MARA ANDRADE ARMELIN

CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DE
LPS EM PINEALÓCITOS DE RATO EM
CULTURA

São Paulo

2008

MARA ANDARADE ARMELIN

CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DE
LPS EM PINEALÓCITOS DE RATO EM
CULTURA

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

Orientadora: Zulma F. S. Ferreira
São Paulo

2008

Ficha Catalográfica

Mara Andrade Armelin

Caracterização dos efeitos de LPS
em pinealócitos de rato em cultura

68 p.

Dissertação (Mestrado) - Instituto
de Biociências da Universidade de São
Paulo. Departamento de Fisiologia,
2008.

1. LPS 2. Óxido nítrico 3.
Pinealócitos

I. Universidade de São Paulo. Instituto
de Biociências. Departamento de
Fisiologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

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

***À minha avó Daisy
pelo incentivo e auxílio***

DEDICO

**“Duas estradas se bifurcaram no meio de minha vida,
Ouvi um sábio dizer.
Peguei a estrada menos usada.
E isso fez toda diferença cada noite e cada dia.”**

Larry Norman

Primeiramente agradeço a Deus, princípio de todo saber.

Meus profundos agradecimentos às seguintes pessoas, todas elas especiais em cada etapa de meu desenvolvimento acadêmico. Pessoas essas que me proporcionaram orientação, informação e, em muitos casos, ajudaram a corrigir minhas falhas:

Aos meus pais, que nunca perderam a confiança em mim. A eles, devo o amor e o carinho com que me acompanharam todo o tempo na, às vezes, árdua caminhada para esta conquista.

Às minhas irmãs, Janaína e Nádia, pelo apoio e compreensão e aos meus cunhados Pedro e Júnior pela amizade e confiança.

Formulo igualmente calorosos agradecimentos especiais à minha orientadora, Profa. Dra. Zulma Silva Ferreira que com seu talento e paciência orientou-me pelo nem sempre fácil caminho da pesquisa.

Expresso minha gratidão também aos meus amigos de laboratório Daiane, Erika, Marco Antonio, Renato, Sanseray, que tanto me ajudaram com sua amizade e acompanhamento.

Aos meus amigos Cecília e Pedro, que me auxiliaram muito nos momentos difíceis, sempre ouvindo meus problemas com sábios conselhos.

Aos amigos, Cintia, João, Leo e Natalia e pela amizade e apoio. Aos técnicos Débora e Alex pelo auxílio técnico e amizade.

Mas sobretudo gostaria de reconhecer a enorme contribuição do meu amigo Eduardo que com sua paciência e conhecimento me acompanhou em todo este projeto.

Ao Dr. Hugo Aguirre Armelin agradeço por ter-me encaminhado a este ramo da Ciência antes desconhecido por mim.

Por fim, externo meus profundos agradecimentos à Profa. Dra. Regina P. Markus, pela acolhida no laboratório, pela iniciação na experimentação e por ter compartilhado comigo um pouco de sua sabedoria.

A todos vocês minha eterna gratidão.

e

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS

Lista de Abreviaturas

[Ca²⁺]_i	concentração intracelular de cálcio
1400W	N- (3-(Aminometil)benzil)acetamidina
5-HIAA	ácido 5-hidroxindolacético
5-HTP	5-hidroxitriptofano
AA-NAT	enzima arilalquilamina N-acetiltransferase
ALLN	Acetil-L-Leucil-L-Leucil-L-Norleucinal
AMPc -	monofosfato cíclico de adenosina
BH4	tetrahidrobiopterina
CRE	elementos responsivos a AMPc
CREB	proteína ligadora do elemento responsivo a AMPc
DAB	diaminobenzidina
DAG	diacilglicerol
DAF-FM	4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína
DAR-4M-AM	diaminorodamina acetoxi metil ester
DMEM	Meio essencial de Dulbecco modificado
DMSO	dimetilsufóxido
EDRF	fator de relaxamento dependente do endotélio
eNOS	sintase do óxido nítrico endotelial
EPM	erro padrão da média
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
FMN	flavina mononucleotídeo
GMPc	guanosina monofosfato cíclico
HIOMT	enzima hidroxí-indol-O-metiltransferase
IFN-γ	interferon γ
IKB	proteína inibitória do NF κ B
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
iNOS	sintase do óxido nítrico induzível
IP₃	trifosfato de Inositol
IUPHAR	União Internacional de Farmacologia
iv	intravenoso

LBP	proteína ligante de LPS
L-NAME	NG-nitro-L-arginina metil éster
LPS	lipopolissacarideo
MAO	enzima monoaminoxidase
NAS	N-acetilserotonina
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase
NFkB	Fator Nuclear Kappa B
nNOS	sintase do óxido nítrico neuronal
NO	óxido nítrico
NOS	sintase do óxido nítrico
NSQ	núcleos supraquiasmáticos
PAF	paraformaldeído
PBS	tampão fosfato
PDTC	pirrolidina ditiocarbamato
PKA	proteína quinase A
PLC	fosfolipase C
PVN	núcleo paraventricular do hipotálamo
RU486	mifepristone
TLR4	receptor Toll-like 4
TNF α	fator de necrose tumoral α
TPH1	enzima triptofano hidroxilase 1
TRITC	tetrametil-isotiocianato-rodamina

ÍNDICE

I - INTRODUÇÃO	24
Glândula Pineal	24
Estrutura anatômica	25
Histologia	26
Vascularização	26
Inervação	27
Síntese de melatonina	29
Bases Moleculares da via de transdução na síntese de melatonina	31
Pineal como Alvo de Mediadores da Inflamação	34
Fator de transcrição NFκB.	36
Óxido nítrico (NO)	37
Sínteses de óxido nítrico	38
LPS e resposta inflamatória	39
Eixo imune-pineal	40
 II- OBJETIVOS	 42
 III - MATERIAL E MÉTODOS	 43
Animais	43
Secções de pineais	43
Cultura de pinealócitos	44
Transcriptase Reversa – Ensaio de Reação de Polimerase em cadeia (RT-PCR)	44
Imunohistoquímica do receptor TLR4 em secções de pineal	45
Translocação nuclear de NFκB em pineais de animais tratados ou não com LPS	46
Extrato nuclear proteico	47
Ensaio de deslocamento em gel (“Electromobility shift assay” - EMSA)	47
Imunoreatividade à enzima iNOS	48
Avaliação da concentração de NO intracelular através de microscopia confocal	49
Padronização da técnica – Fluorescência celular intrínseca e escolha do indicador de NO	49
Decurso Temporal da produção de NO em pinealócitos tratados com LPS	50
Curva concentração-efeito de LPS sobre a produção de NO em pinealócitos	50
Estudo com inibidores de isoformas NOS	51
Soluções	51
Análise dos resultados	51

RESULTADOS	53
Detecção constitutiva de Tlr4 e Cd14 na glândula pineal de rato	53
Expressão da proteína do receptor TLR4 na pineal	54
Ativação da translocação nuclear de NFκB por LPS	55
Imunoreatividade à isoforma iNOS em pinealócitos	55
Avaliação da concentração intracelular de NO por microscopia confocal	57
Padronização da técnica - Fluorescência celular intrínseca e escolha do indicador de NO	57
Decurso Temporal da produção de NO em pinealócitos tratados com LPS	58
Curva concentração-efeito de LPS sobre a produção de NO em pinealócitos	60
Estudo com inibidores	61
 DISCUSSÃO	 63
 CONCLUSÕES	 69
 RESUMO	 70
 ABSTRACT	 72
 BIBLIOGRAFIA	 74

I - INTRODUÇÃO

Glândula Pineal

O órgão pineal foi descrito pela primeira vez por Herófilos (335 a.C. - 280 a.C.) um anatomista da Universidade de Alexandria, que atribuiu ao mesmo a função de esfíncter regulador do fluxo de pensamento nos ventrículos cerebrais. Quatrocentos e cinquenta anos mais tarde, Galeno (129-200 d.C.) observou que a estrutura pineal era diferente das estruturas cerebrais mas similar à observada em glândulas endócrinas. Durante a Renascença, Versal considerou o órgão pineal como o centro de um fino sistema vascular. Posteriormente, Descartes ao propor uma explicação fisiológica para o funcionamento do sistema nervoso central, incluiu o órgão pineal neste contexto (revisto por Simonneaux e Ribelayga, 2003).

No final do século XIX foi constatada a semelhança entre a pineal de mamíferos e a epífise de outros vertebrados ao serem considerados aspectos anatômicos, histológicos e embriológicos, incluindo o padrão de inervação. Estes estudos permitiram o estabelecimento o padrão filogenético deste órgão. No começo do século XX relato de pacientes com tumores de pineal e puberdade precoce levou ao estabelecimento de uma relação entre esta glândula e processos reprodutivos, iniciando os estudos da relevância fisiológica mesma (revisto por Simonneaux e Ribelayga, 2003).

No final da década de cinquenta a determinação do hormônio liberado da pineal como a entidade química melatonina (5-metoxi-N-acetiltryptamina) (Lerner *et al.*, 1958) foi o marco inicial para que pineal fosse considerada uma glândula endócrina.

A principal função da glândula pineal é sincronizar os ritmos biológicos ao ciclo de iluminação ambiental através da produção noturna de melatonina. A flutuação diária da síntese e secreção de melatonina (níveis altos na fase de escuro e baixos, ou mesmo não mensuráveis, na fase de claro) sinaliza para o meio interno do organismo se é noite ou dia no ambiente externo. Além disso, a duração da secreção de melatonina acompanha a duração do escuro e, portanto, as estações do ano (Reiter, 1993).

Estrutura anatômica

A glândula pineal é derivada do tubo neural e está localizada cerebralmente entre o mesencéfalo e o diencefalo. Neuroanatomicamente, a pineal é descrita como parte do epitélamo e, portanto, do diencefalo (Møller e Baeres, 2002).

Em mamíferos, o parênquima da glândula pineal consiste de um cordão de células separadas por capilares com amplos espaços perivasculares. Em muitos mamíferos, como por exemplo, no homem, macaco, cavalo, vaca, ovelha e no porco, a pineal exibe uma forma piramidal e é localizada na parte dorsal do tronco encefálico. Contudo, em diversas outras espécies a pineal tem uma estrutura alongada, e em roedores a pineal é subdividida em duas partes: (1) uma pineal superficial localizada na superfície dorsal do cérebro e (2) uma pineal profunda localizada no tronco encefálico. As duas partes são conectadas através de um pedúnculo pineal o qual em muitas espécies contém pinealócitos (Møller e Baeres, 2002).

Histologia

Vários tipos celulares constituem a glândula pineal, sendo, em sua maior parte (aproximadamente 90%) constituída por pinealócitos (Korf, 2000). Outros tipos celulares incluem neuroglia (astrócitos e microglia), fibroblastos, mastócitos, células endoteliais e células nervosas (Møller *et al.*, 2002). Apesar dos pinealócitos de mamíferos não serem fotossensíveis, estes mantêm várias características encontradas em pinealócitos de peixes, anfíbios, répteis e aves, que são células fotorreceptores (Huang *et al.*, 1992; Korf *et al.*, 1992). Entre estas características, pode ser citada a imunoreatividade para rodopsina, antígeno-S, cuja presença é majoritária em glândulas pineais íntegras e nas células dispersas, indicando que a maioria destas células são pinealócitos (Chetsawang *et al.*, 2001).

Os pinealócitos são células neuroendócrinas, responsáveis pela síntese e liberação de melatonina na fase de escuro. A sua morfologia consiste basicamente de um corpo celular (7-12 μm de diâmetro), apresentando um citoplasma claro e grandes núcleos esféricos (Møller *et al.*, 2002).

Vascularização

A glândula pineal de mamíferos é ricamente vascularizada. Em ratos a pineal apresenta o maior fluxo sanguíneo que qualquer outra glândula endócrina, com exceção dos rins (4mL/min/g) (Goldman e Wurtman, 1964). O vasto sistema capilar interno é caracterizado por uma rede de grandes capilares sinusóides no centro da glândula (Reiter, 1981; Duvemoy *et al.*, 2000). Em muitos mamíferos, incluindo roedores e humanos, a glândula pineal é um órgão circumventricular localizado fora da barreira hematoencefálica, o que favorece o livre acesso de substâncias secretadas na corrente circulatória

à pineal, podendo acarretar alterações na atividade da glândula (Møller e Baeres, 2002).

