear de NFkB, foi demonstrada a dependência da informação fótica ambiental para a observação do ritmo diário deste fator, já que o não apagar das luzes impediu a queda no conteúdo nuclear de NFkB. Nessa condição, não sabemos como se comporta o ritmo endógeno de corticosterona e o ritmo de atividade/repouso dos animais. Isso porque os animais foram submetidos a poucas horas de exposição luminosa. Os estudos que trabalham com a condição de luz constante relatam somente os efeitos obtidos após, no mínimo, uma semana de adaptação a essa nova condição. As alterações fisiológicas nessas primeiras horas em novo regime de iluminação não são relatadas, dificultando nossa compreensão do motivo pelo qual os níveis de NFkB permaneceram elevados enquanto a luz permanecia acesa (fig. 8).

A possibilidade mais provável é a de que o ritmo de corticosterona tenha sido prejudicado pelo prolongamento da fase de claro. Existem relatos de que o pico no ritmo endógeno de corticosterona é inibido por vasopressina, neurotransmissor liberado pelos NSQ de forma rítmica (Kalsbeek et al., 2008). Essa liberação é consequente da atividade elétrica rítmica dos neurônios dos NSQ e os níveis máximos de VP no líquido cefalorraquidiano são detectados na fase de claro ambiental (Kalsbeek et al., 2006a). Por exercer uma ação inibitória sobre o PVN, o declínio nos níveis de VP é fundamental para que aumente a produção de corticosterona (Kalsbeek et al., 1996). Com isso, pode-se hipotetizar que o não apagar das luzes nesta condição experimental manteve os níveis de vasopressina elevados, prejudicando o aumento nos níveis circulantes de corticosterona. Na ausência de corticosterona, não houve a queda abrupta de NFkB. De fato, é relatado que após três semanas em claro constante os animais não apresentam ritmo detectável de corticosterona plasmática (Claustrat et al., 2008).

3. NFkB na fisiologia e fisiopatologia da glândula pineal

A análise conjunta dos dados apresentados no presente trabalho propõe um modelo de controle dos níveis de NFkB na glândula pineal. De acordo com este modelo, os níveis de NFkB nuclear aumentam paulatinamente ao longo do dia, até atingirem seu máximo no final da fase de claro; assim que se inicia a fase de escuro, o pico de corticosterona plasmática atua diretamente sobre a pineal e reduz drasticamente o conteúdo nuclear de NFkB. Após o efeito da corticosterona, essa

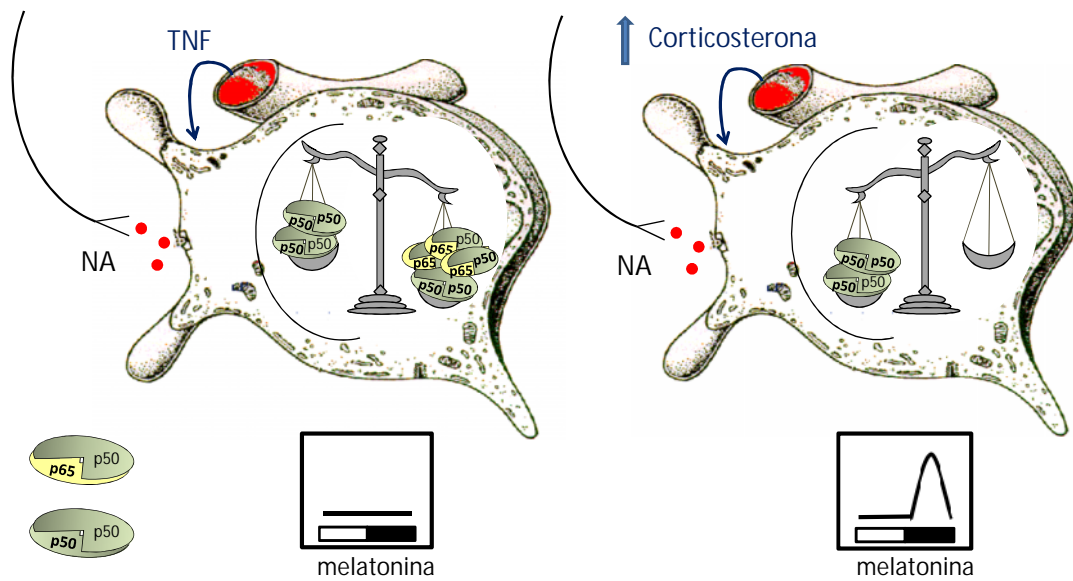
inibição sobre NFκB passa a ser exercida pela própria melatonina produzida no local, de modo que os baixos níveis de NFκB nuclear são mantidos por toda a noite. Ao final da fase de escuro, a síntese e liberação de melatonina são terminadas e, com isso, anula-se a ação inibitória sobre NFκB. Na ausência dos dois hormônios – corticosterona e melatonina – não há empecilhos à translocação nuclear deste fator de transcrição, ocorrendo então um aumento crescente de seu conteúdo nuclear ao longo da fase de claro, reiniciando um novo ciclo. A demonstração efetiva de que tanto melatonina quanto corticosterona são capazes de inibir a translocação nuclear de NFκB é um forte subsídio a favor deste modelo.

A importância desta regulação fisiológica do conteúdo nuclear de NFκB reflete a grande capacidade modulatória deste fator de transcrição sobre a síntese de melatonina. Essa capacidade já foi comprovada dentro do conceito do eixo imune-pineal, em que este fator de transcrição é uma peça central nos processos de inibição ou potenciação da produção hormonal pela glândula pineal (revisto por Markus et al., 2007). Interessante notar que esses efeitos modulatórios demonstraram uma relação inversa entre o conteúdo de NFκB nuclear e o conteúdo de melatonina produzido, de modo que a ativação da via de NFκB inibe a produção hormonal, enquanto que o bloqueio de NFκB a potencia. Essa correlação inversa também foi observada na situação fisiológica, em que os altos níveis de NFκB são encontrados na fase de claro, em que não há produção hormonal pela pineal. Já na fase de escuro, o NFκB é impedido de translocar ao núcleo, facilitando então a síntese fisiológica de melatonina. Em contraste com os trabalhos da literatura, esta é a primeira vez em que as interações

corticosterona – NFkB e melatonina – NFkB são demonstradas ocorrer em condições fisiológicas.

Em suma, a presente dissertação demonstra que a ativação constitutiva da via do fator de transcrição NFkB participa da regulação fisiológica da glândula pineal, sendo que os mecanismos de controle dessa ativação geram a percepção de um ritmo diário nos níveis nucleares de NFkB. Interessantemente, os mecanismos reguladores da translocação nuclear de NFkB são exercidos pelos hormônios corticosterona e melatonina, hormônios altamente relacionados com a sincronização do organismo aos ciclos ambientais. Como importante órgão fototransdutor, é possível que esse controle sobre NFkB constitua mais um mecanismo pelo qual a glândula pineal sincroniza sua atividade biossintética ao ciclo claro/escuro ambiental, o que é de importância fundamental para os efeitos cronobióticos exercidos pela melatonina. Com isso, a regulação da via NFkB adquire um papel central na fisiologia e fisiopatologia da glândula pineal. Em condições fisiológicas, o controle desta via auxilia na manutenção da atividade basal da glândula, enquanto que uma situação patológica que altere os níveis nucleares deste fator acarreta numa modulação da produção de melatonina (fig. 19).

Modulação de NFKB no Eixo Imune-Pineal



Modulação de NFKB em Condição Fisiológica

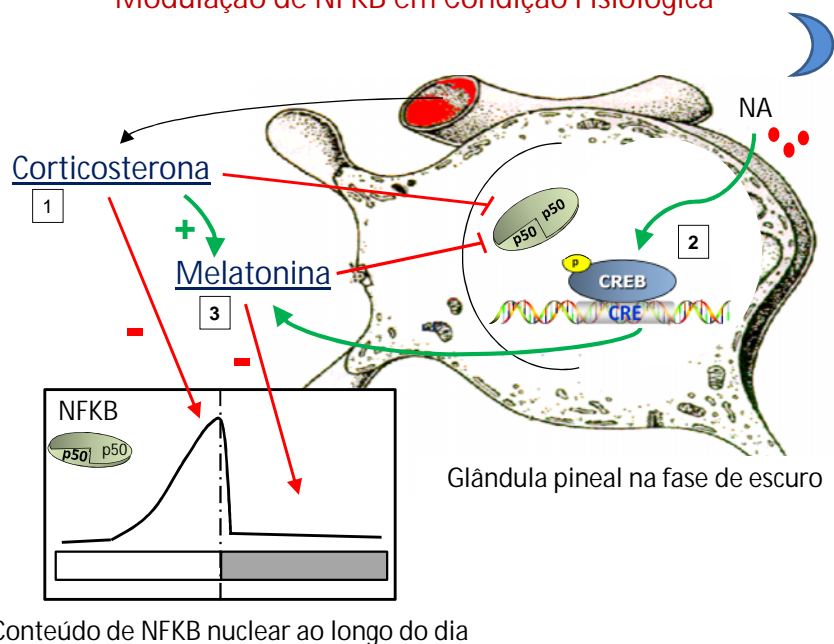


Figura 19 – Regulação do conteúdo nuclear de NFKB em glândulas pineais de ratos. Alterações nos níveis de NFKB nuclear induzidas por agentes do sistema imune (TNF e corticosterona) modulam a produção de melatonina (painel superior). Em condição fisiológica (painel inferior), tanto corticosterona quanto melatonina reduz o NFKB nuclear na pineal. Os níveis de NFKB aumentam gradativamente na fase de claro, até que o pico de corticosterona reduza-os drasticamente (1). Ao longo da fase de escuro, a melatonina produzida pela pineal (2) mantém os níveis nucleares de NFKB baixos (3). Tanto na situação patológica quanto na fisiológica, há uma relação inversa entre o NFKB nuclear e a síntese de melatonina.