Inervação

Em mamíferos, o ritmo de produção de melatonina depende essencialmente de três fatores interdependentes: um relógio biológico endógeno localizado nos núcleos supraquiasmicos (NSQ) do hipotálamo; o ciclo de iluminação ambiental que sincroniza este relógio e a luz que bloqueia de forma aguda a estimulação da glândula pineal e a produção de melatonina.

A glândula pineal de mamíferos é innervada por fibras de várias origens. A principal via que regula o ritmo de produção de melatonina é uma via multisináptica que inicia-se na retina constituindo assim o trato retino-hipotalâmico. As informações fóticas captadas pela retina, através do fotopigmento melanopsina (Provêncio et al., 2000), chegam aos NSQ via fibras retino-hipotalâmicas e, a partir daí, são transmitidas, seqüencialmente, para a área retro-quiasmática do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo, coluna intermédial lateral da medula espinhal, e gânglio cervical superior de onde partem fibras simpáticas que innervam a pineal (Klein e Moore, 1979) (Figura 1).

A noradrenalina liberada pela estimulação do terminal simpático na pineal no período de escuro, ativa adrenoceptores α_1 e β_1 elevando a concentração intracelular de cálcio $[Ca^{2+}]_i$ e de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), respectivamente (Sugden *et al.*, 1986). A estimulação de adrenoceptores α_1 potencia o efeito induzido pela estimulação de adrenoceptores β_1 , mas não é capaz de elevar sozinha os níveis AMPC (Chik *et al.*, 1988). ATP, co-liberado juntamente com a noradrenalina (Barbosa *et al.*, 2000) atua como co-transmissor tendo seus efeitos mediados através de

receptores purinérgicos P2Y₁ localizados na membrana dos pinealócitos (Ferreira *et al.*, 2001, 2003).

Figura 1 – Principal via de inervação da glândula pineal de mamíferos. A informação luminosa captada pelas células ganglionares da retina são transmitidas aos NSQ através do trato retino-hipotalâmico e destes para o NPV, IML, GCS e pineal. NSQ – núcleos supraquiasmáticos, NPV – núcleo paraventricular, IML – coluna intermédia lateral; GCS – gânglio cervical superior.

Fibras parassimpáticas e fibras peptidérgicas provenientes de estruturas do sistema nervoso central também inervam a pineal. Assim, além da noradrenalina e ATP, outros neurotransmissores e co-transmissores e vários peptídeos já foram localizados na glândula pineal alterando o metabolismo da glândula. Dentre estes agentes podemos citar dopamina, acetilcolina, glutamato, GABA, histamina, óxido nítrico (NO) e vários peptídeos como neuropeptídeo Y (NPY), peptídeo vasoativo intestinal (VIP), peptídeo histidina isoleucina (PHI), peptídeo ativador da adenilciclase pituitária (PACAP), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), substância P, vasopressina e ocitocina (Møller, 2000; revisado por Simonneaux e Ribelayga, 2003).

Síntese de melatonina

Em mamíferos, a síntese e liberação rítmica de melatonina inicia-se a partir do aminoácido triptofano que é capturado da circulação e sob a ação da enzima triptofano hidroxilase 1 (TPH1) é convertido a 5-hidroxitriptofano (5-HTP). O 5-HTP é descarboxilado através da enzima 5-HTP descarboxilase, dando origem à serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) (revisto por Simonneaux e Ribelayga, 2003). A serotonina é então acetilada pela ação da enzima arilalquilamina N- acetiltransferase (AA-NAT) originando a N-acetilserotonina (NAS) (Voisin *et al* 1984). Este é um passo chave da síntese de melatonina. Em seguida a NAS é metilada pela enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) formando a melatonina (Axerold e Weissbach, 1960) (Figura 2). Assim que é produzida a melatonina e também seu precursor NAS são lançadas na corrente sanguínea, o que é facilitado pela grande vascularização e fluxo sanguíneo (Goldman e Wurtman, 1964). A concentração de melatonina, em vários compartimentos do organismo, reflete a atividade de síntese da pineal (Illnerova *et al.*, 1993; Kennaway *et al.*, 1996; Pontes *et al.*, 2006).

Figura 2- Síntese da N-acetilserotonina e melatonina na glândula pineal.

Diariamente, durante a fase escura do fotoperíodo ambiental a serotonina é acetilada pela ação da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT) formando a N-acetilserotonina. Em seguida a N-acetilserotonina é metilada pela enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) formando a melatonina. A noradrenalina liberada por fibras simpáticas que inervam a pineal ativa receptores α_1 e β_1 . A estimulação β_1 -adrenérgica ativa a enzima adeniliciclase (AC) aumentando o acúmulo de AMPc. A estimulação de adrenoreceptores α_1 leva à ativação da fosfolipase C (PLC) gerando diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3) que induz ao aumento da concentração intracelular de cálcio $[Ca^{2+}]_i$ e ativação da proteína quinase C (PKC). A PKC modula positivamente a AC aumentando a produção AMPc. O aumento de AMPc ativa PKA que fosforila o fator de transcrição CREB que então ativa a transcrição do RNAm da enzima AA-NAT. Uma vez transcrita a AA-NAT por ser degradada por ação proteasomal ou então fosforilada pela PKA. AA-NAT fosforilada ela se liga à proteína 14-3-3 que a protege da degradação. ATP, co-liberado com a noradrenalina, atua em receptores $P2Y_1$, compartilhando a sinalização intracelular mediada pela estimulação α_1 adrenérgica na ativação da PLC e aumento da $[Ca^{2+}]_i$.

Bases Moleculares da via de transdução na síntese de melatonina

O aumento no acúmulo de segundos mensageiros induzidos pela noradrenalina leva à ativação de diversas vias de transcrição tais como CREB (do inglês, cyclic AMP regulated element binding) e genes de expressão imediata (“early genes”) entre outros (revisto por Sionneaux e Ribelayga, 2003).

A principal via de transcrição é a que leva a produção de AMPc; este mensageiro liga-se à proteína dependente de AMPc, proteína quinase A (PKA, do inglês *protein kinase A*), ativando-a, constituindo este o principal evento na síntese de melatonina (Klein *et al.*, 1997). A PKA ativada atua de diversas maneiras sobre a via biossintética da melatonina. A fosforilação do fator de transcrição CREB facilita a sua ligação a elementos responsivos à AMPc (CRE) presentes nos promotores de várias enzimas importantes da via biossintética da melatonina, tais como a TPH1 (Besançon *et al.*, 1996, 1997) e a AA-NAT (Baler *et al.*, 1997; Burke *et al.*, 1999) aumentando os níveis intracelulares dos seus respectivos RNAs (Klein *et al.*, 1997) (Figura 2).

O papel da AA-NAT como enzima chave na síntese e liberação de melatonina é conhecido desde a década de 1970 (Klein, 1985). De fato, na maioria das espécies, a atividade da AA-NAT é baixa durante o dia e bastante elevada no período de escuro, independente do animal ser de hábito diurno (Reiter *et al.*, 1984) ou noturno (Klein e Weller, 1970). Em algumas espécies as alterações na transcrição da AA-NAT ocorrem em bases circadianas. Em roedores, onde este mecanismo é mais evidente, a diferença no conteúdo de RNAm da AA-NAT entre o dia e a noite chega a ser superior a 100 vezes (Borjigin *et al.*, 1995; Coon *et al.*, 1995). Como já visto CREB fosforilado liga-se ao CRE, localizado na região promotora do gene da AA-NAT, ativando a sua

transcrição. O aumento do conteúdo de RNAm da AA-NAT é seguido pelo aumento nos níveis protéicos e de atividade da enzima (Klein *et al.*, 1997). A fosforilação da AA-NAT na tirosina 31 favorece a ligação com a proteína chaperona 14-3-3, formando um complexo estável e tornando disponível o sítio ativo da enzima (revisto por Klein *et al.*, 2002). A fosforilação da AA-NAT e sua formação de complexo com a 14-3-3 impedem a sua destruição pelo proteassoma (Gastel *et al.*, 1998) (Figura 2).

Além da bem caracterizada via AMPc-PKA, a noradrenalina também ativa adrenocetores α , sinalizando via fosfolipase C (PLC) e liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares (Maronde *et al.*, 1999) a potenciação dos efeitos da estimulação de adrenocetores β (Sugden *et al.*, 1986). Esta sinalização intracelular é compartilhada pela estimulação de receptores P2Y_1 pelo co-transmissor ATP (Ferreira e Markus, 2001; Ferreira *et al.*, 2003).

Os receptores P2Y_1 são receptores acoplados a proteína G_q ou G_{11} que quando estimulados promovem, na pineal, a ativação da PLC, liberando diacilglicerol e trifosfato de inositol (IP_3). O IP_3 atua em estoques intracelulares de cálcio promovendo aumento da concentração intracelular deste íon. Este aumento resulta em um aumento do pH intracelular e potenciação da síntese de NAS e melatonina (Ferreira *et al.*, 2003; Bomfim *et al.*, 2003; Cecon *et al.*, 2004). Desta forma, o mecanismo final sinalizado pelos receptores α_1 adrenérgicos e P2Y_1 envolve o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e ambos potenciam a síntese de NAS e melatonina. As reações intermediárias após o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e a síntese de NAS também são compartilhadas pelos dois tipos de receptores. Tanto a potenciação α_1 adrenérgica quanto a purinérgica envolvem ativação da enzima sintase de óxido nítrico (NOS) e produção de NO que

culmina na estimulação da enzima guanilciclase e produção de GMPc (Spessert *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1994; Armelin *et al.*, 2005). Outros autores já haviam demonstrado que o doador de NO, nitroprussiato de sódio, induz o acúmulo de GMPc em pinealócitos de rato em cultura (White e Klein, 1993).

Diversos genes de expressão imediata são expressos na pineal após estimulação noradrenérgica. Dentre estes, a expressão de c-fos, c-jun, junB, junD, NGFI-A e Fra-2 têm sido caracterizadas na pineal de ratos (Baler e Klein, 1995; Carter, 1997). As proteínas correspondentes destes genes formam homo ou heterodímeros constituindo assim o fator de transcrição AP-1. A atividade deste fator de transcrição na pineal apresenta uma variação circadiana com maior atividade durante a fase de escuro resultante principalmente dos efeitos de Fra-2 e jun-B (Carter 1994, 1997; Klein *et al.*, 1997; Guillaumond *et al.*, 2000).

A estimulação noradrenérgica induz também a síntese de fatores de transcrição negativos na glândula pineal, sendo um dos mais importantes o ICER (“inducible cAMP early repressor”), que tem um papel inibitório da transcrição do gene *Aa-nat* (Stehle *et al.*, 1993).

No contexto de fatores de transcrição negativos, Link e colaboradores (2004) identificaram em pinealócitos o DREAM (“downstream regulatory element antagonist modulator”). Este é um sensor de Ca^{2+} constitutivo que reprime, de maneira dependente de Ca^{2+} e AMPc, a transcrição de genes que possuem sítio de ligação a DRE na região promotora. Na glândula pineal de ratos, a ligação de DREAM ao DRE apresenta uma variação circadiana com maior afinidade de ligação no período de claro coincidindo com a baixa expressão de *Aa-nat*, *Icer* e *Fra-2*.

Todos estes mecanismos moleculares de controle do metabolismo da glândula pineal evidenciam a capacidade da glândula pineal de integrar diversas mensagens neurais e hormonais através de diferentes vias de transdução. Recentemente novas facetas do mecanismo bioquímico de controle da síntese de melatonina pela pineal de mamíferos têm sido identificadas e aguardam serem integradas ao clássico conceito já descrito. Por exemplo, dados obtidos em pineais de rato em cultura questionam o papel de fatores de transcrição inibitórios como os principais inibidores da expressão da enzima AA-NAT (Ho *et al.*, 2007). Além disso, a fosforilação de histonas H3 (Chick *et al.*, 2006) a atividade de fosfodiesterases na pineal (Kim *et al.*, 2007) e a identificação constitutiva do fator de transcrição NF κ B em pineais de rato (Ferreira *et al.*, 2005; Cecon *et al.*, 2008) sugerem também um papel regulador destas moléculas na síntese de melatonina.

Após sua síntese, tanto a melatonina como seu precursor NAS são liberadas rapidamente na circulação e apresentam uma ação pleiotrópica, atuando em diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos.

Pineal como Alvo de Mediadores da Inflamação

O estudo da participação da pineal na regulação de lesões granulomatosas geradas por processos inflamatórios crônicos permitiu inferir que os glicocorticóides poderiam atuar diretamente sobre os pinealócitos, modulando a produção de melatonina (Markus *et al.*, 2007).

Foi demonstrado que o tamanho da lesão inflamatória crônica induzida por BCG (*Bacillus Calmett-Guerin* – BCG) ou nistatina varia ao longo do dia, sendo o pico máximo observado na fase de escuro. Pinealectomia ou ablação do gânglio cervical superior abolem o ritmo diário da lesão, que é restabelecido

pela administração noturna de melatonina (Lopes *et al.*, 1997). Estes resultados sugerem que a melatonina é o hormônio responsável pelas variações circadianas da lesão inflamatória (Lopes *et al.*, 1997).

Adrenalectomia também é capaz de abolir o ritmo do tamanho da lesão granulomatosa (Lopes *et al.*, 2001). Considerando que melatonina era capaz de restabelecer o ritmo da lesão em animais adrenalectomizados, a exemplo dos animais pinealectomizados, foi sugerido que hormônios da adrenal pudessem controlar a produção de melatonina. Nesta mesma oportunidade foi descrito que adrenalectomia suprimia a produção noturna de melatonina.

Na busca pelas bases moleculares dos efeitos dos hormônios da adrenal sobre a produção de melatonina pela pineal foi identificado o fator de transcrição NF κ B (Ferreira *et al.*, 2005). O tratamento crônico de glândulas em cultura com corticosterona potencia a produção de NAS e melatonina induzida por noradrenalina, efeito este mediado por receptores intracelulares de glicocorticóides através de um mecanismo dependente de NF κ B. Corticosterona potencia a produção de NAS e melatonina induzida por noradrenalina de maneira dependente de concentração. Este efeito foi totalmente bloqueado pelo antagonista de receptores de glicocorticóides mifepristone (RU 486) e mimetizado por agentes farmacológicos que atuam na via do NF κ B, como acetil-L-leucil-L-leucil-L-norleucinal (ALLN) e pirrolidina ditiocarbamato (PDTC, inibidor específico de NF κ B). Além disso, na presença de corticosterona, a translocação nuclear de NF κ B, foi inibida (Ferreira *et al.*, 2005). Além disso, quando a via NF κ B é ativada por TNF α ocorre uma inibição da síntese de melatonina induzida por noradrenalina (Fernandes *et al.*, 2006).

Esses dados permitiram inferir que a pineal tem a capacidade de perceber e responder, através da variação de sua produção hormonal, ao estado fisiopatológico do organismo; numa situação de injúria, a glândula pineal com sua produção hormonal passa a não mais ser controlada pelo ciclo claro-escuro ambiental mas por mediadores circulantes (Markus *et al.*, 2007).

Fator de transcrição NFκB.

O fator de transcrição NFκB é um elemento central nas respostas imunes naturais e adquiridas. Faz parte da família Rel, incluindo as subunidades p50, p52, Rel A (p65), Rel B e c-Rel, sendo o homodímero p50:p50 e o heterodímero p65:p50 os dímeros mais comumente encontrados (Meffert e Baltimore, 2005). Quando inativo o NFκB está associado a uma proteína inibitória, IκB. Essa proteína impede sua translocação para o núcleo e sua associação com o DNA. Durante sua ativação a proteína IκB é fosforilada e em seguida, degradada nos proteassomas. Com isso, o NFκB se desloca para o núcleo ativando genes alvos. Esta via é ativada por agentes antigênicos como lipopolissacarídeos de bactérias Gram negativas (LPS) e citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral α (TNF α) e interleucina-1 (IL1) e inibida por agentes antiinflamatórios, como os glicocorticóides (McKay e Cidlowski, 1999).

Esta via de sinalização leva à transcrição de mensagens responsáveis pela síntese de enzimas e receptores que participam da resposta inflamatória. Entre estas está a via da sintase induzida de NO (iNOS), que leva à produção de altas quantidades de NO.

Glândulas pineais de rato em cultura apresentam NF κ B constitutivamente ativado (Ferreira *et al.*, 2005), sendo que no núcleo é detectado o dímero p50-p50 (Cecon *et al.*, 2008). A inibição desta via por glicocorticóides leva a uma potenciação da transcrição do gene Aa-nat, enquanto a ativação de NF κ B inibe a transcrição deste genes.

Esta via parece ter relevância também em humanos, visto que em parturientes com mastite, uma inflamação não infecciosa caracterizada por altas concentrações circulantes de TNF α , ocorre uma supressão da produção noturna de melatonina (Pontes *et al.*, 2006). Vale citar que há uma correlação inversa entre níveis circulantes de TNF α e melatonina.

Óxido nítrico (NO)

O NO é um gás, inorgânico, incolor, altamente lipofílico que exerce a função de mediador intracelular e extracelular (Moncada *et al.*, 1991). Uma das funções fisiológicas do NO foi inicialmente descoberta em 1980, quando, Furchgott e Zawadzki demonstraram em aortas de coelhos “in vitro” que a acetilcolina promovia uma vasodilatação devido à liberação de um fator de relaxamento derivado do endotélio, denominado inicialmente como EDRF (do inglês, endothelium-derived relaxing factor), e posteriormente caracterizado como NO (Palmer *et al.*, 1987).

Atualmente, sabe-se que o NO apresenta várias funções fisiológicas, como regulação da pressão sanguínea, adesão de plaquetas e agregação dos neutrófilos (Moncada *et al.*, 1991). Além disso, é fundamental na sinalização do sistema nervoso e desempenha papel importante na defesa do hospedeiro (Alderton *et al.*, 2001; Bogdan, 2001; Moncada e Higgs, 1991).

Sintases de óxido nítrico

O NO é gerado do aminoácido L-arginina por uma família de enzimas denominadas NO sintase (NOS). No processo de síntese, a enzima NOS converte o aminoácido L-arginina em NO e citrulina por um mecanismo que depende da participação dos cofatores NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase), FMN, (mononucleotídeo de flavina), FAD (dinucleotídeo de flavina e adenina) e H4B (tetrahidrobiopteridina) (Alderton *et al.*, 2001; Mayer e Hemmens 1997; Stuehr *et al.*, 1991). Existem três isoformas conhecidas da NOS: a induzível (iNOS ou NOS-II), que tem sua produção induzida e aumentada na inflamação por citocinas e outros mediadores e duas isoformas constitutivas, a eNOS (endotelial ou NOS-III) e a nNOS (neuronal ou NOS-I). A regulação e ativação da eNOS e nNOS são dependentes da concentração intracelular de cálcio ($[Ca^{2+}]_i$) e da formação do complexo cálcio-calmodulina (Koyama *et al.*, 2002, Pittner *et al.*, 2003, Yi, 2002).

Na glândula pineal a isoforma constitutiva de NOS foi detectada sendo sua atividade controlada por aumento da $[Ca^{2+}]_i$. A ativação de receptores que aumentam $[Ca^{2+}]_i$, tais como adrenoceptor α_1 e receptor purinérgico P2Y₁ induzem a ativação de NOS constitutiva levando à produção de NO e aumento da concentração intracelular de GMPc (Lin *et al.*, 1994, Armelin *et al.*, 2005).

A iNOS é expressa em vários tipos de células, incluindo macrófagos, neutrófilos, células endoteliais e células do músculo liso, e possui um papel fundamental no processo inflamatório, sendo responsável por uma alta produção de óxido nítrico na inflamação. Na pineal de ratos a iNOS não foi detectada em animais controle (Jacobs *et al.*, 1999) sendo observada em resposta à hipóxia (Kaur *et al.*, 2007). A expressão da iNOS envolve várias vias

de transdução de sinal, como ativação de tirosina quinase e translocação do fator de transcrição NF κ B (fator nuclear κ B) (Moncada *et al.*, 1991). Esta expressão é independente de cálcio e pode ser desencadeada por citocinas como interferon γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral α (TNF α) e interleucina 1 β (IL-1 β) e também induzida por LPS (Heba *et al.*, 2001).

Apesar de ter sido demonstrado que doadores de NO levam à inibição da síntese de melatonina (Maronde *et al.*, 1995), NO produzido pela enzima constitutiva não participa da supressão da síntese de melatonina, visto que este fenômeno não é mimetizado por GMPc (Maronde *et al.*, 1995). Dessa forma, há a possibilidade deste NO ser proveniente da ativação da iNOS e participar da sinalização de moléculas que medeiam processos fisiopatológicos.

LPS e resposta inflamatória

LPS é um constituinte da membrana de bactérias gram-negativas e potente indutor de inflamação sistêmica e local (Chow *et al.* 1999). Sua estrutura é composta por uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica que exercem efeitos diferentes: a parte hidrofóbica ou antígeno A é responsável pelos efeitos endotóxicos, enquanto a parte hidrofílica ou cadeia O específica é responsável pela maior ação antigênica do LPS (Raetz e Whitfield, 2002).

O LPS desencadeia suas ações imunoestimulatórias através da ligação em receptores Toll-like 4 (TLR4) (Gay e Gangloff, 2007). Desde sua descoberta, no final da década de 1990, os receptores Toll-like têm sido identificados como sensores primários de infecções microbianas e permitido avanços significativos na compreensão dos mecanismos envolvidos na imunidade inata e adquirida. TLR4 é um receptor de membrana com um

domínio extracelular rico em resíduos de leucine e um domínio citoplasmático Toll. Este receptor detecta bactérias gram-negativas através do reconhecimento da camada lipídica A de LPS (Poltorak *et al.*, 1998; Hoshino *et al.*, 1999). O reconhecimento de LPS é mediado por quatro moléculas: proteína ligadora de LPS (LBP), CD14, proteína mielóide diferenciadora 2 (MD2) e TLR4 (Guha and Mackman, 2001). LBP funciona como uma proteína de trânsito catalizando a transferência de LPS da membrana externa de bactérias gram-negativas ao CD14 (Tobias *et al.*, 1995). CD14 tem um papel no carregamento de LPS ao complexo TLR4/MD2. MD2, uma glicoproteína que é essencial para a resposta inata ao LPS, se liga ao LPS e ao domínio extracelular do TLR4 (Shimazu *et al.* 1999).

Eixo imune-pineal

O estudo do papel da pineal em processos inflamatórios, sugere a existência de um eixo imune-pineal com interferência direta dos moduladores da resposta inflamatória sobre a pineal (Markus *et al.*, 2007).

Em indivíduos saudáveis, o pico noturno de melatonina produzida pela pineal traduz a informação fotoperiódica ambiental ao sistema de defesa aumentando a produção noturna de IL-2 pelos linfócitos T e diminuindo a transmigração linfocitária (Pontes *et al.*, 2006). Em algumas situações patológicas, a função da pineal é suprimida e o organismo deixa de ser informado da existência do escuro; a citocina pró-inflamatória $TNF\alpha$, produzida pelas células residentes no local da injúria, suprime a expressão da enzima AA-NAT e, conseqüentemente, a síntese de melatonina pela pineal (Fernandes *et al.*, 2006). A ausência do pico noturno de melatonina permite a transmigração de leucócitos (Lotufo *et al.*, 2001) os quais iniciam uma produção local de

melatonina que tem um papel como agente anti-inflamatório (Pontes *et al.*, 2006). Portanto, a melatonina, que é uma indolamina com várias funções, passa a ser produzida no local de injúria, exercendo uma ação parácrina (Pontes *et al.*, 2006). Posteriormente, foi demonstrado que o retorno a condições de higiene, ou uma compensação entre mediadores pró- e antiinflamatórios, restauram a produção noturna de melatonina (Fernandes *et al.*, 2006). Em resumo a melatonina, produzida pela pineal na fase de escuro, impede a montagem de uma resposta inflamatória enquanto que a melatonina, produzida no local da injúria por células imuno competentes, exerce um efeito anti-inflamatório local. Esta transição entre a produção de melatonina endócrina e parácrina contribui para a montagem e para o término de uma resposta inflamatória caracterizando um eixo imune-pineal (Markus *et al.*, 2007).

Como a pineal é um órgão localizado fora da barreira hematoencefálica (Møller e Baeres, 2002) este é atingido pelas moléculas circulantes e, recentemente foi demonstrado que LPS liga-se ao endotélio do mesmo (Jiang-Shieh *et al.*, 2005). Tendo em vista o papel da pineal em processo de neuroimunomodulação, o objetivo deste trabalho foi caracterizar os efeitos de LPS em pinealócitos de rato em cultura.