Estes dados somam-se aos encontrados na literatura com frequência cada vez maior a respeito da importância fisiológica de NFkB. A compreensão dos mecanismos de ação e das funções fisiológicas deste fator de transcrição nos mais diversos tipos celulares é indispensável para um melhor entendimento do funcionamento celular. Além disso, tais estudos são também essenciais às pesquisas que consideram o NFkB como o alvo mais atual e promissor no desenvolvimento de novos fármacos e terapias contra moléstias caracterizadas por uma ativação exacerbada do sistema imune (revisto por Glezer et al., 2000; Paris et al., 2007; Sethi et al., 2008).

Por fim, os dados aqui apresentados não só complementam a lista de atuações fisiológicas de NFkB como também abrem um novo campo de investigação a acerca dos mecanismos modulatórios sobre a glândula pineal. Neste aspecto, as milhares de substâncias que envolvem a ativação da via NFkB em suas vias de sinalização passam a constituir possíveis moduladores da atividade biossintética da pineal. Simultaneamente, isso também pode significar a descoberta de novos mecanismos regulatórios no encadeamento complexo de processos que geram a ritmicidade da produção de melatonina.

VI. CONCLUSÕES

- 1) Glândulas pineais apresentam a via do fator de transcrição NFκB ativada constitutivamente; tendo sido caracterizada a presença de homodímeros da subunidade p50;
- 2) Essa ativação constitutiva de NFκB apresenta-se sob a forma de um ritmo diário, que pode ser distinguido em três partes: ao longo da fase de claro seus níveis nucleares são crescentes, atingindo valores máximos ao final desta fase; assim que se inicia o escuro, há uma redução abrupta no conteúdo nuclear de NFκB; esses baixos níveis são mantidos ao longo de toda a fase de escuro ambiental.
- 3) O ritmo na translocação nuclear de NFκB é consequência de mecanismos que regulam a sua entrada no núcleo celular. Na primeira fase do ritmo, a ausência de mecanismos regulatórios permite que o NFκB entre gradativamente no núcleo dos pinealócitos; o pico de corticosterona no início da fase de escuro ambiental causa uma forte inibição sobre NFκB e seu conteúdo nuclear é drasticamente reduzido; a manutenção dos níveis baixos de NFκB nuclear ao longo da fase de escuro é garantida pela ação inibitória da própria melatonina produzida pela pineal.

A via do fator de transcrição NFκB, considerada uma peça-chave na montagem de respostas imunes, tem se revelado cada vez mais atuante em processos fisiológicos. Além de ser uma ferramenta que capacita a glândula pineal a responder a estimulação por mediadores do sistema imune, esta via demonstrou estar constitutivamente ativada em situações fisiológicas. Nesta condição, observou-se que o conteúdo de NFκB é finamente regulado para que seus efeitos modulatórios não sejam exercidos. Além disso, essa regulação é mediada por hormônios cronobióticos, ou seja, cujas funções estão relacionadas à sincronização do organismo às variações cíclicas ambientais. Dessa forma, os níveis diferenciais deste fator de transcrição no núcleo dos pinealócitos ao longo do dia podem constituir um mecanismo adicional pelo qual a glândula pineal sincroniza sua atividade biossintética ao ciclo claro/escuro ambiental. Por fim, este trabalho abre novas perspectivas ao estudo dos mecanismos regulatórios e modulatórios que diferentes substâncias podem exercer sobre a glândula pineal.

VII. RESUMO

A glândula pineal é um órgão neuroendócrino que traduz a informação fótica ambiental em sinal humoral pela produção noturna do hormônio melatonina. Recentemente, trabalhos de nosso grupo apontam para a existência de um eixo imune-pineal, que considera não só a influência que a melatonina exerce sobre células imunocompetentes, mas também o efeito de mediadores da inflamação sobre a atividade biossintética da glândula. Foi demonstrado que a síntese de melatonina pode ser inibida por agentes pró-inflamatórios e potenciada por substâncias antiinflamatórias. Ambos os efeitos são dependentes da via do fator de transcrição NFκB, sendo que seu conteúdo nuclear nos pinealócitos está inversamente relacionado à produção de melatonina. Esta via de sinalização do NFκB foi inicialmente relacionada somente aos processos de resposta imunológica. Entretanto, seu envolvimento em processos fisiológicos tem sido cada vez relatado. A detecção desta via em glândulas pineais e da sua potencialidade em modular a síntese de melatonina induziu à pesquisa do possível papel fisiológico de NFκB neste órgão, objetivo da presente dissertação. Glândulas pineais obtidas de animais hígidos apresentam a via NFκB constitutivamente ativada, sendo que o conteúdo nuclear deste fator apresenta-se de forma rítmica ao longo do dia. Na fase de claro ambiental há um acúmulo nuclear gradativo, mas assim que inicia a fase de escuro os níveis nucleares de NFκB são bruscamente reduzidos e mantidos baixos durante toda a fase de escuro. Essa dependência do ritmo de NFκB com relação à informação fótica ambiental é, na verdade, consequência do efeito de ritmos hormonais atuantes sobre a essa via. A corticosterona induz a queda abrupta nos níveis nucleares deste fator no início do escuro, enquanto que a própria melatonina produzida pela pineal mantém essa inibição sobre a translocação nuclear de NFκB durante o restante da noite. Assim, postula-se que a regulação deste fator garanta a funcionalidade fisiológica da glândula, uma vez em que alterações no seu conteúdo nuclear resultam em alterações na produção de melatonina. Além disso, tais dados abrem novas perspectivas quanto aos mecanismos regulatórios da atividade da pineal por agentes que atuam via NFκB.

VIII. ABSTRACT

The pineal gland is a neuroendocrine organ that transduces the environmental photic information into humoral signals through the nocturnal production of melatonin. Recently, our group have showed the existence of a Immune-pineal axis, that consider not only the melatonin effects on immunocompetent cells, but also the effect of inflammatory mediators on the biosynthetic activity of the pineal gland. It was shown that the melatonin production can be inhibited by pro-inflammatory agents and potentiated by the anti-inflammatory ones. Both effects rely on the NF κ B nuclear factor pathway, since its nuclear content in pinealocytes is inversely related to melatonin production. The NF κ B pathway was firstly related only to the immune response processes. However, its role in several physiological functions is well documented nowadays. The detection of this pathway in pineal glands and the detection of its modulatory effects on melatonin production lead to the investigation of the putative physiologic role of NF κ B in the gland, which was the aim of this project. Pineal glands from healthy animals show NF κ B pathway constitutively activated and its nuclear contents show a rhythm through out the 24h of the day. During the light phase, the amount of NF κ B increases continuously and a sharp drop occurs when lights are turned off and there is low level of nuclear NF κ B all night long. Actually, the relation between the NF κ B rhythm and the light/dark cycle is dependent on endogenous hormonal rhythms. Corticosterone induces the abrupt drop in nuclear NF κ B at the beginning of the dark phase, while the pineal melatonin keeps this inhibitory effect through the night. Therefore, it is suggested that the control of NF κ B nuclear translocation is required to the physiological function of pineal gland, since any alteration on its nuclear content results in alteration on melatonin production. In addition, these data opens new perspectives on the regulatory mechanisms of the pineal biosynthetic activity by agents that act through the NF κ B pathway.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUZZI J., BULLOCK N.M., TOSINI G. (2006). Spontaneous internal desynchronization of locomotor activity and body temperature rhythms from plasma melatonin rhythm in rats exposed to constant dim light. *J. Circadian Rhythms*, 4: 6-11.
- ALONSO M., COLLADO P.S., GONZÁLEZ-GALLEGO J. (2006). Melatonin inhibits the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase and nuclear factor kappa B activation in rat skeletal muscle. *J. Pineal Res.*, 41(1): 8-14.
- AMMON C., MONDAL K., ANDREESEN R., KRAUSE S.W. (2000). Differential expression of the transcription factor NF-kappaB during human mononuclear phagocyte differentiation to macrophages and dendritic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 268(1): 99-105.
- ANEST V., HANSON J.L., COGSWELL P.C., STEINBRECHER K.A., STRAHL B.D., BALDWIN A.S. (2003). A nucleosomal function for IkappaB kinase-alpha in NF-kappaB-dependent gene expression. *Nature*, 423(6940): 659-663.
- ANISIMOV V.N., POPOVICH I.G., ZABEZHINSKI M.A., ANISIMOV S.V., VESNUSHKIN G.M., VINOGRADOVA I.A. (2006). Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1757(5-6): 573-589.
- ARENDRT J. (1995). In: *Melatonin and the mammalian pineal gland*. 1ª edição. Ed. Chapman & Hall, Londres, pp. 1-35.
- ARMELIN M.A. (2009). Caracterização dos efeitos de LPS em pinealócitos de rato em cultura. Dissertação apresentada no Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, SP.
- ASHBURNER B.P., WESTERHEIDE S.D., BALDWIN A.S. Jr. (2001). The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Mol. Cell Biol.*, 21(20): 7065-7077.
- ATCHISON M.L., PERRY R.P. (1987). The role of the kappa enhancer and its binding factor NF-kappa B in the developmental regulation of kappa gene transcription. *Cell*, 48(1): 121-128.
- AXELROD J. (1974). The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science*, 184(144): 1341-1348.
- AXELROD J., WEISSBACH H. (1961). Purification and properties of hydroxyindole-O-methyl transferase. *J. Biol. Chem.*, 236: 211-213.