II- OBJETIVOS

Avaliar os efeitos de lipopolissacarídeo (LPS) de bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* sobre a glândula pineal. Será realizada a caracterização das vias de sinalização envolvidas após ativação de receptores TLR4 por LPS em pinealócitos de ratos em cultura.

Estratégia:

1. Detecção constitutiva do RNAm de *Tlr4* e *Cd14* na glândula pineal de rato
2. Análise da expressão da proteína do receptor TLR4 na pineal.
3. Determinação da translocação do NF κ B após estimulação com LPS “*in vivo*”.
4. Estudos funcionais após estimulação com LPS “*in vitro*”
Expressão da isoforma iNOS .
Produção de NO.

III – MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados ratos fêmeas da linhagem Wistar, com idade entre 30 a 45 dias, obtidos do biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno mantidas em sala com temperatura e umidade controladas. O ciclo claro-escuro empregado foi 12:12 h. Ração e água foram fornecidas ad libitum durante todo procedimento experimental. Todos os procedimentos seguiram as recomendações e os princípios éticos de experimentação animal, cujo protocolo experimental foi devidamente aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais Vertebrados em Experimentação (CEA) do Instituto de Biociências da USP (protocolo nº064/2008) (Anexo 1).

Secções de pineais

Os animais foram anestesiados profundamente com pentobarbital sódico (Hypnol 3%, Fontoveter) e submetidos a uma perfusão transcardíaca de solução salina (NaCl 0,9%) seguida de solução fixadora contendo paraformaldeído (PAF, 4%) e ácido pícrico saturado diluídos em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4). As pineais foram removidas e pós-fixadas nesta mesma solução por 90 min sendo a seguir mantidas em solução de sacarose (10%) dissolvida em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) por 48 hs, sendo renovada a cada 24 hs. Após este período as pineais foram congeladas em isopentano a -35°C em gelo seco e embebidas em meio de congelamento Tissue Tek (procedência). Secções seriadas com espessura de 8 µm foram obtidas em criostato (Leica, modelo CM3050, Alemanha) à temperatura de -25°C as quais

foram montadas em lâminas silanizadas (Star Frost, Waldemar Knittel, Alemanha). As lâminas foram utilizadas nos ensaios de imunohistoquímica.

Cultura de pinealócitos

As glândulas pineais foram retiradas de animais sacrificados por decapitação. Os pinealócitos foram obtidos por dissociação enzimática com tripsina (0,25%, 37° C, 15 min), seguida por dispersão mecânica realizada na presença de 0,3% de inibidor de tripsina (Ferreira et al., 2003). As células foram ressuspensas em meio DMEM acrescido de soro fetal bovino (10%) e gentamicina (40 mg/L). A viabilidade das células foi estimada pela técnica de exclusão por azul de Trypan.

Transcriptase Reversa - Ensaio de Reação de Polimerase em cadeia (RT-PCR)

As glândulas pineais foram retiradas de animais sacrificados por decapitação às 10 h (4 horas depois do acender das luzes). O RNA total foi extraído de pineais através de Trizol, de acordo com as especificações do fabricante, e estocados a -75°C até o momento do uso. A amplificação foi realizada usando o sistema ThermoScript™ RT-PCR (Invitrogen) para a síntese de fita simples de cDNA. Através da utilização de primers randômicos, os cDNAs foram sintetizados a partir do RNAm total (0,5 µg) por 1h a 55°C em um volume de reação de 20 µL. Os cDNAs resultantes (2 µL) foram amplificados por PCR em um volume final de 25 µL contendo 20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTPs, 2 U Taq polymerase (Invitrogen) e 0,4 µM de primers específicos utilizados para amplificar sequências nucleotídicas específicas presentes nos genes transcritos de *Tlr4*, *Cd14* e *Gapdh*. A

sequencia dos primers, o correspondente número de bases, o tamanho dos produtos de PCR e o número de acesso no GenBank foram os seguintes: *Tlr4* sense, 5'- TTGAAGACAAGGCATGGCATGC-3' e *Tlr4* antisense, 5' TCTCCCAAGATCAACCGATG-3' (502 bp; NM_019178); *Cd14* sense, 5'- GATCTGTCTGACAACCCTGAGT-3' e *Cd14* antisense, 5'- GTGCTCCAGCCCAGTGAAAGA-3' (267 bp; NM_021744); *Gapdh* sense, 5'- CGGGAAGCTTGTGATCAATGG-3', *Gapdh* antisense 5'- GGCAGTGCCATGGACTG-3' (380 bp; MN_017008). Estas sequencias foram escolhidas de forma a evitar combinação com DNA genômico (Rodrigues et al., 2008).

Análises semi-quantitativas foram utilizadas para determinar a expressão de cada gene alvo específico. Para cada par de primers o número de ciclos para amplificar cada cDNA na parte linear foi determinado sob as seguintes condições de PCR: um ciclo inicial de 2 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C e 1 min a 72°C, e uma extensão final de 3 min a 72°C. A amplificação do gene *Gapdh* foi utilizada como controle interno. Alíquotas de amostras de DNA (20 µL) foram carregadas em gel de agarose (1,5%) contendo brometo de etídeo (0,5 µg/µL). Os produtos de PCR foram visualizados com iluminação fluorescente e fotografados.

Imunohistoquímica do receptor TLR4 em secções de pineal

A imunoreatividade dos receptores TLR4 foi realizada em secções de pineais segundo protocolo descrito anteriormente (Rodrigues et al., 2008). Após 5 min de incubação com glicina 0,1 M em PBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.03 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, pH 7.4) as secções foram

incubadas com uma solução de bloqueio (3% albumin e 0.01% saponin em PBS) por 1 h à temperatura ambiente. A seguir as secções foram incubadas com avidina D e biotina (Blocking Kit, Vector, SP-2001) para o bloqueio da biotina endógena. Após estes procedimentos as secções foram incubadas na presença do anticorpo primário contra TLR4 (sc- 12511, Santa Cruz Biotechnology, USA). Este foi diluído 1/25 em solução de bloqueio e a incubação realizada a 4°C por 12-18 hs. Após uma série de 6 lavagens por 5 min com solução de bloqueio, as secções foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado à biotina (sc-2042, Santa Cruz Biotechnology, USA; diluição 1/200 em solução de bloqueio, 1 h, temperatura ambiente). O sistema de marcação avidina-biotina (Vectastin Vector, PK-6105, Vector, EUA) foi utilizado segundo o protocolo do fabricante para localizar o anticorpo biotinilado. A atividade peroxidase foi revelada utilizando PBS contendo 3, 3'-diaminobenzidine (DAB, 0.05%) e peróxido de hidrogênio (0.01%) por 3 min à temperatura ambiente. Após contramarcagem com azul de metileno (0,01%) as secções foram montadas com meio de montagem (permount) e analisadas em microscópio Nikon E800 (Nikon, Melville, NY, USA). Experimentos controle foram realizados na ausência do anticorpo primário. As imagens foram digitalizadas através da camera digital CoolSNAP-Pro CCD e do programa Image-Pro Express Software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

Translocação nuclear de NFκB em pineais de animais tratados ou não com LPS

O estímulo endotoxêmico foi realizado com LPS (1 mg/Kg; i.v.; 2h) obtido de *Escherichia coli* (Sigma, USA). Os animais controle (salina) e tratados com LPS foram sacrificados por decapitação e as pineais utilizadas no preparo de

extratos nucleares para a análise de deslocamento em gel (Ferreira *et al.*, 2005).

Extrato nuclear proteico

As pineais foram homogenizadas em 100 µl de tampão de lise (HEPES, pH 7,5, 10 mM; KCl 10 mM; EDTA 0,1 mM; glicerol 10%, ditioneitol (DTT, 1 mM), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF, 0,1 mM), 7 µl de NP-40 10% e mantidas em gelo por 15 min. A seguir estas amostras foram levadas ao vórtex por 10 s e centrifugadas (12.000 g, 1 min, 4° C). O pellet resultante foi lavado com 50 µl do tampão de lise e centrifugado (12000 g, 1 min, 4° C). O pellet nuclear foi ressuspenso em 20 µl do tampão de extrato nuclear (HEPES, pH 7,5, 10 mM; KCl 0,5 M; EDTA 1 mM; glicerol 10%, DTT 1 mM, PMSF 0,1 mM. Os tubos foram mantidos por 15 min a 4°C com agitação e então centrifugados (20.000 g, 5 min, 4°C) para separação do sobrenadante (extrato nuclear), aliqotado e estocado a -70°C até o ensaio. O conteúdo de proteína foi determinado pelo método de Bradford.

Ensaio de deslocamento em gel (“Electromobility shift assay” – EMSA)

O oligonucleotídeo de dupla-fita consenso para NFκB (5'AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') foi marcado nas extremidades com [γ 32P]ATP na presença da T4 polinucleotídeo quinase por 10 min a 37°C, seguida da remoção dos nucleotídeos não incorporados através da coluna Sefadex G-25 (Amersham). Os extratos nucleares de pinealócitos (4 µg) foram incubados com tampão do ensaio (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 1 mM MgCl₂; 50 mM NaCl; 0,5 mM DTT; 0,5 mM EDTA; 4% glicerol e 1 µg de poli(dIdC) por 20

min em temperatura ambiente, em volume final de 20 μ L. Posteriormente, cada amostra foi incubada por 30 min à temperatura ambiente com $\pm$ 30.000 cpm do oligonucleotídeo [^{32} P]NF κ B. Os complexos proteína-DNA foram avaliados em gel não-desnaturante 6% de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1) em 0,25 x de tampão Tris-borato/EDTA (TBE) a 150 V por 1h e 30 min. Após a secagem o gel foi exposto ao filme XAR-5 (Kodak, USA) por 24 – 48 hs a -70°C . A quantificação das bandas (densitometria) obtidas no filme radiográfico após exposição ao gel radioativo é feita por meio do programa Image J (NIH, USA).

A mobilidade em gel consiste na reação de ligação de proteínas de extrato nuclear com uma seqüência de nucleotídeos específica para o fator de transcrição marcada com ^{32} P pela enzima T $_4$ polinucleotídeo quinase. Quando o meio reacional é submetido a uma eletroforese em gel de poliacrilamida, a sonda livre (oligonucleotídeo) migra mais que a sonda ligada ao fator nuclear (banda deslocada).

Imunoreatividade à enzima iNOS

Análises de imunofluorescência para a isoforma iNOS foram realizadas em pinealócitos dispersos. Os pinealócitos foram semeados em lâminas de vidro previamente recobertas com poli-lisina (10^5 células; 100 μ L) e mantidas por 18 horas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% CO $_2$. Após duas séries de lavagem com PBS, os pinealócitos foram fixados com PAF a 4% (1 min) e metanol à -20°C. A seguir as células foram lavadas com PBS contendo 0,2% de Triton X100 (3 vezes). Os pinealócitos foram então incubados com o anticorpo contra a isoforma iNOS conjugado à tetrametil-isotiocianato-rodamina (TRITC, sc-651, Santa Cruz Biotechnology, USA), diluído 1/50 em PBS/0,2%

Triton, 18 hs, 4°C) sendo a seguir lavados por 3 vezes com PBS/Triton. Estas lâminas foram então cobertas lamínula de vidro em meio de montagem contendo DAPI (Vector, USA) e analisadas em microscópio Zeiss acoplado à câmara fotográfica digital para aquisição das imagens.

Avaliação da concentração de NO intracelular através de microscopia confocal

Padronização da técnica – Fluorescência celular intrínseca e escolha do indicador de NO

Pinealócitos dispersos foram semeados em lamínulas de vidro previamente recobertas com poli-lisina em placas próprias para microscopia confocal (10^5 células; 100 μ L) e mantidas por 18 horas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% CO₂. Após esse período as células foram lavadas com uma solução contendo: 120 mM NaCl; 5 mM KCl; 1,2 mM KH₂PO₄; 25 mM NaHCO₃; 13 mM glicose e, carregadas com os indicadores de NO 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína (DAF-FM, Molecular Probes, 5 μ M, 50 min, 37°C, 5% CO₂) ou (DAR-4M-AM, Alexis Biochemicals, 5 μ M, 30 min, 37°C, 5% CO₂).

A fluorescência emitida por cada célula foi analisada por microscopia confocal e quantificada através dos programas LSM 510 (Zeiss Confocal Software, Germany) e ImageJ (NIH, USA). Os registros foram obtidos com a objetiva de imersão em óleo (40X), sendo utilizado um laser argônio para excitação do fluoróforo no comprimento de onda apropriado: DAF-FM (λ excitação 495 nm/ λ emissão 515 nm – verde); DAR-4M-AM (λ excitação 550 nm/ λ emissão 580 nm – vermelho).

Níveis intracelulares basais da produção de NO em pinealócitos não estimulados carregados com DAR-4M-AM foram tomados como controle. O doador de NO, nitroprussiato de sódio (SNP; 10 mM; Sigma, USA) foi utilizado como controle positivo para verificar a especificidade da detecção de NO pelo marcador DAR-4M-AM.

Decurso Temporal da produção de NO em pinealócitos tratados com LPS

Os pinealócitos foram carregados com DAR-4M-AM (5 μ M, 30 min, 37°C, 5% CO₂) e incubados na presença de LPS (1 μ g/mL). A fluorescência celular foi observada por 2 horas no microscópio confocal sob filtros λ excitação 550 nm/ λ emissão 580 nm – vermelho.

Em outro grupo de experimentos, após o carregamento dos pinealócitos com DAR-4M-AM (5 μ M, 30 min, 37°C, 5% CO₂), estes foram incubados com salina (basal) ou na presença de LPS (1 μ g/mL, 37°C, 5% CO₂) por diferentes tempos: 1h30, 2h, 4h e 6h, sendo então analisada a fluorescência celular no microscópio confocal.

Curva concentração-efeito de LPS sobre a produção de NO em pinealócitos

Os pinealócitos carregados com DAR-4M-AM (5 μ M, 30 min, 37°C, 5% CO₂) foram estimulados com concentrações crescentes de LPS (0,1 a 10 μ g/mL; 37°C, 5% CO₂). A fluorescência celular foi observada após 2 horas de incubação no microscópio confocal sob filtros λ excitação 550 nm/ λ emissão 580 nm – vermelho.

Estudo com inibidores de isoformas NOS

Pinealócitos em cultura foram estimulados com LPS (1 µg/mL, 2h, 37°C, 5% CO₂) na presença e na ausência do inibidor não seletivo de isoformas de NOS, NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 0,1 mM, 30 min antes), ou do inibidor seletivo da iNOS, N-3-aminometil-benzil-acetamidina (1400W, 1 µM, 30 min antes) e carregados com DAR-4M-AM (5 µM, 30 min finais, 37°C, 5% CO₂). A fluorescência celular foi observada ao final de 2 horas de incubação no microscópio confocal sob filtros λ excitação 550 nm/ λ emissão 580 nm – vermelho.

Soluções

Todos os reagentes utilizados apresentavam grau de pureza analítico. DAF-FM foi estocado na concentração de 1 mM em dimetilsufóxido (DMSO) 100%. DAR-4M-AM (5 µM) foi diluído em PBS. A solução estoque de LPS foi preparada em PBS (1 mg/mL) e diluída em salina no momento do uso. Soluções estoque de L-NAME (Sigma, USA; 50 mg/mL) e 1400W (EMD Calbiochem; 1 mM) foram preparadas em água e diluídas em salina para as concentrações desejadas.

Análise dos resultados

Os dados estão apresentados como média $\pm$ epm em unidades arbitrárias para a ligação NF κ B-DNA ou porcentagem de fluorescência basal para a medida da produção de NO. Os dados foram analisados por estatística paramétrica. As médias de dois grupos foram comparadas por teste “t” de student, enquanto mais do que duas médias por análise de variância seguida

de teste de Newman Keuls. Os dados foram considerados significativamente diferentes para valores $p < 0,05$.

RESULTADOS

*Detecção constitutiva de *Tlr4* e *Cd14* na glândula pineal de rato*

A análise semi-quantitativa através de RT-PCR permitiu a detecção dos transcritos de *Tlr4* e *Cd14* na glândula pineal de ratos sacrificados às 10 horas da manhã (4 horas após o acender das luzes) que não foram submetidos a tratamentos prévios. Nestas condições foi possível detectar RNAm para *Tlr4* e *Cd14* em amostras provenientes de dois animais testados (figura 3).

Figura 3 – Transcrição dos genes *Tlr4* e *Cd14* em glândulas pineais de ratos controle. Imagem invertida representativa de fotografia de gel de agarose mostrando a detecção de níveis de RNAm que se ligam aos primers para *Tlr4*, *Cd14* e *Gapdh* (padrão interno) através de análise de RT-PCR semi-quantitativa usando RNA total extraído de pineais conforme descrito em Materiais e Métodos.

Expressão da proteína do receptor TLR4 na pineal

A análise imunohistoquímica de secções de pineal revelou a presença do receptor TLR4 na glândula pineal de rato (figura 4). A contra-coloração com azul de metileno permitiu identificar a presença de pinealócitos bem como de astrócitos, que segundo Heidbuchel e Vollrath (1983) apresentam núcleos menores e mais corados. A imunoreatividade do receptor TLR4 foi detectada em praticamente todas as células consideradas como pinealócitos (Figura 4A). Estas proteínas com imunoreatividade para TLR4 foram observadas tanto no citoplasma quanto no núcleo. Toda marcação foi abolida quando as secções foram incubadas na ausência do anticorpo primário (Figura 4B).

Figura 4- Demonstração imunohistoquímica da proteína do receptor TLR4 em secções de pineal obtidas de animais controle. A - Padrão de imunomarcação difusa no citoplasma e no núcleo. B: Controle negativo realizado na ausência de anticorpo. Fotomicrografias digitais representativas de secções de pineais obtidas de 4 animais. Seta preta: marcação nuclear TLR4-positiva. Seta vermelha maior: pinealócito. Seta vermelha menor: astrócitos. Escala: 30 μ m.

Ativação da translocação nuclear de NFκB por LPS

A técnica do deslocamento em gel foi utilizada para avaliar a translocação nuclear de NFκB em extratos nucleares obtidos de glândulas pineais de animais tratados ou não com LPS (1 mg/Kg, i.v., 2 horas). Foi observado um aumento significativo da translocação nuclear de NFκB nos animais tratados com LPS (figura 5).

Figura 5 - Ativação de NFκB induzida pela estimulação com LPS “*in vivo*”. Análise densitométrica da ligação NFκB-DNA detectada por EMSA em extratos nucleares de pineais de animais controle (salina 2h) ou LPS (1 mg/Kg, i.v., 2h). Os dados representam a média ± epm de 6 animais por grupo. UA: unidades arbitrárias. * $p < 0,05$ vs salina.

Imunoreatividade à isoforma iNOS em pinealócitos

Experimentos de imunohistoquímica foram realizados para avaliar a capacidade de pinealócitos ativados com LPS aumentarem a expressão da proteína iNOS. Para tanto utilizou-se a marcação com anticorpo específico conjugado à rodamina. Os pinealócitos ativados com LPS apresentaram um importante aumento na fluorescência, indicando maior capacidade de se

ligar aos anticorpos específicos para iNOS. A figura 6 ilustra as imagens de transmissão e de fluorescência em pinealócitos estimulados ou não com LPS (1 μ g/mL, 2 h). Neste tempo pode ser observado um grande aumento da fluorescência e também o aparecimento de células com aparência de apoptose.

Figura 6 - Marcação imunofluorescente de iNOS em pinealócitos fixados em PAF 4% / metanol e estimulados com LPS. Após 18 h em cultura os pinealócitos foram estimulados na presença ou na ausência de LPS (1 μ g/ml, 2h, 37°C, 5%CO₂), fixados em PAF 4% / metanol e incubados com o anticorpo contra a isoforma iNOS conjugado à rodamina (sc-651 TRITC, diluição 1/50, 18 hs) conforme descrito em Materiais e Métodos. A fluorescência celular foi observada no microscópio confocal sob filtros λ excitação 550 nm/ λ emissão 580 nm - vermelho. Imagens de transmissão e de fluorescência representativas de pinealócitos controle não estimulados (A - C) e pinealócitos estimulados com LPS (D - F) conforme descrito. Escala: 25 μ m.

Avaliação da concentração intracelular de NO por microscopia confocal
Padronização da técnica - Fluorescência celular intrínseca e escolha do indicador de NO

Após 18 hs em cultura os pinealócitos dispersos foram visualizados no microscópio confocal para análise do nível de fluorescência celular intrínseca no espectro verde, característico do indicador de NO DAF-FM ($\lambda_{\text{excitação}}$ 495 nm, $\lambda_{\text{emissão}}$ 515 nm). Sob este espectro de excitação/emissão, os pinealócitos apresentaram-se intrinsecamente fluorescentes devido à presença dos derivados indólicos nestas células (Figura 7). Optou-se então pela utilização de outro indicador de NO, DAR-4M-AM, que apresenta um espectro de excitação/emissão mais distante da faixa utilizada para os compostos indólicos possibilitando melhor resolução à medida fluorimétrica.

Figura 7- Imagens de fluorescência de pinealócitos em cultura. Os pinealócitos foram estimulados com LPS (1µg/mL; 2h) e carregados com marcador DAF-FM (30 min). A fluorescência celular foi observada no microscópio confocal sob filtros $\lambda_{\text{excitação}}$ 495 nm/ $\lambda_{\text{emissão}}$ 515 nm – verde. Escala: 25 µm.

Decurso Temporal da produção de NO em pinealócitos tratados com LPS

Para a curva de tempo os pinealócitos foram estimulados com LPS (1µg/mL). A concentração utilizada foi baseada na literatura e as células foram analisadas no microscópio confocal durante o período de 2 horas. A fluorescência intrínseca dos pinealócitos demonstrada na figura 8 é característica do indicador de NO DAR-4M AM, que apresenta um espectro de excitação/emissão na coloração vermelha. Observamos um pequeno aumento de NO no tempo de 5 minutos, quando comparada com o basal. Há um aumento significativo ($p < 0,05$) no período de 1 hora, havendo um aumento máximo com 2 horas.(Figura 8).

Figura 8 - Imagens de fluorescência e decurso temporal da produção de NO induzida por LPS em pinealócitos de rato. Os pinealócitos foram carregados com DAR-4M-AM (5 μ M, 30 min) e incubados com LPS (1 μ g/mL). A fluorescência celular foi observada por 2 horas no microscópio confocal, sob filtros λ excitação 550 nm/ λ emissão 580 nm – vermelho. Escala: 25 μ m.

Visando ampliar a curva de tempo, analisou-se as células estimuladas com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) no período de 4 horas e 6 horas depois de mantidas na estufa. Como demonstrado na figura 9, houve um declínio aos valores basais.

Figura 9 - Decurso temporal da produção de NO induzida por LPS em pinealócitos de rato. Intensidade de fluorescência do DAR-4M-AM expressa como porcentagem do basal. Os pinealócitos foram incubados com salina (basal) ou na presença de LPS (1 $\mu\text{g/mL}$, 1h30 – 6 h) e carregados com DAR-4M-AM (5 μM , 30 min). A fluorescência celular foi observada no microscópio confocal. Os dados representam a média $\pm$ epm da % de fluorescência obtida nos grupos salina, n=70-92 células de 3-4 experimentos individuais. * $p < 0.05$ vs basal.

Curva concentração-efeito de LPS sobre a produção de NO em pinealócitos

Foi observado um aumento máximo de fluorescência após 2 h de estimulação com LPS e foi então o tempo utilizado para a realização da curva concentração-efeito LPS (1-10 $\mu\text{g/mL}$). Para esse experimento, as células

foram estimuladas com diferentes concentrações de LPS (0,1 a 10 $\mu\text{g/mL}$;) e mantidas por 2 horas na estufa. Houve um aumento na fluorescência emitida pelo indicador DAR-4M-AM com concentrações crescentes de LPS de maneira dependente da concentração (Figura 10).

Figura 10 – Curva concentração-efeito de LPS sobre a produção de NO em pinealócitos. Intensidade de fluorescência do DAR-4M-AM expressa como porcentagem do basal. Os pinealócitos foram incubados com salina (basal) ou estimulados com LPS (0,1 a 10 $\mu\text{g/ml}$, 2 h) e carregados com DAR-4M-AM (5 μM , 30 min). A fluorescência celular foi observada no microscópio confocal sob filtros λ excitação 550 nm/ λ emissão 580 nm – vermelho. Os dados representam a média $\pm$ epm da fluorescência basal, $n=63-92$ células de 4 experimentos individuais.