- BAEUERLE P.A., BALTIMORE D. (1988a). Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor. *Cell*, 53(2): 211-217.
- BAEUERLE P.A., BALTIMORE D. (1988b). I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science*, 242(4878): 540-546.
- BAEUERLE P.A., BALTIMORE D. (1996). NF- κ B: Ten Years After. *Cell*, 87: 13-20.
- BALER R., COVINGTON S., KLEIN D.C. (1997). The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter: cAMP activation via a cAMP-responsive element-CCAAT complex. *J. Biol. Chem.*, 272: 6979-6985.
- BALER R., COVINGTON S., KLEIN D.C. (1999). Rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene: Upstream and intronic components of a bipartite promoter. *Biol. Cell*, 91: 699-705.
- BEG A.A., SHA W.C., BRONSON R.T., GHOSH S., BALTIMORE D. (1995). Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature*, 376(6536): 167-170.
- BENI S.M., KOHEN R., REITER R.J., TAN D.X., SHOHAMI E. (2004). Melatonin-induced neuroprotection after closed head injury is associated with increased brain antioxidants and attenuated late-phase activation of NF-kappaB and AP-1. *FASEB J.*, 18(1): 149-151.
- BIERHAUS A., WOLF J., ANDRASSY M., ROHLEDER N., HUMPERT P.M., PETROV D., FERSTL R., VON EYNATTEN M., WENDT T., RUDOFISKY G., JOSWIG M., MORCOS M., SCHWANINGER M., MCEWEN B., KIRSCHBAUM C., NAWROTH P.P. (2003). A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 1920-1925.
- BLACKWELL T.S., CHRISTMAN J.W. (1997). The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 17(1): 3-9.
- BLASK D.E., DAUCHY R.T., SAUER L.A. (2005). Putting cancer to sleep at night the neuroendocrine/circadian melatonin signal. *Endocrine*, 27(2): 179-188.
- BOURS V., FRANZOSO G., AZARENKO V., PARK S., KANNO T., BROWN K., SIEBENLIST U. (1993). The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell*, 72(5): 729-739.
- BROWN K.D., CLAUDIO E., SIEBENLIST U. (2008). The roles of the classical and alternative nuclear factor-kappaB pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 10(4): 212-225.
- BRUCK R., AEED H., AVNI Y., SHIRIN H., MATAS Z., SHAHMUROV M., AVINOACH I., ZOZULYA G., WEIZMAN N., HOCHMAN A. (2004). Melatonin inhibits nuclear factor

- kappa B activation and oxidative stress and protects against thioacetamide induced liver damage in rats. *J. Hepatol.*, 40(1): 86-93.
- BRZEZINSKI A. (1997). Melatonin in humans. *N. Engl. J. Med.*, 336(3): 186-195.
- BUIJS R.M., VAN EDEN C.G., GONCHARUK V.D., KALSBECK A. (2003). The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. *J. Endocrinol.*, 177: 17–26.
- BUIJS R.M., WORTEL J., VAN HEERIKHUIZE J.J., FEENSTRA M.G.P., HORST G.J.T., ROMIJN H.J., KALSBECK A. (1999). Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur. J. Neurosci.*, 11: 1535–1544.
- BURKLY L., HESSION C., OGATA L., REILLY C., MARCONI L.A., OLSON D., TIZARD R., CATE R., LO D. (1995). Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature*, 373(6514): 531-536.
- CAO J.P., WANG H.J., YU J.K., LIU H.M., GAO D.S. (2008). The involvement of NF-kappaB p65/p52 in the effects of GDNF on DA neurons in early PD rats. *Brain Res. Bull.*, 76(5): 505-511.
- CAO S., ZHANG X., EDWARDS J.P., MOSSER D.M. (2006). NF-kappaB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *J. Biol. Chem.*, 281(36): 26041-26050.
- CARLOTTI F., DOWER S.K., QWARNSTROM E.E. (2000). Dynamic shuttling of nuclear factor κ B between the nucleus and cytoplasm as a consequence of inhibitor dissociation. *J. Biol. Chem.*, 275(52): 41028–41034.
- CARRILLO-VICO A., GUERRERO J.M., LARDONE P.J., REITER R.J. (2005). A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine*, 27(2): 189–200.
- CAVIGELLI S.A., MONFORT S.L., WHITNEY T.K., MECHREF Y.S., NOVOTNY M., MCCLINTOCK M.K. (2005). Frequent serial fecal corticoid measures from rats reflect circadian and ovarian corticosterone rhythms. *J. Endocrinol.*, 184(1): 153-163.
- CHALLET E., PÉVET P., VIVIEN-ROELS B., MALAN A. (1997). Phase-advanced daily rhythms of melatonin, body temperature, and locomotor activity in food-restricted rats fed during daytime. *J. Biol. Rhythms*, 12(1): 65-79.
- CHANDRASHEKARAN M.K. (2006). Erwin Bünning (1906–1990): A centennial homage. *J. Biosci.*, 31(1): 5–12.
- CHEN W., BALER R. (2000). The rat arylalkylamine N-acetyltransferase E-box: differential use in a master vs. a slave oscillator. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 81(1-2): 43-50.

- CHEN X., YOZA B.K., GAZZAR M.E., HU J.Y., COUSART S.L., MCCALL C.E. (2009). RelB sustains I κ B α expression during endotoxin tolerance. *Clin. Vacc. Immunol.*, 16(1): 104–110.
- CHENG Y., FENG Z., ZHANG Q., ZHANG J. (2006). Beneficial effects of melatonin in experimental models of Alzheimer disease. *Acta Pharmacol. Sinica*, 27(2): 129–139.
- CHUANG J.I., MOHAN N., MELTZ M.L., REITER R.J. (1996). Effect of melatonin on NF-kappa-B DNA-binding activity in the rat spleen. *Cell Biol. Int.*, 20(10): 687-692.
- CIPOLLA-NETO J., BARTOL I., SERAPHIM P.M., AFECHE S.C., SCIALFA J.H., PERAÇOLI A.M. (1995). The effects of lesions of the thalamic intergeniculate leaflet on the pineal metabolism. *Brain Res.*, 691(1-2): 133-141.
- CLAUSTRAT B., VALATX J.L., HARTHÉ C., BRUN J. (2008). Effect of constant light on prolactin and corticosterone rhythms evaluated using a noninvasive urine sampling protocol in the rat. *Horm. Metab. Res.*, 40(6): 398-403.
- CONTI A., CONCONI S., HERTENS E., SKWARLO-SONTA K., MARKOWSKA M., MAESTRONI J.M. (2000). Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J. Pineal Res.*, 28(4): 193-202.
- COUTO-MORAES R., PALERMO-NETO J., MARKUS R.P. (2009). The Immune–Pineal Axis: Stress as a Modulator of Pineal Gland Function. *Neuroimmunomodulation: Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1153: 193–202.
- CRISTOFANON S., MORCEAU F., SCOVASSI A.I., DICATO M., GHIBELLI L., DIEDERICH M. (2009). Oxidative, multistep activation of the noncanonical NF-kappaB pathway via disulfide Bcl-3/p50 complex. *FASEB J.*, 23(1): 45-57.
- CRUZ-MACHADO S.S., FERREIRA Z.S., MARKUS R.P. (2009). Characterization of immune-pineal axis: lipopolysaccharide activates NF-kB translocation to nucleus and induces TNF production in rat pineal gland. In: *Anais do 41º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Ribeirão Preto - SP.*
- CSABA G., BARÁTH P. (1975). Morphological changes of thymus and the thyroid gland after postnatal extirpation of pineal body. *Endocrinol. Exp.*, 9(1): 59-67.
- CULLEN S.J., PONNAPPAN S., PONNAPPAN U. (2010). Proteasome inhibition up-regulates inflammatory gene transcription induced by an atypical pathway of NF-kappaB activation. *Biochem. Pharmacol.*, 79(5): 706-714.
- DANDY W.E. (1915). Extirpation of the pineal body. *J. Exp. Med.*, 22(2): 237–246.
- DELERIVE P., MONTÉ D., DUBOIS G., TROTTEIN F., FRUCHART-NAJIB J., MARIANI J., FRUCHART J.C., STAELS B. (2001). The orphan nuclear receptor ROR alpha is a negative regulator of the inflammatory response. *EMBO Rep.*, 2(1): 42-48.