Estudo com inibidores

Os inibidores de isoformas de NOS, L-NAME e 1400W, foram testados sobre a produção de NO induzida pela estimulação com LPS (1 $\mu\text{g/ml}$, 2h,

37°C, 5% CO₂) em pinealócitos carregados com DAR-4M-AM (5 µM, 30 min, 37°C, 5% CO₂). O pré-tratamento com L-NAME (inibidor não seletivo, 0,1 mM, 30 min antes) ou 1400W (inibidor seletivo da iNOS, 1 µM, 30 min) inibiu significativamente o aumento da produção de NO em pinealócitos estimulados com LPS retornando aos valores basais (Figura 11)

Figura 11 - Efeito de antagonistas de isoformas de NOS sobre a produção de NO induzida por LPS. Os pinealócitos foram estimulados com salina (basal) ou LPS (1 µg/ml, 2 h, 37°C, 5% CO₂) na ausência e na presença de (A) L-NAME (0,1 mM, 30 min antes) ou (B) 1400W (1 µM, 30 min antes) e então carregados com DAR-4M-AM (5 µM, 30 min, 37°C, 5% CO₂). Os dados representam a média ± epm da porcentagem de fluorescência basal do número de células especificadas provenientes de 3 culturas diferentes. * p< 0,05 LPS vs basal; # p<0,05 inibidor vs LPS.

DISCUSSÃO

Diversas evidências anatômicas, fisiológicas e farmacológicas suportam o conceito de que os sistemas nervoso, endócrino e imune interagem entre si. Respostas imunes alteram a função neural e endócrina e, por sua vez, atividades neurais e endócrinas modificam funções imunológicas (Blalock 1994).

A glândula pineal, por meio da ação de seu hormônio melatonina, tem papel central na sincronização de ritmos endógenos ao ciclo claro-escuro ambiental. Nossos estudos têm demonstrado que esta glândula participa da interação dos sistemas endócrino e imune (Markus *et al.*, 2007). A pineal está localizada fora da barreira hematoencefálica (Møller e Baeres, 2002) podendo portanto, responder a mediadores imunológicos circulantes (Skwarlo-Sonta *et al.*, 2003).

A via de sinalização mediada pelo fator de transcrição NF κ B , que é central na resposta imune inata, está constitutivamente expressa na glândula pineal (Ferreira *et al.*, 2005) instrumentando este órgão a responder de forma sincrônica às demais estruturas que são ativadas no início de uma resposta de injúria. Desta forma, citocinas pró-inflamatórias e glicorticóides atuam diretamente sobre a glândula pineal (Ferreira *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2006).

Neste trabalho foi determinado o mecanismo de ação de LPS, macromolécula complexa presente na parede celular de bactérias gram-negativas e potente indutor de inflamação sistêmica e local, sobre a pineal levando em consideração desde os receptores com os quais esta endotoxina atua, a via de sinalização preferencial e a determinação de uma resposta

funcional. Em outras palavras, foi mostrada a presença do receptor TLR4, a ativação da via de transcrição NF κ B e a expressão do RNAm, da proteína e do produto da isoforma induzida da enzima sintase do óxido nítrico.

O reconhecimento de patógenos microbianos e seus componentes por TLR4 dispara a ativação da via de sinalização NF κ B. Em vários modelos experimentais, como em células HEK293 transfectadas com cDNA-TLR4, é este receptor que medeia a ativação da via de sinalização NF κ B por LPS (Chow *et al.*, 1999). Portanto, o passo seguinte foi determinar se LPS ativa a via de transcrição NF κ B em pineais. O ensaio de deslocamento em gel, realizado em extratos nucleares obtidos pelo tratamento *in vivo* com LPS evidenciou o aumento da atividade de ligação NF κ B-DNA sugerindo, que a exemplo de outros tecidos, na pineal de ratos a ativação de TLR4 por LPS leva a uma ativação da via de sinalização NF κ B.

A via de sinalização de NF κ B é uma via ubíqua, implicada na rápida reprogramação da expressão gênica em resposta estímulos adversos. Em repouso, NF κ B está sequestrado no citoplasma através de uma forte associação com proteínas inibitórias I κ Bs que compreendem os subtipos α , β , ϵ , Bcl-3, p100 e p105. Sob estímulo com LPS e citocinas estas proteínas são rapidamente fosforiladas e degradadas pelo proteassoma liberando assim o NF κ B que se transloca para o núcleo para regular a expressão de vários genes. Dentre estes podemos citar genes que codificam para citocinas (TNF α , IL-1, IL-6), quimocinas (MCP-1, IL-8, MIP-1 α), moléculas de adesão, (ICAM-1 e VCAM-1), enzimas (COX-2 e iNOS), receptores (MHC, receptor IL-2, receptor IFN- γ), proteínas antiapoptóticas (XIAP, GADD45 β), enzimas antioxidantes

(MnSOD) e proteínas envolvidas no feed-back negativo de NF κ B (A20 e I κ B α) (Gloire et al., 2006).

Na pineal, a análise funcional da ativação desta via de sinalização demonstrou que o estímulo com LPS é capaz de ativar a transcrição da iNOS que produz grandes quantidades de NO, e que em células imunocompetentes está implicada na morte de invasores (Nathan e Xie, 1994). Além disso, tratamento com LPS aumenta a expressão de RNAm para iNOS na glândula pineal (Wong *et al.*, 1996). Um aumento da expressão da iNOS na pineal também foi observado após hipóxia (Kaur *et al.*, 2007).

Vários outros trabalhos demonstram que em um processo inflamatório, o LPS modula a função da glândula pineal, alterando a produção de serotonina/melatonina. Além disso, outras células da glândula pineal também são moduladas por essa endotoxina, como glias e astrócitos (Jiang-Shieh *et al.*, 2005).

Procuramos, portanto, caracterizar o efeito da estimulação por LPS diretamente em pinealócitos dispersos. Em pinealócitos isolados estimulados com LPS uma intensa marcação imunofluorescente para a isoforma iNOS foi observada.

Realizamos, a seguir, a padronização da medida funcional da produção de NO resultante da estimulação da enzima iNOS em pinealócitos de rato após estímulo com LPS. Através da técnica de microscopia confocal e utilização do indicador fluorescente DAR-4M-AM, pudemos observar o efeito de LPS diretamente em pinealócitos isolados de rato. A estimulação de pinealócitos com LPS produziu um aumento na intensidade de fluorescência do marcador

DAR-4M-AM, diretamente proporcional à produção de NO, de maneira dependente do tempo de estimulação e da concentração utilizada.

Diversos indicadores fluorescentes têm sido desenvolvidos e utilizados para a detecção direta de NO, trazendo grande contribuição às análises de imagem realizadas *in vitro* ou *in vivo*. Estes indicadores, que interagem com o NO formando um complexo fluorescente, incluem derivados diaminados de diferentes fluoróforos com propriedades fluorescentes próprias como, fluoresceína ($\lambda_{\text{excitação}}$ 495 nm, $\lambda_{\text{emissão}}$ 515 nm - verde), rodamina ($\lambda_{\text{excitação}}$ 550 nm, $\lambda_{\text{emissão}}$ 580 nm - vermelho) e antraquinona ($\lambda_{\text{excitação}}$ 520 nm, $\lambda_{\text{emissão}}$ 580 nm - vermelho). O composto diaminofluoresceína (DAF) está entre os mais utilizados na monitoração da produção de NO em vários protocolos *in vitro*, *in vivo* (Itoh *et al.*, 2000; Qi *et al.*, 2004). Contudo, para algumas aplicações biológicas, estes compostos apresentam a desvantagem do cromóforo fluoresceína ser sensível a variações de pH e seu espectro de excitação-emissão recair sobre a faixa de autofluorescência celular interferindo com as medidas analisadas. Em nossas preparações de pinealócitos, a fluorescência emitida deste marcador interferiu com a fluorescência intrínca dos compostos indólicos presentes na pineal. A serotonina, encontrada em grandes quantidades na pineal, é uma indoleamina derivada do aminoácido triptofano que é intrinsecamente fluorescente (Chattopadhyay *et al.*, 1996; Eftink *et al.*, 1995), com espectro de emissão na mesma faixa da fluoresceína.

Para evitar esta interferência “probes” com excitação e emissão em comprimentos de onda acima dos emitidos pela pineal, que recaem na faixa do vermelho têm sido usados. Estes cromóforos podem ser visualizados com filtro de rodamina e reduzir a interferência da fluorescência endógena.

No desenvolvimento deste trabalho optamos, portanto, pela utilização do indicador fluorescente de NO com base no fluoróforo rodamina, DAR-4M AM. DAR-4M-AM reage irreversivelmente com NO na presença de O₂ produzindo a forma triazol DAR-4M T ($\lambda_{\text{excitação}} = 550 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emissão}} = 580 \text{ nm}$ – fluorescência vermelha). Este indicador exibe baixo “background” de fluorescência com o maior comprimento de onda de excitação, possibilita a detecção sob uma extensa faixa de pH e é mais estável que outros fluoróforos utilizados para a detecção de NO (Kojima *et al.*, 2001). Portanto, dentro da célula, a forma relativamente não fluorescente do composto DAR-4M-AM é convertida em sua forma triazol DAR-4M-T, cuja intensidade de fluorescência é diretamente proporcional à concentração de NO, com um limite de detecção de 7 nM (Kojima *et al.*, 2001). Aumentos na fluorescência deste marcador relativos à produção de NO têm sido evidenciados em células endoteliais na aorta bovina e em neocortex de camundongo (Kojima *et al.*, 2001).

Nos protocolos experimentais existentes na literatura observa-se uma grande variedade nos tempos de incubação utilizados para a estimulação por LPS. Para padronizarmos o tempo ótimo de incubação para as nossas condições observamos a variação da fluorescência celular continuamente durante 2 h e a intervalos pré-determinados de 1 hora e 30 minutos a 6 horas de incubação com LPS. O aumento máximo de fluorescência foi observado após 2 h de estimulação com LPS e foi então o tempo utilizado para a realização da curva concentração-efeito. LPS (1 – 10 $\mu\text{g/ml}$) levou a um aumento da fluorescência de maneira dependente da concentração.

Para completar a caracterização desta medida funcional o clássico inibidor não seletivo de isoformas NOS, L-NAME, e o inibidor seletivo da

isoforma iNOS, 1400W, foram utilizados. 1400W é conhecido como um dos mais efetivos inibidores da iNOS sendo pelo menos 200 vezes mais seletivo para eNOS e 5000 vezes mais seletivo para nNOS (Garvey *et al* 1997). Como apenas níveis basais de NO foram mensurados em pinealócitos co-incubados com 1400W, concluímos que a produção de NO em pinealócitos estimulados com LPS é produzida pela iNOS.

Em conjunto, estes dados trazem uma evidência funcional de que a estimulação de pinealócitos de rato em cultura com LPS leva à ativação da cascata de sinalização de receptores TLR4 constitutivamente expressos na pineal de ratos.

O presente trabalho demonstra que a pineal é capaz de responder diretamente a LPS através da via de sinalização NF κ B resultando na expressão de iNOS e síntese de NO. Considerando que a ativação de NF κ B leva a uma supressão da produção de melatonina (Fernandes *et al.*, 2006), estes dados sugerem que NO produzido através da expressão de iNOS reduziria a produção do hormônio pineal. Corroborando com esta conclusão já foi demonstrado que doadores de NO são capazes de levar a um bloqueio da produção de melatonina e que este não é mimetizado por GMPc (Maronde *et al.*, 1995). Como apenas as sintases de óxido nítrico constitutivas e não a iNOS são ativadas por GMPc, este último resultado sugere que NO produzido via iNOS resulta na inibição da função pineal. Em suma, a indução da expressão de iNOS por LPS via NF κ B seria um dos mecanismos que levariam à supressão da produção noturna de melatonina em animais infectados.

CONCLUSÕES

1. A glândula pineal de ratos apresenta constitutivamente o RNAm para *Tlr4* e *Cd14*, bem como a proteína do receptor TLR4;
2. LPS (1 µg/ml, 30 min) ativa a translocação nuclear do NFκB na glândula pineal;
3. Pinealócitos tratados com LPS apresentaram um aumento da imunoreatividade à isoforma iNOS;
4. O tratamento com LPS leva a um aumento significativo na produção de NO, de maneira dependente de tempo e da concentração utilizada;
5. Os inibidores da iNOS L-NAME (0,1 mM, inibidor não seletivo) e 1400W (1 µM, inibidor seletivo), bloquearam o aumento da produção de NO induzida por LPS.
6. Estes dados demonstram que os pinealócitos de rato estão instrumentados para responder ao desafio com LPS através de ligação a TLR4 e indução da via NFκB. Esta sinalização induz a expressão da isoforma iNOS e um significativo aumento da produção de NO.
7. Em conjunto, estes dados corroboram a hipótese da existência de um eixo imune-pineal com supressão da produção de melatonina no início de uma resposta de defesa.