- DING J.M., FAIMAN L.E., HURST W.J., KURIASHKINA L.R., GILLETTE M.U. (1997). Resetting the biological clock: mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide. *J. Neurosci.*, 17(7): 2637-2644.
- DOBRZANSKI P., RYSECK R.P., BRAVO R. (1993). Both N- and C-terminal domains of RelB are required for full transactivation: role of the N-terminal leucine zipper-like motif. *Mol. Cell Biol.*, 13(3): 1572-1582.
- DOERRE S., MESIRES K.P., DALEY K.M., MCCARTY T., KNOETIG S., CORLEY R.B. (2005). Reductions in I kappa B epsilon and changes in NF-kappa B activity during B lymphocyte differentiation. *J. Immunol.*, 174(2): 983-991.
- DRIESSLER F., VENSTROM K., SABAT R., ASADULLAH K., SCHOTTELIUS A.J. (2004). Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF-kappaB activity: a role for p50. *Clin. Exp. Immunol.*, 135(1): 64-73.
- DRIJFHOUT WJ, GROEL CJ, WESTERINK BH. (1996). Parasympathetic inhibition of pineal indole metabolism by prejunctional modulation of noradrenaline release. *Eur. J. Pharmacol.*, 308(2): 117-124.
- DUFFIELD G.E. (2003). DNA microarray analyses of circadian timing: the genomic basis of biological time. *J. Neuroendocrinol.*, 15(10): 991-1002.
- EKSTRÖM P., MEISSEL H. (2003). Evolution of photosensory pineal organs in new light: the fate of neuroendocrine photoreceptors. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 358(1438): 1679-1700.
- FAHRENKRUG J. (2006). PACAP--a multifaceted neuropeptide. *Chronobiol. Int.*, 23(1-2): 53-61.
- FALCÓN J., BESSEAU L., FUENT'ES M., SAUZET S., MAGNANOU E., BOEUF G. (2009). Structural and functional evolution of the pineal melatonin system in vertebrates. *Trends Comp. Endocrinol. Neurobiol.: Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1163: 101-111.
- FERNANDES P.A., BOTHOREL B., CLESSE D., MONTEIRO A.W., CALGARI C., RAISON S., SIMONNEAUX V., MARKUS R.P. (2009). Local corticosterone infusion enhances nocturnal pineal melatonin production in vivo. *J. Neuroendocrinol.*, 21: 90-97.
- FERNANDES P.A., CECON E., MARKUS R.P., FERREIRA Z.S. (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(4): 344-350.
- FERREIRA Z.S., CIPOLLA-NETO J., MARKUS R.P. (1994). Presence of P2-purinoceptors in the rat pineal gland. *Br. J. Pharmacol.*, 112: 107-110.

- FERREIRA Z.S., FERNANDES P.A., DUMA D., ASSREUY J., AVELLAR M.C., MARKUS R.P. (2005). Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. *J. Pineal Res.*, 38(3): 182-188.
- FERREIRA Z.S., GARCIA C.R., SPRAY D.C., MARKUS R.P. (2003). P2Y(1) receptor activation enhances the rate of rat pinealocyte-induced extracellular acidification via a calcium-dependent mechanism. *Pharmacology*, 69(1): 33-37.
- FINOCCHIARO L.M., GLIKIN G.C. (1998). Intracellular melatonin distribution in cultured cell lines. *J. Pineal Res.*, 24(1): 22-34.
- FIORINI E., SCHMITZ I., MARISSSEN W.E., OSBORN S.L., TOUMA M., SASADA T., RECHE P.A., TIBALDI E.V., HUSSEY R.E., KRUISBEEK A.M., REINHERZ E.L., CLAYTON L.K. (2002). Peptide-induced negative selection of thymocytes activates transcription of an NF-kappa B inhibitor. *Mol. Cell.*, 9(3): 637-648.
- FRANZOSO G., CARLSON L., POLJAK L., SHORES E.W., EPSTEIN S., LEONARDI A., GRINBERG A., TRAN T., SCHARTON-KERSTEN T., ANVER M., LOVE P., BROWN K., SIEBENLIST U. (1998). Mice deficient in nuclear factor (NF)-kappa B/p52 present with defects in humoral responses, germinal center reactions, and splenic microarchitecture. *J. Exp. Med.*, 187(2): 147-159.
- FRIDMACHER V., KALTSCHMIDT B., GOUDEAU B., NDIAYE D., ROSSI F.M., PFEIFFER J., KALTSCHMIDT C., ISRAEL A., MAOMET S. (2003). Forebrain-specific neuronal inhibition of nuclear factor-kappaB activity leads to loss of neuroprotection. *J. Neurosci.*, 23(28): 9403-9408.
- FUJITA T., NOLAN G.P., LIOU H.C., SCOTT M.L., BALTIMORE D. (1993). The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers. *Genes Dev.*, 7(7B): 1354-1363.
- FUKUHARA C., AGUZZI J., BULLOCK N., TOSINI G. (2005). Effect of long-term exposure to constant dim light on the circadian system of rats. *Neurosignals*, 14(3): 117-125.
- GAVRILYUK V., DELLO-RUSSO C., HENEKA M.T., PELLIGRINO D., WEINBERG G., FEINSTEIN D.L. (2002). Norepinephrine increases I kappa B alpha expression in astrocytes. *J. Biol. Chem.*, 277: 29662-29668.
- GHOSH S., HAYDEN M.S. (2008). New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 8(11): 837-848.
- GHOSH S., KARIN M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*, 109: S81-S96.
- GHOSH S., MAY M.J., KOPP E.B. (1998). NF-kB and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 16: 225-260.

- GILAD E., WONG H.R., ZINGARELLI B., VIRÁG L., O'CONNOR M., SALZMAN A.L., SZABÓ C. (1998). Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFkappaB activation. *FASEB J.*, 12: 685-693.
- GLEZER I., MARCOURAKIS T., AVELLAR M.C.W., GORENSTEIN C., SCAVONE C. (2000). O fator de transcrição NF-kB nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, 22(1): 26-30.
- GRANT K. (1974). In: *Chronobiology: The growth and development of a science*. Tese apresentada na Ball State University, Muncie, Indiana, EUA.
- GREGERSEN P.K., AMOS C.I., LEE A.T., LU Y., REMMERS E.F., KASTNER D.L., SELDIN M.F., CRISWELL L.A., PLENGE R.M., HOLERS V.M., MIKULS T.R., SOKKA T., MORELAND L.W., BRIDGES S.L.Jr, XIE G., BEGOVICH A.B., SIMINOVITCH K.A. (2009). REL, encoding a member of the NF-kappaB family of transcription factors, is a newly defined risk locus for rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.*, 41(7): 820-823.
- GRUMBACH I.M., CHEN W., MERTENS S.A., HARRISON D.G. (2005). A negative feedback mechanism involving nitric oxide and nuclear factor kappa-B modulates endothelial nitric oxide synthase transcription. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 39(4): 595-603.
- GUAN H., HOU S., RICCIARDI R.P. (2005). DNA binding of repressor nuclear factor-kappaB p50/p50 depends on phosphorylation of Ser337 by the protein kinase A catalytic subunit. *J. Biol. Chem.*, 280(11): 9957-9962.
- HANNIBAL J., DING J.M., CHEN D., FAHRENKRUG J., LARSEN P.J., GILLETTE M.U., MIKKELSEN J.D. (1997). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. *J. Neurosci.*, 17(2): 667-675.
- HARDELAND R. (2009). Melatonin: signaling mechanisms of a pleiotropic agent. *Biofactors*, 35(2): 183-192.
- HARDELAND R., PANDI-PERUMAL S.R., CARDINALI D.P. (2006). Melatonin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 38(3): 313-316.
- HARDELAND R., POEGGELER B., NIEBERGALL R., ZELOSKO V. (2003). Oxidation of melatonin by carbonate radicals and chemiluminescence emitted during pyrrole ring cleavage. *J. Pineal Res.*, 34(1): 17-25.
- HATADA E.N., NIETERS A., WULCZYN F.G., NAUMANN M., MEYER R., NUCIFORA G., MCKEITHAN T.W., SCHEIDEREIT C. (1992). The ankyrin repeat domains of the NF-kappa

- B precursor p105 and the protooncogene bcl-3 act as specific inhibitors of NF-kappa B DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(6): 2489-2493.
- HAUS E., LAKATUA D.J., SWOYER J., SACKETT-LUNDEEN L. (1983). Chronobiology in hematology and immunology. *Am. J. Anat.*, 168(4): 467-517.
- HAYDEN M.S., GHOSH S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.*, 18(18): 2195-2224.
- HAYDEN M.S., GHOSH S. (2008). Shared Principles in NF-kB Signaling. *Cell*, 132(3): 344-362.
- HIROTANI T., LEE P.Y., KUWATA H., YAMAMOTO M., MATSUMOTO M., KAWASE I., AKIRA S., TAKEDA K. (2005). The nuclear IkappaB protein IkappaBNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria. *J. Immunol.*, 174(6): 3650-3657.
- HOBERG J.E., POPKO A.E., RAMSEY C.S., MAYO M.W. (2006). IkappaB kinase alpha-mediated derepression of SMRT potentiates acetylation of RelA/p65 by p300. *Mol. Cell Biol.*, 26(2): 457-471.
- HOBERG J.E., YEUNG F., MAYO M.W. (2004). SMRT derepression by the IkappaB kinase alpha: a prerequisite to NF-kappaB transcription and survival. *Mol. Cell.*, 16(2): 245-255.
- HOFFMANN A., LEUNG T.H., BALTIMORE D. (2003). Genetic analysis of NF-kappaB/Rel transcription factors defines functional specificities. *EMBO J.*, 22(20): 5530-5539.
- HOFFMANN A., LEVCHENKO A., SCOTT M.L., BALTIMORE D. (2002). The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science*, 298(5596): 1241-1245.
- HOU S., GUAN H., RICCIARDI R.P. (2003). Phosphorylation of serine 337 of NF-kappaB p50 is critical for DNA binding. *J. Biol. Chem.*, 278(46): 45994-46008.
- HUANG T.T., KUDO N., YOSHIDA M., MIYAMOTO S. (2000). A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of IkappaBalpha controls cytoplasmic localization of inactive NF-kappaB/IkappaBalpha complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(3): 1014-1019.
- INOUE J., KERR L.D., KAKIZUKA A., VERMA I.M. (1992). I kappa B gamma, a 70 kd protein identical to the C-terminal half of p110 NF-kappa B: a new member of the I kappa B family. *Cell*, 68(6): 1109-1120.
- INOUE S.T., KAWAMURA H. (1979). Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76(11): 5962-5966.
- JUNG B., AHMAD N. (2006). Melatonin in cancer management: progress and promise. *Cancer Res.*, 66(20): 9789-9793.

- KAJIURA F., SUN S., NOMURA T., IZUMI K., UENO T., BANDO Y., KURODA N., HAN H., LI Y., MATSUSHIMA A., TAKAHAMA Y., SAKAGUCHI S., MITANI T., MATSUMOTO M. (2004). NF-kappa B-inducing kinase establishes self-tolerance in a thymic stroma-dependent manner. *J. Immunol.*, 172(4): 2067-2075.
- KALSBECK A., GARIDOU M.L., PALM I.F., VAN DER VLIET J., SIMONNEAUX V., PÉVET P., BUIJS R.M. (2000). Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *Eur. J. Neurosci.*, 12: 3146-3154.
- KALSBECK A., PALM I.F., LA FLEUR S.E., SCHEER F.A., PERREAU-LENZ S., RUITER M., KREIER F., CAILOTTO C., BUIJS R.M. (2006a). SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *J. Biol. Rhythms*, 21(6): 458-469.
- KALSBECK A., PERREAU-LENZ S., BUIJS R.M. (2006b). A network of (autonomic) clock outputs. *Chronobiol. Int.*, 23(3): 521-535.
- KALSBECK A., RUITER M., LA FLEUR S.E., VAN HEIJNINGEN C., BUIJS R.M. (2003). The diurnal modulation of hormonal responses in the rat varies with different stimuli. *J. Neuroendocrinol.*, 15(12): 1144-1155.
- KALSBECK A., VAN DER VLIET J., BUIJS R.M. (1996). Decrease of endogenous vasopressin release necessary for expression of the circadian rise in plasma corticosterone: a reverse microdialysis study. *J. Neuroendocrinol.*, 8: 299-307.
- KALSBECK A., VAN HEERIKHUIZE J.J., WORTEL J., BUIJS R.M. (1998). Restricted daytime feeding modifies suprachiasmatic nucleus vasopressin release in rats. *J. Biol. Rhythms*, 13(1): 18-29.
- KALSBECK A., VERHAGEN L.A., SCHALIJ I., FOPPEN E., SABOUREAU M., BOTHOREL B., BUIJS R.M., PÉVET P. (2008). Opposite actions of hypothalamic vasopressin on circadian corticosterone rhythm in nocturnal versus diurnal species. *Eur. J. Neurosci.*, 27(4): 818-827.
- KALTSCHMIDT B., KALTSCHMIDT C. (2000). Constitutive NF-kappa B activity is modulated via neuron-astroglia interaction. *Exp. Brain Res.*, 130(1): 100-104.
- KALTSCHMIDT B., KALTSCHMIDT C. (2009). NF-kappaB in the nervous system. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.*, 1(3): a001271.
- KALTSCHMIDT B., WIDERA D., KALTSCHMIDT C. (2005). Signaling via NF- κ B in the nervous system. *Biochim. Biophys. Acta*, 1745: 287-299.
- KAPPERS J.A. (1960). The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. *Zeitschrift für Zellforschung*, 52: 163-215.

- KARIN M., BEN-NERIAH Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu. Rev. Immunol.*, 18: 621–663.
- KAROLCZAK M., KORF H., STEHLE J.H. (2005). The Rhythm and Blues of Gene Expression in the Rodent Pineal Gland. *Endocrine*, 27(2): 89–100.
- KITAY J.I., ALTSCHULE M.D. (1954). Effects of pineal extract administration on ovary weight in rats. *Endocrinology*, 65(6): 782-784.
- KLEIN D.C., SUGDEN D., WELLER J.L. (1983). Postsynaptic alpha-adrenergic receptors potentiate the beta-adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80(2): 599-603.
- KLEIN D.C., WELLER J.L. (1970). Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science*, 169(950): 1093-1095.
- KO C.H., TAKAHASHI J.S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.*, 15(2): R271-R277.
- KONOPKA R.J., BENZER S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68: 2112-2116.
- KRIETE A., MAYO K.L. (2009). Atypical pathways of NF-kappaB activation and aging. *Exp. Gerontol.*, 44: 250–255.
- KUWATA H., MATSUMOTO M., ATARASHI K., MORISHITA H., HIROTANI T., KOGA R., TAKEDA K. (2006). IkappaBNS inhibits induction of a subset of Toll-like receptor-dependent genes and limits inflammation. *Immunity*, 24(1): 41-51.
- KVETNOY I.M. (1999). Extrapineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system. *Histochem J.*, 31(1): 1-12.
- LEANDER P., VRANG N., MØLLER M. (1999). Neuronal projections from the mesencephalic raphe nuclear complex to the suprachiasmatic nucleus and the deep pineal gland of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Microsc. Res. Tech.*, 46(4-5): 257-264.
- LEE S.H., HANNINK M. (2001). The N-terminal nuclear export sequence of I κ B α is required for RanGTP-dependent binding to CRM1
- LEMOES D.R., DOWNS J.L., URBANSKI H.F. (2006). Twenty-four-hour rhythmic gene expression in the rhesus macaque adrenal gland. *Mol. Endocrinol.*, 20: 1164–1176.
- LERNER A.B., CASE J.D., TAKAHASHI Y. (1960). Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *J. Biol. Chem.*, 235: 1992-1997.
- LERNER A.B., CASE J.O., TAKAHASHI Y., LEE T.H., MORI W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.*, 80: 2587.

- LEZOUALC'H F., SPARAPANI M., BEHL C. (1998). N-acetyl-serotonin (normelatonin) and melatonin protect neurons against oxidative challenges and suppress the activity of the transcription factor NF-kappaB. *J. Pineal Res.*, 24(3): 168-178.
- LIU H.C., HSIA C.Y. (2003). Distinctions between c-Rel and other NF-kappaB proteins in immunity and disease. *Bioessays*, 25(8): 767-780.
- LISSONI P., ROVELLI F., MALUGANI F., BUCOVEC R., CONTI A., MAESTRONI G.J. (2001). Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. *Neuro Endocrinol. Lett.*, 22: 45-47.
- LIU R., ZHOU J., VAN HEERIKHUIZE J., HOFMAN M.A., SWAAB D.F. (1999). Decreased melatonin levels in postmortem cerebrospinal fluid in relation to aging, Alzheimer's disease, and apolipoprotein E-e4/4 Genotype. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84(1): 323-327.
- LOPES C., DELYRA J.L., MARKUS R.P., MARIANO M. (1997). Circadian rhythm in experimental granulomatous inflammation is modulated by melatonin. *J. Pineal Res.*, 23(2): 72-78.
- LOPES C., MARIANO M., MARKUS R.P. (2001). Interaction between the adrenal and the pineal gland in chronic experimental inflammation induced by BCG in mice. *Inflamm. Res.*, 50(1): 6-11.
- LOTUFO C.M., LOPES C., DUBOCOVICH M.L., FARSKY S.H., MARKUS R.P. (2001). Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur. J. Pharmacol.*, 430(2-3): 351-357.
- LOTUFO C.M., YAMASHITA C.E., FARSKY S.H., MARKUS R.P. (2006). Melatonin effect on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B4. *Eur. J. Pharmacol.*, 534(1-3): 258-263.
- MALEK Z.S., SAGE D., PÉVET P., RAISON S. (2008). Daily rhythm of tryptophan hydroxylase-2 messenger ribonucleic acid within raphe neurons is induced by corticoid daily surge and modulated by enhanced locomotor activity. *Endocrinol.*, 148(11): 5165-5172.
- MANKAN A.K., LAWLESS M.W., GRAY S.G., KELLEHER D., MCMANUS R. (2009). NF-kappaB regulation: the nuclear response. *J. Cell Mol. Med.*, 13(4): 631-643.
- MARIENFELD R., MAY M.J., BERBERICH I., SERFLING E., GHOSH S., NEUMANN M. (2003). RelB forms transcriptionally inactive complexes with RelA/p65. *J. Biol. Chem.*, 278(22): 19852-19860.
- MARKUS R.P., FERREIRA Z.S., FERNANDES P.A., CECON E. (2007). The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *Neuroimmunomodulation*, 14: 126-133.

- MARKUS R.P., TAMURA E.K. (2009). G protein-coupled receptors and other mechanisms that translate melatonin effects. In: G protein-coupled receptor: comparative perspectives. Kerala: Research Signpost, 37: 93-111.
- MARUI N., MEDFORD R.M., AHMAD M. (2005). Activation of RelA homodimers by tumour necrosis factor alpha: a possible transcriptional activator in human vascular endothelial cells. *Biochem. J.*, 390(Pt 1): 317-324.
- MATTSON M.P. (2005). NF-kappaB in the survival and plasticity of neurons. *Neurochem. Res.*, 30(6-7): 883-893.
- MATTSON M.P., CAMANDOLA S. (2001). NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J. Clin. Invest.*, 107(3): 247-254.
- MCKAY L.I., CIDLOWSKI J.A. (1998). Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. *Mol. Endocrinol.*, 12(1): 45-56.
- MÉMET S. (2006). NF-kappaB functions in the nervous system: from development to disease. *Biochem. Pharmacol.*, 72(9): 1180-1195.
- MENAKER M., MOREIRA L.F., TOSINI G. (1997). Evolution of circadian organization in vertebrates. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 30: 305-313.
- MIKENBERG I., WIDERA D., KAUS A., KALTSCHMIDT B., KALTSCHMIDT C. (2007). Transcription factor NF-kappaB is transported to the nucleus via cytoplasmic dynein/dynactin motor complex in hippocampal neurons. *PLoS One.*, 2(7): e589.
- MIKKELSEN J.D., MØLLER M. (1999). Neuropeptide Y in the mammalian pineal gland. *Microsc. Res. Tech.*, 46(4-5): 239-256.
- MILLER S.C., PANDI-PERUMAL S.R., ESQUIFINO A.I., CARDINALI D.P., MAESTRONI G.J. (2006). The role of melatonin in immuno-enhancement: potential application in cancer. *Int. J. Exp. Pathol.*, 87(2): 81-87.
- MISE-OMATA S., KURODA E., NIIKURA J., YAMASHITA U., OBATA Y., DOI T.S. (2007). A proximal kappaB site in the IL-23 p19 promoter is responsible for RelA- and c-Rel-dependent transcription. *J. Immunol.*, 179(10): 6596-6603.
- MOHAN N., SADEGHI K., REITER R.J., MELTZ M.L. (1995). The neurohormone melatonin inhibits cytokine, mitogen and ionizing radiation induced NF-kappa B. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 37(6): 1063-1070.
- MOKHTARI D., BARBU A., MEHMETI I., VERCAMER C., WELSH N. (2009). Overexpression of the Nuclear Factor- κ B subunit c-Rel protects against human islet cell death in vitro. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 297: 1067-1077.