RESUMO

A glândula pineal é um órgão transdutor da informação fótica ambiental para o meio interno do organismo, provendo melatonina para a circulação sistêmica, a qual sinaliza o período de escuro e sincroniza os ritmos endógenos de acordo com as variações ambientais (Reiter, 1993). Várias evidências apontam para uma comunicação bidirecional entre a pineal e o sistema imune. Foi identificado na glândula pineal de ratos o fator de transcrição NF κ B, uma via de transcrição preferencial para citocinas e glicocorticóides e que modula a síntese de melatonina. TNF α inibe transientemente enquanto corticosterona potencia a transcrição do gene da *Aa-nat*, enzima chave na síntese de melatonina (Ferreira *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2006). LPS é um constituinte da membrana de bactérias gram-negativas e potente indutor de inflamação sistêmica e local. A sinalização de LPS é mediada por receptores toll-like 4 (TLR4) que leva à indução da enzima sintase de óxido nítrico induzível (iNOS) e subsequente formação de óxido nítrico (NO). O objetivo deste trabalho foi demonstrar a expressão de TLR4 e a resposta funcional da via de transdução de LPS. Foram usados ratos Wistar fêmeas (1-2 meses). O RNAm total foi extraído de pineais controle e usados em RT-PCR com primers específicos contra os transcritos *tlr-4*, *Cd14* e o controle interno *Gapdh*. Para a imunohistoquímica, secções de pineal de animais perfundidos com solução fixadora seguida de fixação com PAF 4% foram usadas com o anticorpo contra TLR4, sendo o controle negativo obtido na ausência de anticorpo. Os pinealócitos foram obtidos por tripsinização seguida de dispersão mecânica. O acúmulo de NF κ B em extratos nucleares de pineais de animais tratados *in vivo*

com LPS (1 mg/kg, iv, 2h) foi analisado por EMSA. A produção de NO foi medida por microscopia confocal em células carregadas com o cromóforo fluorescente DAR-4M-AM (5 μ M, 30min). RT-PCR revelou a presença constitutiva do RNAm de *tlr-4* e *Cd14* em pineais de rato. O estudo imunohistoquímico indicou uma marcação positiva para TLR4 em localização citoplasmática e nuclear, sendo abolida qualquer marcação na ausência do anticorpo. Um aumento na translocação nuclear de NF κ B foi observada nos animais tratados com LPS. LPS também levou a uma resposta funcional com aumento na reatividade da iNOS e aumento na produção de NO de maneira dependente de tempo e da concentração de LPS (0,1 to 10 μ g/mL). O máximo aumento da produção de NO foi observado com LPS 1 μ g/mL por 2 h. Este efeito foi inibido com o pré-tratamento com L-NAME (0.1mM, 30min) e 1400W (1 μ M, 30 min). Estes resultados demonstram que a glândula pineal de rato está instrumentada a responder ao desafio com LPS através da indução da via NF κ B mediada por TLR4. Além disso, funcionalmente esta estimulação induz um significativo aumento da imunoreatividade à iNOS e produção de NO. Estes dados corroboram com a hipótese do eixo imune-pineal com supressão da produção de melatonina no início de uma resposta de defesa

ABSTRACT

Accumulating evidences put the pineal gland and the immune system reciprocally linked by bidirectional communication. Rat pineal gland constitutively activated NF κ B, which plays a role on melatonin synthesis, is a preferential transduction pathway for cytokines and glucocorticoids (Ferreira *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2006). TNF α transiently inhibits, while corticosterone potentiates, noradrenaline-induced Aa-nat gene transcription, a key enzyme in melatonin synthesis. Lipopolysaccharides (LPS) are the major components of the outer membrane of Gram-negative bacteria, which makes them prime targets for recognition by the immune system. Toll-like receptor 4 (TLR4) conveys LPS signaling which induces expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and subsequent nitric oxide (NO) formation. An attempt has been made to demonstrate the expression of TLR4 in the rat pineal glands as well as the characterization of functional response and the transduction pathway following LPS challenge. Female Wistar rats (1-2 months) were used. Total RNA was extracted from control pineals and used in real time RT-PCR with specific primers against *tlr-4* and *Cd14* transcripts and the housekeeping gene *Gapdh* (internal control). For immunohistochemistry, the pineals cryosections (8 μ m) from perfused animals (Lana's fixative, 4% PAF, 15min) followed by fixation (4% PAF, 30min) were used with an antibody against rat TLR4, being the negative control performed in the absence of primary antibody. Pinealocytes were obtained by trypsinization followed by mechanical dispersion. The amount of NF κ B present in nuclear extracts of pinealocytes challenged with LPS (1 μ g/ml, 15min) was assayed by EMSA. NO production was measured by

confocal microscopy in cells loaded with the fluorescent dye DAR-4M-AM (5 μ M, 30min). RT-PCR revealed specific constitutive *tlr-4* and *Cd14* mRNA levels in rat pineals. Immunohistochemistry (n=4) indicated TLR4-positive and -negative immunostaining in the nuclear and cytoplasmic compartments of the cells. All TLR4-positive immunostaining were significantly decreased when experiments were performed in the absence of the primary antibody. An increase in the nuclear translocation of NF κ B was observed in LPS challenged cells. LPS (0.1 to 10 μ g/mL) also lead to a functional response, as it increased the immunoreactivity of iNOS and a time- and concentration-dependent manner the level of NO in cultured pinealocytes. The maximal NO content induced by LPS 1.0 μ g/mL was observed 2h after stimulation. Baseline levels were restored after 4-6h of LPS. The LPS stimulatory effect was fully abolished by the pre-treatments with L-NAME (0.1mM, 30min) and 1400W (1 μ M). Therefore, our data show that pinealocytes are instrumented for answering to LPS challenge through TLR4-induced NF κ B pathway. In addition we observed that this stimulation induces a significant increase in iNOS immunoreactivity and NO production. These data corroborates to the hypothesis that pineal melatonin production is suppressed at the beginning of a defense response.

BIBLIOGRAFIA

- Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 357: 593-615.
- Armelin M.A.; Markus, R.P., Ferreira Z.S. (2006). Production of nitric oxide induced by P2Y1 receptors in rat pineal gland. 38º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Ribeirão Preto.
- Axelrod J., Weissbach. H. (1961). Purification and properties of hydroxyindole-O-methyl transferase. *J. Biol. Chem.* 236: 211-213.
- Baler R., Klein D.C. (1995). Circadian expression of transcription factor Fra-2 in the rat pineal gland *Biol Chem* 270: 27319-27325.
- 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.
- Barbosa E.J.M., Ferreira Z.S., Markus R.P. (2000). - Purinergic and noradrenergic cotransmission in the rat pineal gland. *Eur. J. Pharmacol.* 401: 59-62.
- Besançon R., Reboul A., Claustrat B., Jouvét A., Belin M.F., Fèvre-Montange M. (1997). Tryptophan hydroxylase mRNAs analysis by RT-PCR: preliminary report on the effect of noradrenaline in the neonatal rat pineal gland. *J Neurosci Res.* 49: 750-758.
- Besançon R., Simonneaux V., Jouvét A., Belin M.F., Fèvre-Montange M. (1996). Nycthemeral expression of tryptophan hydroxylase mRNAs in the rat pineal gland. *Brain Res Mol Brain Res*: 40: 136-138.
- Blalock J.E. (1994). Shared ligands and receptors as a molecular mechanism for communication between the immune and neuroendocrine systems. *Ann N Y Acad Sci* 741: 292-298.
- Bogdan C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.* 2: 907-916.

- Bomfim R.F., Ferreira Z.S., Markus R.P. (2003). P2Y1 receptor stimulation promotes activation of Na⁺/H⁺ exchange in the rat pineal gland. Anais do XXXV Congresso Brasileiro de Farmacologia – SBFTE- Resumo 01-038 pag 72, Águas de Lindóia, SP.
- Borjigin J., Wang M.M., Snyder S.H. (1995). Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland. *Nature* 378:783-785.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Burke Z., Wells T., Carter D., Klein D., Baler R. (1999). Genetic targeting: the serotonin N-acetyltransferase promoter imparts circadian expression selectively in the pineal gland and retina of transgenic rats. *J. Neurochem.* 73: 1343-1349.
- Carter D.A. (1994). A daily rhythm of activator protein-1 activity in the rat pineal is dependent upon trans-synaptic induction of JunB. *Neuroscience* 62: 1267-1278.
- Carter D.A. (1997). Modulation of cellular AP-1 DNA binding activity by heat shock proteins. *FEBS Lett* 416: 81-85.
- Cecon E., Fernandes P.A.C.M., Ferreira Z.S., Markus R.P. (2008). Diurnal rhythm of the activation of the nuclear factor kappa B (NFkappaB) in rat pineal glands. In: FASEB Summer Research Conferences - Melatonin Receptors: actions and Therapeutics, Snowmass Village, Colorado, USA. p. 75
- Cecon E., Markus R.P., Ferreira Z.S. (2004). P2Y1 receptor signal transduction in the rat pineal gland – the role of phospholipase C (PLC). Anais do XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia – SBFTE, Águas de Lindóia, SP.
- Chattopadhyay A., Rukmini R., Mukherjee S. (1996). Photophysics of a neurotransmitter: ionization and spectroscopic properties of serotonin. *Biophys J.* 71: 1952-1960.

- Chetsawang B., Govitrapong P., Møller M. (2001). The effects of adrenergic agonists on c-fos, jun-B and nitric oxide synthase-like immunoreactivities in cultured rat pinealocytes. *J Pineal Res.* 31: 186-192.
- Chik C.L., Ho A.K., Klein D.C. (1988). Alpha 1-adrenergic potentiation of vasoactive intestinal peptide stimulation of rat pinealocyte adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate: evidence for a role of calcium and protein kinase-C. *Endocrinology* 122: 702-708.
- Chik, C.L. Arnason T.G., Dukewich W.G., Price D.M., Ranger A., Ho A.K. (2007). Histone H3 Phosphorylation in the Rat Pineal Gland: Adrenergic Regulation and Diurnal variation. *Endocrinology* 148: 1465-1472.
- Chow J.C., Young D.W., Golenbock D.T., Christ W.J., Gusovsky F. (1999). Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem.* 274: 10689-10692.
- Coon S.L.; Roseboom P.H., Baler R., Weller J.L., Namboodiri M.A.A., Koonin E.V., Klein D.C. (1995). Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. *Science* 270: 1681-1683.
- Duvernoy H.M., Parratte B., Tatou L., Vuillier, F. (2000). The human pineal gland. Relationships with surrounding structures and blood supply. *Neurol. Res.* 22: 747–790.
- Eftink M.R. (1995). Use of multiple spectroscopic methods to monitor equilibrium unfolding of proteins. *Methods Enzymol.* 259: 487-512.
- 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. *J Pineal Res.* 41: 344-350.
- Ferreira Z.S., Garcia C.R.S., Spray D.C., Markus R.P. (2003). P2Y1 receptor activation enhances the rate of rat pinealocyte-induced extracellular acidification via a calcium-dependent mechanism. *Pharmacology* 69: 33-37.
- Ferreira Z.S., Markus R.P. (2001). Characterization of P2Y (1)-like receptor in cultured rat pineal glands. *Eur. J. Pharmacol.* 415: 151-156.