- MØLLER M. (1997). Peptidergic cells in the mammalian pineal gland: Morphological indications for a paracrine regulation of the pinealocyte. *Biol. Cell.*, 89(9): 561-567.
- MØLLER M., BAERES F.M. (2002). The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell. Tissue Res.*, 309: 139-150.
- MONTANO M.A., KRIPKE K., NORINA C.D., ACHACOSO P., HERZENBERG L.A., ROY A.L., NOLAN G.P. (1996). NF-kappa B homodimer binding within the HIV-1 initiator region and interactions with TFII-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(22): 12376-12381.
- MOORTHY A.K., SAVINOVA O.V., HO J.Q., WANG V.Y., VU D., GHOSH G. (2006). The 20S proteasome processes NF-kappaB1 p105 into p50 in a translation-independent manner. *EMBO J.*, 25(9): 1945-1956.
- MORAES M.F., FERRAREZI C., MONT'ALVERNE F.J., GARCIA-CAIRASCO N. (1997). Low-cost automatic activity data recording system. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 30: 1009-1016.
- MORTANI-BARBOSA E.J., FERREIRA Z.S., MARKUS R.P. (2000). Purinergic and noradrenergic cotransmission in the rat pineal gland. *Eur. J. Pharmacol.*, 401(1): 59-62.
- NABEL G., BALTIMORE D. (1987). An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature*, 326(6114): 711-713.
- NELSEN B., HELLMAN L., SEN R. (1988). The NF-kappa B-binding site mediates phorbol ester-inducible transcription in nonlymphoid cells. *Mol. Cell Biol.*, 8(8): 3526-3531.
- NERI SERNERI G.G., BARTOLI V. (1957). Contribution to the study of pineal function. I. Pineal-adrenocortical relations. *Rass. Neurol. Veg.*, 12(2-3): 211-230.
- OETH P.A., PARRY G.C., KUNSCH C., NANTERMET P., ROSEN C.A., MACKMAN N. (1994). Lipopolysaccharide induction of tissue factor gene expression in monocytic cells is mediated by binding of c-Rel/p65 heterodimers to a kappa B-like site. *Mol. Cell Biol.*, 14(6): 3772-3781.
- OKSCHE A. (1965). Survey of the development and comparative morphology of the pineal organ. *Prog. Brain. Res.*, 10: 3-29.
- OLCESE J. (1991). Neuropeptide Y: an endogenous inhibitor of norepinephrine-stimulated melatonin secretion in the rat pineal gland. *J. Neurochem.*, 57(3): 943-947.
- OLCESE J.M., CAO C., MORIS T., MAMCARZ M.B., MAXWELL A., RUNFELD M.J., WANG L., ZHANG C., LIN X., ZHANG G., ARENDASH G.W. (2009). Protection against cognitive deficits and markers of neurodegeneration by long-term oral administration of melatonin in a transgenic model of Alzheimer disease. *J. Pineal Res.*, 47: 82-96.
- O'NEILL L.A., KALTSCHMIDT C. (2007). NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci.*, 20(6): 252-258.

- PANDI-PERUMAL S.R., SRINIVASAN V., MAESTRONI G.J.M., CARDINALI D.P., POEGGELER B., HARDELAND R. (2006). Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J.*, 273(13): 2813–2838.
- PANZER U., STEINMETZ O.M., TURNER J.E., MEYER-SCHWESINGER C., VON RUFFER C., MEYER T.N., ZAHNER G., GÓMEZ-GUERRERO C., SCHMID R.M., HELMCHEN U., MOECKEL G.W., WOLF G., STAHL R.A., THAISS F. (2009). Resolution of renal inflammation: a new role for NF-kappaB1 (p50) in inflammatory kidney diseases. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 297(2): F429-F439.
- PARIS D., PATEL N., QUADROS A., LINAN M., BAKSHI P., AIT-GHEZALA G., MULLAN M. (2007). Inhibition of Abeta production by NF-kappaB inhibitors. *Neurosci. Lett.*, 415(1): 11-16.
- PARK S.W., HUQ M.D., HU X., WEI L.N. (2005). Tyrosine nitration on p65: a novel mechanism to rapidly inactivate nuclear factor-kappaB. *Mol. Cell Proteomics*, 4(3): 300-309.
- PAUL M.A., MILLER J.C., GRAY G.W., LOVE R.J., LIEBERMAN H.R., ARENDT J. (2010). Melatonin treatment for eastward and westward travel preparation. *Psychopharmacology (Berl)*, 208(3): 377-386.
- PEDERSEN E.B., FOX L.M., CASTRO A.J., MCNULTY J.A. (1993). Immunocytochemical and electron-microscopic characterization of macrophage/microglia cells and expression of class II major histocompatibility complex in the pineal gland of the rat. *Cell Tissue Res.*, 272(2): 257-265.
- PEREIRA S.G., OAKLEY F. (2008). Nuclear factor- κ B1: Regulation and function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 40(8): 1425-1430.
- PERELLÓ M., CHACON F., CARDINALI D.P., ESQUIFINO A.I., SPINEDI E. (2006). Effect of social isolation on 24-h pattern of stress hormones and leptin in rats. *Life Sci.*, 78(16): 1857-1862.
- PERKINS N.D. (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8(1): 49-62.
- PÉVET P., BOTHOREL B., SLOTTEN H., SABOUREAU M. (2002). The chronobiotic properties of melatonin. *Cell Tissue Res.*, 309(1): 183-191.
- PHANSUWAN-PUJITO P., MØLLER M., GOVITRAPONG P. (1999). Cholinergic innervation and function in the mammalian pineal gland. *Microsc. Res. Tech.*, 46: 281–295.
- PITTENDRIGH C.S. (1993). Temporal Organization: Reflections of a Darwinian Clock-Watcher. *Annu. Rev. Physiol.*, 55: 17-54.

- PITTENDRIGH C.S., BRUCE V., KAUS P. (1958). On the significance of transients in daily rhythms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 44(9): 965-973.
- PIZZI M., SARNICO I., LANZILLOTTA A., BATTISTIN L., SPANO P. (2009). Post-ischemic brain damage: NF-kappaB dimer heterogeneity as a molecular determinant of neuron vulnerability. *FEBS J.*, 276(1): 27-35.
- POEGGELER B. Melatonin, Aging, and Age-Related Diseases: Perspectives for Prevention, Intervention, and Therapy. *Endocrine*, 27(2): 201–212.
- PONTES G.N., CARDOSO E.C., CARNEIRO-SAMPAIO M.M., MARKUS R.P. (2006). Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) – melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. *J. Pineal Res.*, 41: 136–141.
- QUAY W.B. (1963). Circadian rhythm in rat pineal serotonin and its modifications by estrous cycle and photoperiod. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 14: 473-479.
- QUAY W.B. (1964). Circadian and estrous rhythms in pineal melatonin and 5-hydroxy indole-3-acetic acid. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 115: 710-713.
- REITER R.J. (1980). The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr. Rev.*, 1(2): 109-131.
- REITER R.J. (1993). The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*, 49(8): 654-664.
- REITER R.J. (1995). The pineal gland and melatonin in relation to aging: a summary of the theories and of the data. *Exp. Gerontol.*, 30(3-4): 199-212.
- REITER R.J., CALVO J.R., KARBOWNIK M., QI W., TAN D.X. (2000). Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann. NY Acad. Sci.*, 917: 376-386.
- REUSS S. (1999). Trigeminal innervation of the mammalian pineal gland. *Microsc. Res. Tech.*, 46(4-5): 305-309.
- SAKAI Y., HIRA Y., MATSUSHIMA S. (2001). Central GABAergic innervation of the mammalian pineal gland: a light and electron microscopic immunocytochemical investigation in rodent and nonrodent species. *J. Comp. Neurol.*, 430(1): 72-84.
- SALGADO-DELGADO R., ANGELES-CASTELLANOS M., BUIJS M.R., ESCOBAR C. (2008). Internal desynchronization in a model of night-work by forced activity in rats. *Neuroscience*, 154(3): 922-931.
- SANCHO-BRU P., BATALLER R., COLMENERO J., GASULL X., MORENO M., ARROYO V., BRENNER D.A., GINÈS P. (2006). Norepinephrine induces calcium spikes and proinflammatory actions in human hepatic stellate cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 291: G877–G884.