- Ferreira Z.S., Fernandes P.A.C.M., Duma D., Assreuy J., Avellar M.C., Markus R.P. (2005). Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. *J Pineal Res.* 38: 182-188.
- Furchgott R.F, Zawadzki J.V (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288: 373-376.
- Gay N.J., Gangloff M. (2007). Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem.* 76: 141-165.
- Gastel J.A., Roseboom P.H., Rinaldi P.A., Weller J.L., Klein D.C. (1998) Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science*, 279: 1358-1360.
- Gloire G., Dejardin E., Piette J. (2006). Extending the nuclear roles of IkappaB kinase subunits. *Biochem Pharmacol.* 72: 1081-1089.
- Goldman H., Wurtman R.J. (1964). Flow of blood to the pineal body of the rat. *Nature* 203: 27–88
- Guha M., Mackman N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* 13: 85-94.
- Guillaumond F., Sage D., Deprez P., Bosler O., Becquet D., François-Bellan A.M. (2000). Circadian binding activity of AP-1, a regulator of the arylalkylamine N-acetyltransferase gene in the rat pineal gland, depends on circadian Fra-2, c-Jun, and Jun-D expression and is regulated by the clock's zeitgebers. *J Neurochem.* 75: 1398-1407.
- Heba G., Krzeminski T., Porc M., Grzyb J., Dembinska-Kiec A. (2001). Relation between expression of TNF alpha, iNOS, VEGF mRNA and development of heart failure after experimental myocardial infarction in rats. *J Physiol Pharmacol.* 52: 39-52.
- Heidbüchel U., Vollrath L. (1983). Morphological findings relating to the problem of cortex and medulla in the pineal glands of rat and hamster. *J Anat.* 136: 723-734.

- Ho A.K., Price D.M., Terriff D., Chik C.L. (2006). Timing of mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation in the rat pineal gland. *Mol Cell Endocrinol.* 252: 34-39.
- Ho A.K., Terriff D.L., Price D.M., Wloka M.T., Chik C.L. (2007) The role of inducible repressor proteins in the adrenergic induction of arylalkylamine-N-acetyltransferase and mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in rat pinealocytes. *Endocrinology* 148: 743–751.
- Huang S.K., Klein D.C., Korf H-W (1992). Immunocytochemical demonstration of rod-opsin, S-antigen, and neuron-specific proteins in the human pineal gland. *Cell Tissue Res.* 267: 493-498.
- Illnerova H., Buresova M., Presl J. (1993). Melatonin rhythm in human milk. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 838–841.
- Itoh Y., Ma F.H., Hoshi H., Oka M., Noda K., Ukai Y., Kojima H., Nagano T., Toda N. (2000). Determination and bioimaging method for nitric oxide in biological specimens by diaminofluorescein fluorometry. *Anal Biochem.* 287: 203-209.
- Jacobs R.A., Schaad N.C., Vanecek J., Leaver S., Aubry J.M., Korf H-W., Dahia P.L., Chew S.L., Grossman A.B. (1999). Pineal nitric oxide synthase, but not heme oxygenase, mRNA is suppressed by continuous exposure to light. *Brain Res Mol Brain Res.* 70: 264-272.
- Jiang-Shieh Y.F., Wu C.H., Chien H.F., Wei I.H., Chang M.L., Shieh J.Y., Wen C.Y. (2005). Reactive changes of interstitial glia and pinealocytes in the rat pineal gland challenged with cell wall components from gram-positive and -negative bacteria. *J Pineal Res.* 38: 17-26.
- Karin M., Ben-Neriah Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu. Rev. Immunol* 18: 621-663.
- Kaur C., Sivakumar V., Lu J., Ling E.A. (2007). Increased vascular permeability and nitric oxide production in response to hypoxia in the pineal gland. *J Pineal Res.* 42: 338-349.

- Kennaway D.J., Goble F.C., Stamp G.E. (1996). Factors influencing the development of melatonin rhythmicity in human. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 1525–1532.
- Kim J.S., Bailey M.J., Ho A.K., Møller M., Gaildrat P., Klein D.C. (2007) Daily rhythm in pineal phosphodiesterase activity reflects adrenergic/cAMP induction of the PDE4B2 variant. *Endocrinology* 148: 1475–1485.
- Klein D.C., Ganguly S., Coon S., Weller J.L., Obsil T., Hickman A., Dyda F. (2002). 14-3-3 Proteins and photoneuroendocrine transduction: role in controlling the daily rhythm in melatonin. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 365-373.
- Klein D.C. (1985). Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. In Everet, D e Clark, D. (eds), *Photoperiodism, Melatonin and the Pineal*. Ciba Foundation Symposium 117. Pittman Press, London, pp. 38-56.
- Klein D.C., Moore R.Y. (1979). Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 174: 245-262.
- Klein D.C., Weller J.L. (1970). Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science* 169: 1093-1095.
- Klein D.C. (2007) Arylalkylamine N-acetyltransferase: 'The timezyme'. *J. Biol. Chem.* 282: 4233–4237.
- Klein D.C., Coon S.L., Roseboom P.H., Weller J.L., Bernard M., Gastel J.A., Zatz M., Iuvone M., Rodriguez I.R., Bégay V., Falcon J., Cahill G.M., Cassone V.M., Baler, R. (1997). The melatonin rhythm- generation enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Progress in Hormone Res.* 52: 307-358.
- Kojima H., Hirotsu M., Nakatsubo N., Kikuchi K., Urano Y., Higuchi T. (2001). Bioimaging of nitric oxide with fluorescent indicators based on the rhodamine chromophore. *Analytical Biochemistry* 73: 1967– 1973.
- Korf H-W. (2000). Evolution of melatonin-producing pinealocytes, in: J. Olcese (Ed.), *Melatonin after Four Decades*, Kluwer Academic/ Plenum Press, New York, pp. 17–29.

- Korf H-W., White B.H., Schaad D.C., Klein D.C. (1992). Recoverin in pineal organs and retinae of various vertebrate species including man. *Brain Res.* 595: 57–66.
- Koyama T., Kimura C., Park S.J., Oike M., Ito Y. (2002). Functional implications of Ca^{2+} mobilizing properties for nitric oxide production in aortic endothelium. *Life Sci.* 72: 511-520.
- Lerner A.B., Case J.D., Takahashi Y., Lee T.H., Mori W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 80: 2587.
- Lin A.M., Schaad N.C., Schulz P.E., Coon S.L., Klein D.C. (1994). Pineal nitric oxide synthase: characteristics, adrenergic regulation and function. *Brain Res.* 651: 160-168.
- Link W.A., Ledo F., Torres B., Palczewska M., Madsen T.M., Savignac M., Albar J.P., Mellström B., Naranjo J.R. (2004). Day-night changes in downstream regulatory element antagonist modulator/potassium channel interacting protein activity contribute to circadian gene expression in pineal gland. *J Neurosci.* 24: 5346-5355.
- Lopes C., deLyra J.L., Markus R.P., Mariano M. (1997). Circadian rhythm in experimental chronic inflammation is modulated by melatonin. *J. Pineal Res.* 23: 72-78.
- Lopes C., Mariano M., Markus R.P. (2001). Interaction between the adrenal and the pineal gland in chronic experimental inflammation induced by BCG in mice. *Inflammation Res.* 50: 6-11.
- Lotufo C.M., Lopes C., Dubocovich M.L., Farsky S.H., Markus R.P. (2001). Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur J Pharmacol.* 430: 351-357.
- 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.
- Maronde E., Middendorff R., Mayer B., Olcese J. (1995). The effect of NO-donors in bovine and rat pineal cells: stimulation of cGMP and cGMP-

- independent inhibition of melatonin synthesis. *J Neuroendocrinol.* 7: 207-214.
- Maronde E., Pfeffer M., von Gall C., Dehghani F., Schomerus C., Wicht H., Kroeber S., Olcese J., Stehle J.H., Korf H-W. (1999). Signal transduction in the rodent pineal organ. From the membrane to the nucleus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 460: 109–131.
- Mayer B., Hemmens B. (1997). Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Biochem Sci.* 22: 477-481
- McKay L.I., Cidlowski J.A. (1999). Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor- κ B and steroid receptor-signaling pathways. *Molecular. Endocrine Rev.* 20: 435-459.
- Meffert M.K., Baltimore D. (2005). Physiological functions for brain NF- κ B. *Trends Neurosci.* 28: 37-43.
- Møller M., Baeres F.M. (2002). The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res* 309: 139-150.
- Moncada S., Higgs E.A. (1991). Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest.* 21: 361-374.
- Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142.
- O'Neill L.A., Kaltschmidt C. (2007). NF- κ B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci.* 20: 252-258.
- Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S. (1987). Nitric Oxide release accounts for biological activity of endothelium- derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526.
- Pittner J., Liu R., Brown R., Wolgast M., Persson A.E.G. (2003). Visualization of nitric oxide production and intracellular calcium in juxtamedullary afferent arteriolar endothelial cells. *Acta Physiol. Scand.* 179: 309-317.
- Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Van Huffel C., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P.,

- Layton B., Beutler B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 282: 2085-2088.
- 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.
- Provencio I.; Rodriguez I.R., Jiang G., Hayes W.P., Moreira E.F., Rollag M.D. (2000). A novel human opsin in the inner retina. *J. Neurosc.* 20: 600-605.
- Qi K., Qiu H., Rutherford J., Zhao Y., Nance D.M., Orr F.W. (2004). Direct visualization of nitric oxide release by liver cells after the arrest of metastatic tumor cells in the hepatic microvasculature. *J Surg Res*. 119: 29-35.
- Raetz C.R., Whitfield C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 71: 635-700.
- Reiter R.J., Hurlbut E.C., Esquifino A.I., Champney T.H., Steger R.W. (1984). Changes in serotonin levels, N-acetyltransferase activity, hydroxyindole-O-methyltransferase activity, and melatonin levels in the pineal gland of the Richardson's ground squirrel in relation to the light-dark cycle. *Neuroendocrinology*. 39: 356-360.
- Reiter R.J. (1993). the melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 49: 654-664.
- Rodrigues A., Queiróz D.B., Honda L., Silva E.J., Hall S.H., Avellar M.C. (2008). Activation of Toll-Like Receptor 4 (TLR4) by In Vivo and In Vitro Exposure of Rat Epididymis to Lipopolysaccharide from *Escherichia coli*. *Biol Reprod*. 79: 1135-1147.
- Shimazu R., Akashi S., Ogata H., Nagai Y., Fukudome K., Miyake K., Kimoto M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med*. 189: 1777-1782.
- Simonneaux V., Ribelayga C. (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev*. 55: 325-395.

- Skwarlo-Sonta K., Majewski P., Markowska M., Oblap R., Olszanska B. (2003). Bidirectional communication between the pineal gland and the immune system. *Can J Physiol Pharmacol.* 81: 342-349.
- Spessert R., Layes E., Vollrath L. (1993). Adrenergic stimulation of cyclic GMP formation requires NO-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase in rat pinealocytes. *J Neurochem.* 61: 138-143.
- 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: 314–320.
- Stuehr D.J., Cho H.J., Kwon N.S., Weise M.F., Nathan C.F. (1991). Purification and Characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci.* 90: 3491-3495.
- Sugden A.L., Sugden D., Klein D.C. (1986). Essential role of calcium influx in the adrenergic regulation of cAMP and cGMP in rat pinealocytes. *J Biol Chem.* 261: 11608-11612.
- Takahashi J.S. (1994). Circadian rhythms. ICER is nicer at night (sir!). *Curr Biol.* 4: 165-168.
- Tobias P.S., Soldau K., Gegner J.A., Mintz D., Ulevitch R.J. (1995). Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J Biol Chem.* 270: 10482-10488.
- Vanecek J., Sugden D., Weller J., Klein D.C. (1985). Atypical synergistic α 1 and β -adrenergic regulation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinology* 116: 2167-2173.
- Voisin P., Namboodiri M.A.A., Klein D.C. (1984). Arylamine N- acetyltransferase and aryl- alkylamine N- acetyltransferase in the mammalian pineal gland. *J Biol Chem* 259: 10913-10918.
- Vollrath L. (1981). The pineal organ. *Handbuch der mikroskopischen anatomie des menschen* vol 6, Part 7, Ed A. Oksche and L. Vollrath, Springer Verlag, Berlin. p. 665.

- White B.H., Klein D.C. (1993). Developmental appearance of pineal adrenergic-guanosine 3',5'-monophosphate response is determined by a process downstream from elevation of intracellular Ca^{2+} : possible involvement of a diffusible factor. *Endocrinology*. 132: 1026-1034.
- Xie Q., Nathan C. (1994). The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J Leukoc Biol*. 56: 576-582.
- Wong M.L., Rettori V., al-Shekhlee A., Bongiorno P.B., Canteros G., McCann S.M., Gold P.W., Licinio J. (1996). Inducible nitric oxide synthase gene expression in the brain during systemic inflammation. *Nat Med*. 2: 581-584.
- Yi F.X., Zhang A.Y., Campbell W.B., Zou A.P., Breemen C.V., Li P.L. (2002). Simultaneous in situ monitoring of intracellular Ca^{2+} and NO in endothelium of coronary arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 283: H2725-H2732.