- SANJABI S., HOFFMANN A., LIOU H.C., BALTIMORE D., SMALE S.T. (2000). Selective requirement for c-Rel during IL-12 P40 gene induction in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(23): 12705-12710.
- 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 H.W., LAEDTKE E., WELLER J.L., KLEIN D.C. (2000). Selective adrenergic/cyclic AMP- dependent switch-off of proteasomal proteolysis alone switches on neural signal transduction: an example from the pineal gland. *J. Neurochem.*, 75(5): 2123-2132.
- SCHON F., ALLEN J.M., YEATS J.C., ALLEN Y.S., BALLESTA J., POLAK J.M., KELLY J.S., BLOOM S.R. (1985). Neuropeptide Y innervation of the rodent pineal gland and cerebral blood vessels. *Neurosci. Lett.*, 57(1): 65-71.
- SEMM P., DEMAINE C., VOLLRATH L. (1981). Electrical responses of pineal cells to melatonin and putative transmitters. Evidence for circadian changes in sensitivity. *Exp. Brain Res.*, 43(3-4): 361-370.
- SEN R., BALTIMORE D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, 46: 705-716.
- SETHI G., SUNG B., AGGARWAL B.B. (2008). Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside. *Exp. Biol. Med.*, 233(1): 21-31.
- SHIDA C.S., CASTRUCCI A.M., LAMY-FREUND M.T. (1994). High melatonin solubility in aqueous medium. *J. Pineal Res.*, 16(4): 198-201.
- SILVA S.O., CARVALHO S.R., XIMENES V.F., OKADA S.S., CAMPA A. (2006). Melatonin and its kynurenin-like oxidation products affect the microbicidal activity of neutrophils. *Microbes Infect.*, 8(2): 420-425.
- SIMONNEAUX V., OUICHOUS A., CRAFT C., PÉVET P. (1994). Presynaptic and postsynaptic effects of neuropeptide Y in the rat pineal gland. *J. Neurochem.*, 62(6): 2464-2471.
- 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.
- SIMONNEAUX V., RODEAU J.L., CALGARI C., PÉVET P. (1999). Neuropeptide Y increases intracellular calcium in rat pinealocytes. *Eur. J. Neurosci.*, 11(2): 725-728.
- SKENE D.J., VIVIEN-ROELS B., SPARKS D.L., HUNSAKER J.C., PÉVET P., RAVID D., SWAAB D.F. (1990). Daily variation in the concentration of melatonin and 5-

- methoxytryptophol in the human pineal gland: effect of age and Alzheimer's disease. *Brain Res.*, 528(1): 170-174.
- SKWARLO-SONTA K. (1996). Functional connections between the pineal gland and immune system. *Acta Neurobiol. Exp.*, 56: 341-357.
- SKWARLO-SONTA K., MAJEWSKI P., MARKOWSKA M., OBLAP R., OLSZANSKA B. (2003). Bidirectional communication between the pineal gland and the immune system. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 81(4): 342-349.
- SLOMINSKI A., FISCHER T.W., ZMIJEWSKI M.A., WORTSMAN J., SEMAK I., ZBYTEK B., SLOMINSKI R.M., TOBIN D.J. (2005). On the Role of Melatonin in Skin Physiology and Pathology. *Endocrine*, 27(2): 137-148.
- SMOAK K.A., CIDLOWSKI J.A. (2004). Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech. Ageing Dev.*, 125(10-11): 697-706.
- SOUSA C.E.C., FERNANDES P.A.C.M., TAMURA E.K., PETRILLI C.L., MARKUS R.P. (2009). TNF induces iNOS expression by pineal cells through a mechanism dependent of NFkB. In: *Anais do 41º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental*, Ribeirão Preto, SP.
- SRINIVASAN V., PANDI-PERUMAL S.R., MAESTRONI G.J., ESQUIFINO A.I., HARDELAND R., CARDINALI D.P. (2005). Role of melatonin in neurodegenerative diseases. *Neurotox. Res.*, 7(4): 293-318.
- STANKOV B., CIMINO M., MARINI P., LUCINI V., FRASCHINI F., CLEMENTI F. (1993). Identification and functional significance of nicotinic cholinergic receptors in the rat pineal gland. *Neurosci. Lett.*, 156(1-2): 131-134.
- STEHLE J.H., FOULKES N.S., MOLINA C.A., SIMONNEAUX V., PÉVET P., SASSONE-CORSI P. (1993). Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature*, 365(6444): 314-320.
- SUN S.C., GANCHI P.A., BALLARD D.W., GREENE W.C. (1993). NF- κ B controls expression of inhibitor I κ B α : evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science*, 259: 1912-1915.
- SUN X-F., ZHANG H. (2007). NFkB and NFKBI polymorphisms in relation to susceptibility of tumour and other diseases. *Histol. Histopathol.*, 22: 1387-1398.
- SUYANG H., PHILLIPS R., DOUGLAS I., GHOSH S. (1996). Role of unphosphorylated, newly synthesized I κ B β in persistent activation of NF- κ B. *Mol. Cell. Biol.*, 16: 5444-5449.
- TAMURA E.K., CECON E., MONTEIRO A.W., SILVA C.L., MARKUS R.P. (2009). Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells. *J. Pineal Res.*, 46: 268-274.

- TECLEMARIAM-MESBAH R., TER HORST G.J., POSTEMA F., WORTEL J., BUIJS R.M. (1999). Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway. *J. Comp. Neurol.*, 406(2): 171-182.
- TERGAONKAR, V. (2006). NF κ B pathway: A good signaling paradigm and therapeutic target. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 38: 1647-1653.
- THANOS P.K., CAVIGELLI S.A., MICHAELIDES M., OLVET D.M., PATEL U., DIEP M.N., VOLKOW N.D. (2009). A non-invasive method for detecting the metabolic stress response in rodents: characterization and disruption of the circadian corticosterone rhythm. *Physiol. Res.*, 58(2): 219-228.
- THOMPSON J.E., PHILLIPS R.J., ERDJUMENT-BROMAGE H., TEMPST P., GHOSH S. (1995). I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. *Cell*, 80(4): 573-582.
- TRAENCKNER E.B., PAHL H.L., HENKEL T., SCHMIDT K.N., WILK S., BAEUERLE P.A. (1995). Phosphorylation of human I κ B- α on serines 32 and 36 controls I κ B- α proteolysis and NF- κ B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J.*, 14(12): 2876-2883.
- TRINH D.V., ZHU N., FARHANG G., KIM B.J., HUXFORD T. (2008). The nuclear I kappaB protein I kappaB zeta specifically binds NF-kappaB p50 homodimers and forms a ternary complex on kappaB DNA. *J. Mol. Biol.*, 379(1): 122-135.
- TSAI S.Y., O'BRIEN T.E., MCNULTY J.A. (2001). Microglia play a role in mediating the effects of cytokines on the structure and function of the rat pineal gland. *Cell Tissue Res.*, 303(3): 423-431.
- TZAVARA E.T., POUILLE Y., DEFER N., HANOUNE J. (1996). Diurnal variation of the adenylyl cyclase type 1 in the rat pineal gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(20): 11208-11212.
- VAHL T.P., ULRICH-LAI Y.M., OSTRANDER M.M., DOLGAS C.M., ELFERS E.E., SEELEY R.J., D'ALESSIO D.A., HERMAN J.P. (2005). Comparative analysis of ACTH and corticosterone sampling methods in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 289(5): E823-E828.
- VALLABHAPURAPU S., KARIN M. (2009). Regulation and function of NF- κ B transcription factors in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.*, 27: 693-733.
- VAUGHAN M.K., REITER R.J. (1971). Transient hypertrophy of the ventral prostate and coagulating glands and accelerated thymic involution following pinealectomy in the mouse. *Tex. Rep. Biol. Med.*, 29(4): 579-586.

- VERMA I.M. (2004). Nuclear factor (NF)-kappaB proteins: therapeutic targets. *Ann. Rheum. Dis.*, 63(Suppl 2): ii57-ii61.
- VERMA I.M., STEVENSON J.K., SCHWARZ E.M., VAN ANTWERP D., MIYAMOTO S. (1995). Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.*, 9(22): 2723-2735.
- VIATOUR P., BENTIRES-ALJ M., CHARIOT A., DEREGOWSKI V., DE LEVAL L., MERVILLE M.P., BOURS V. (2003). NF- kappa B2/p100 induces Bcl-2 expression. *Leukemia*, 17(7): 1349-1356.
- VIATOUR P., MERVILLE M.P., BOURS V., CHARIOT A. (2005). Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem. Sci.*, 30(1): 43-52.
- VIJAYALAXMI, THOMAS C.R.JR, REITER R.J., HERMAN T.S. (2002). Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. *J. Clin. Oncol.*, 20(10): 2575-2601.
- WANG Y.T., CHEN S.L., XU S.Y. (2004). Effect of melatonin on the expression of nuclear factor-kappa B and airway inflammation in asthmatic rats. *Zhonghua Er. Ke. Za. Zhi.*, 42(2): 94-97.
- WESSELLS J., BAER M., YOUNG H.A., CLAUDIO E., BROWN K., SIEBENLIST U., JOHNSON P.F. (2004). BCL-3 and NF-kappaB p50 attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in macrophages. *J. Biol. Chem.*, 279(48): 49995-50003.
- WESSLER I., REINHEIMER T., BITTINGER F., KIRKPATRICK C.J., SCHENDA J., VOLLRATH L. (1997). Day-night rhythm of acetylcholine in the rat pineal gland. *Neurosci. Lett.*, 224(3): 173-176.
- WHITESIDE S.T., ISRAËL A. (1997). IκB proteins: structure, function and regulation. *Semin. Cancer Biol.*, 8: 75-82.
- WOLFE D.E., POTTER L.T., RICHARDSON K.C., AXELROD J. (1962). Localizing tritiated norepinephrine in sympathetic axons by electron microscopic autoradiography. *Science*, 138: 440-442.
- WU Y.H., FEENSTRA M.G., ZHOU J.N., LIU R.Y., TORANO J.S., VAN KAN H.J., FISCHER D.F., RAVID R., SWAAB D.F. (2003). Molecular changes underlying reduced pineal melatonin levels in Alzheimer disease: alterations in preclinical and clinical stages. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 88(12): 5898-5906.
- 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 I κ B ζ .
Nature, 430(6996): 218-222.
- ZHANG B., WANG Z., DING J., PETERSON P., GUNNING W.T., DING H.F. (2006). NF- κ B2 is required for the control of autoimmunity by regulating the development of medullary thymic epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 281: 38617-38624.
- ZHONG H., MAY M.J., JIMI E., GHOSH S. (2002). The phosphorylation status of nuclear NF- κ B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol. Cell.*, 9(3): 625-636.
- ZIEGLER-HEITBROCK L. (2001). The p50-homodimer mechanism in tolerance to LPS. *J. Endotoxin. Res.*, 7(3): 219-222.

X. SÚMULA CURRICULAR

Nome: Erika Cecon

Data de nascimento: 14/06/1984

Local de nascimento: Jundiaí – SP, Brasil.

Endereço eletrônico: erika.cecon@usp.br

Formação Acadêmica/Titulação

2008 – 2010: Mestrado em Fisiologia Geral.

Instituição: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.

Título da dissertação: Fator de transcrição NFkB em glândulas pineais de rato.

Orientadora: Prof^a Dr^a Regina Pekelmann Markus.

Bolsa: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo nº 2007/06420-0, vigência: 09/2008 – 02/2010);

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, vigência: 03/2008 – 08/2008).

2007 – 2010: Licenciatura em Ciências Biológicas

Instituição: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.

2003 – 2007: Bacharel em Ciências Biológicas.

Instituição: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.

Título da iniciação científica: Eixo imune-pineal: citocina pró-inflamatória (TNF α) inibe a produção noturna de melatonina

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Regina Pekelmann Markus.

Bolsa: Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo

(processo nº PRP/USP/2004/010, renovado anualmente; vigência: 2004 - 2007).

Produção Bibliográfica

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

1. Cecon E., Fernandes P.A.C.M., Pinato L., Ferreira Z.S., Markus R.P. (2010). Daily variation of constitutively activated nuclear factor kappa B (NFkB) in rat pineal gland. *Chronobiology International*, 27(1): 52-67.
2. Tamura E.K., Cecon E., Monteiro A.W.A., Silva C.L.M., Markus R.P. (2009). Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells. *Journal of Pineal Research*, 46: 268-274.
3. Silva C.L.M., Tamura E.K., Macedo S.M.D., Cecon E., Alves-Junior L.B., Farsky S.H.P., Ferreira Z.S., Markus R.P. (2007). Melatonin inhibits microvascular endothelial cell nitric oxide production in vivo and in vitro. *British Journal of Pharmacology*, 151: 195-205.
4. Markus R.P., Ferreira Z.S., Fernandes P.A.C.M., Cecon E. (2007). The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *Neuroimmunomodulation*, 14: 126-133.
5. Fernandes P.A.C.M., Cecon E., Markus R.P., Ferreira Z.S. (2006). Effect of TNF- α on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a 'feedback' of the immune response on circadian timing. *Journal of Pineal Research*, 41: 344-350.

ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

1. Cecon E., Flôres D.E.F.L. (2010). Regulação da expressão gênica nas engrenagens do relógio circadiano de mamíferos. *Revista da Biologia*.

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS INTERNACIONAIS

1. Fernandes P.A.C.M., Cecon E., Monteiro A.W.A., Ferreira Z.S., Markus R.P. Differentiated effects of interleukin 6 and interferon gamma on pineal function. In: VII International Symposium of Neuroimmunomodulation. Rio de Janeiro (RJ), Brasil, 2008.
2. Cecon E., Fernandes P.A.C.M., Ferreira Z.S., Markus R.P. Diurnal rhythm of the activation of the nuclear factor kappaB (NFkappaB) in the rat pineal gland. In: FASEB Summer Research Conferences – Melatonin Receptors: Actions and Therapeutics. Snowmass Village (CO), Estados Unidos, 2008.
3. Cecon E., Fernandes P.A.C.M., Ferreira Z.S., Markus R.P. Pineal nuclear factor kappa B (NFkB) daily rhythm is impaired by injury and plays a pivotal role in melatonin production. In: 2nd Iberoamerican Congress of Neuroimmunomodulation. Madrid, Espanha, 2007.
4. Cecon E., Fernandes P.A.C.M., Markus R.P., Ferreira Z.S. Corticosterone Modulates Aa-nat Gene Expression in Rat Pineal Gland. In: I Congresso Iberoamericano de Neuroimunomodulação. Rio de Janeiro (RJ), Brasil, 2005.
5. Fernandes P.A.C.M., Cecon E., Ferreira Z.S., Markus R.P. Effect of inflammation (Bacillus Calmet-Guerin, BCG) and adrenalectomy on the production of N-acetylserotonin and NFkB nuclear translocation of cultured rat pineal gland. In: I Congresso Iberoamericano de Neuroimunomodulação. Rio de Janeiro (RJ), Brasil, 2005.

COMUNICAÇÃO ORAL EM CONGRESSOS

1. Cecon E., Fernandes P.A.C.M., Ferreira Z.S., Markus R.P. Regulação do Fator de Transcrição NFkB em Glândulas Pineais de Rato. In: IX Simpósio Brasileiro de Cronobiologia. Águas de Lindóia (SP), Brasil, 2006.

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS NACIONAIS

1. Cecon E., Fernandes P.A.C.M., Ferreira Z.S., Markus R.P. Pineal nuclear factor kappa B (NFkB) pathway is triggered by nicotinic acetylcholine receptor activation. In: 41º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. Ribeirão Preto (SP), Brasil, 2009.
2. Cecon E., Fernandes P.A.C.M., Ferreira Z.S., Markus R.P. Participação da Via NFkB na Fisiologia de Glândulas Pineais de Rato. In: 15º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP. Ribeirão Preto (SP), Brasil, 2007.
3. Cecon E., Fernandes P.A.C.M., Ferreira Z.S., Markus R.P. Nuclear Factor kappa B (NFkB) Rhythm in Rat Pineal Gland – New Molecular Basis for Organism Timing In: 38º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. Ribeirão Preto (SP), Brasil, 2006.
4. Cecon E., Fernandes P.A.C.M., Ferreira Z.S., Markus R.P. Ritmo Endógeno de Ativação do Fator de Transcrição NFkB em Glândulas Pineais de Rato – Nova Base Molecular para a Temporização do Organismo In: 14º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP. Ribeirão Preto (SP), Brasil, 2006.
5. Fernandes P.A.C.M., Cecon E., Cavalcanti D.M.H., Farsky S.H.P., Ferreira Z.S., Markus R.P. Effect of endogenous adrenal cortical hormones and the mechanism of corticosterone action on the pineal NAS production. In: FESBE - Federação de Sociedades Brasileiras de Biologia Experimental. Águas de Lindóia (SP), Brasil, 2005.
6. Cecon E., Fernandes P.A.C.M., Markus R.P., Ferreira Z.S. Novo Paradigma para o controle da síntese de melatonina em animais inflamados. In: 13º Simpósio de Iniciação Científica da USP. Ribeirão Preto (SP), Brasil, 2005.
7. Cecon E., Markus R.P., Ferreira Z.S. P2Y1 receptor signal transduction in the rat pineal gland - The role of phospholipase C (PLC). In: 36º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. Águas de Lindóia (SP), Brasil, 2004.

PRÊMIOS

1. Menção honrosa, com indicação de apresentação do trabalho na Jornada Nacional de Iniciação Científica da SBPC (Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência) de 2006 (Florianópolis, SC, Brasil). Cecon E., Fernandes P.A.C.M., Markus R.P., Ferreira Z.S. Novo Paradigma para o controle da síntese de melatonina em animais inflamados. In: 13º Simpósio de Iniciação Científica da USP. Ribeirão Preto (SP), Brasil, 2005.

Outras atividades acadêmicas relevantes

ATIVIDADES DIDÁTICAS

- 2009: Estágio supervisionado realizado dentro do Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino (PAE), referente a atividades didáticas junto à disciplina BIF0217 - Fisiologia Animal: Mecanismos e Adaptação da Comunicação e Integração, ministrada no curso de graduação em Ciências Biológicas da USP.
- 2009: Aula ministrada no "VI Curso de Inverno: Tópicos em Fisiologia Comparativa", do Dep. Fisiologia (IB – USP): "Fisiologia e seus aspectos cronobiológicos - Bases moleculares do relógio biológico central". O conteúdo desta aula foi divulgado em material impresso de uso didático.
- 2008 - 2009: Atividade de Educação Ambiental realizada voluntariamente dentro do Projeto Trilha Sub-Aquática: Educação Ambiental em Ecossistemas Marinhos, sob a supervisão do Prof. Dr. Flávio Berchez (IB – USP) durante o mês de janeiro.
- 2008: Aula ministrada no "V Curso de Inverno: Tópicos em Fisiologia Comparativa", do Dep. Fisiologia (IB – USP): "Cronobiologia - Bases Moleculares do Relógio e Osciladores Periféricos". O conteúdo desta aula foi divulgado em material impresso de uso didático.
- 2006: Aula ministrada no "III Curso de Inverno: Tópicos em Fisiologia Comparativa", do Dep. Fisiologia (IB – USP): "Efeitos Biológicos da Melatonina". Cecon E., Tamura E.K.